ARNALDO ANTÓNIO DE MOURA SILVESTRE VIDEIRA

BIOGÉNESE DO COMPLEXO I (NADH: coQ-OXIDOREDUCTASE) DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE NEUROSPORA CRASSA

PORTO
1989

ARNALDO ANTÓNIO DE MOURA SILVESTRE VIDEIRA

BIOGÉNESE DO COMPLEXO I (NADH: coQ-OXIDOREDUCTASE) DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE NEUROSPORA CRASSA

PORTO
1989

ARNALDO ANTÓNIO DE MOURA SILVESTRE VIDEIRA

BIOGÉNESE DO COMPLEXO I (NADH:coQ-OXIDOREDUCTASE) DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE NEUROSPORA CRASSA

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade de Biologia Molecular, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

PORTO

1989

Ao meu Pai (1921-1987)

De acordo com o nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/7Ø foram utilizados neste trabalho resultados das comunicações, painéis e artigos a seguir discriminados:

Comunicações:

- Videira, A. & Werner, S. (1987). On the structure and function of the respiratory chain complex I of Neurospora crassa. Comunicação oral em Fungal Biology Conference, Asilomar, EUA.

- Videira, A. (1988). Biogénese do Complexo I (NADH:Q Oxidoreductase) em Neurospora crassa. Comunicação oral no Seminário do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar de 13/4, Universidade do Porto, Portugal.

- Werner, S., Filser, M. & Videira, A. (1988). Molekulare Analyse des Komplex I der Atmungskette. Comunicação oral no Congresso da SFB 184 sobre Molekulare Grundlagen der Biogenese von Zellorganellen, Max-Planck-Institut, Munique, Alemanha Federal.

- Videira, A. (1989). Isolamento e caracterização de cDNAs codificantes de subunidades nucleares da enzima NADH:coQ oxidoreductase (Complexo I). Comunicação oral no Seminário do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar de 12/4, Universidade do Porto, Portugal.

Painéis:

- Videira, A., Filser, M. & Werner, S. (1987). On the structure and function of the respiratory chain complex I of Neurospora crassa. Painel em Molecular Biology of Mitochondria and Chloroplasts, Cold Spring Harbor, EUA.

- Videira, A. & Werner, S. (1988). Biogenesis of Complex I from Neurospora crassa. Painel no 14° Simpósio Anual da EMBO sobre Organelle Genomes and the Nucleous, EMBL, Heidelberg, Alemanha Federal.

- Videira, A., Tropschug, M. & Werner, S. (1989). Molecular cloning of subunits of complex I from Neurospora crassa. Painel na EMBO-Alko Workshop sobre Molecular Biology of Filamentous Fungi, Hanasaari, Finlândia.

Publicações:

- Videira, A., & Werner, S. (1988). Assembly kinetics and identification of precursor proteins of complex I from Neurospora crassa. Eur. J. Biochem. 181, 493-5Ø2.

- Videira, A., Tropschug, M., Wachter, E., Schneider, H. & Werner, S. (1989). Molecular cloning of subunits of complex I from Neurospora crassa. Primary structure and in vitro expression of a 22-kDa polypeptide. J. Biol. Chem. (submetido para publicação).

- Videira, A., Tropschug, M. & Werner, S. (1989). Primary structure, in vitro expression and import into mitochondria of a 29/21-kDa subunit of complex I from Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Commun. (aceite para publicação).

- Videira, A., Tropschug, M. & Werner, S. (1989). Primary structure and *in vitro* expression of a 31-kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa* (manuscrito em preparação).

No cumprimento do disposto naquele Decreto-Lei, esclarece-se serem da nossa responsabilidade a execução das experiências que permitiram a obtenção dos resultados apresentados (exceptuando alguns casos em que a responsabilidade dessa execução é referida), assim como a sua interpretação e discussão, a preparação dos painéis e comunicações e a redacção dos artigos.

AGRADECIMENTOS

Os meus principais agradecimentos ao Prof. Doutor Sigurd Werner por todo o seu apoio e pela excelente orientação desta tese, cujo trabalho laboratorial foi realizado no seu laboratório no Institut für Physiologische Chemie der Universität München, de Julho de 1986 a Setembro de 1989.

Estou grato ao Doutor M. Tropschug por possibilitar a realização das experiências de clonagem no seu laboratório no referido Instituto, à Sra. H. Rothe por ajuda na preparação do complexo I, a H. Schneider por fornecer o banco de cDNA, ao Doutor E. Wachter por sequenciar parcialmente a proteína de 22 kDa, ao Doutor F.-U. Hartl por fornecer lisados de reticulócitos de coelho, a M. Arretz por fornecer a peptidase processadora mitocondrial, e de uma maneira geral a todas as pessoas que, de uma ou outra forma, contribuíram para tornar agradável a minha estadia no Instituto já citado e na cidade (única) de Munique.

À Doutora M.L. Teles Grilo quero agradecer particularmente o seu apoio e preocupação constantes, a sua responsabilidade na minha deslocação e a revisão crítica do manuscrito. Quero também agradecer a P. Magalhães comentários muito úteis ao manuscrito, e a preparação final do mesmo à Sra. H. Rothe e Sr. Carraça (figuras) e ao Sr. Gualter (montagem).

Os meus sinceros agradecimentos à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica pela atribuição da bolsa de estudos que usufruí nos últimos dois anos, ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e Universidade do Porto por me autorizarem a estadia fora do País, equiparado a bolseiro, e ao Instituto Nacional de Investigação Científica por subsidiar a impressão desta tese.

À Paula, o meu agradecimento especial.

..., dann keine gnade mehr mit denen,

die nicht geforscht haben

und doch reden.

B. BRECHT, *Leben des Galilei*

ABREVIATURAS

- AS-n; antissoro contra um polipéptido de n kDa
- AGE; electroforese em gel de agarose
- bp; pares de bases
- BSA; albumina de soro bovino
- cDNA; ácido desoxirribonucleico complementar
- CIP; fosfatase alcalina de intestino bovino
- dNTP; 5´ trifosfato de desoxinucleótido
- DMSO; dimetilsulfóxido
- DNase; desoxirribonuclease
- DTT; ditiotreitol
- EDTA; ácido etilenodiaminotetracético
- IPTG; isopropil-β-D-tiogalactopiranosídio
- M_r; peso molecular aparente
- mRNA; ácido ribonucleico mensageiro
- PAGE; electroforese em gel de poliacrilamida
- PEG; polietilenoglicol
- PMSF; fluoreto de fenilmetilsulfonilo
- subunidade de n kDa; subunidade com uma massa molecular aparente de n kDa
- SDS; dodecilsulfato de sódio
- TEMED; N,N,N´,N´-tetrametiletilenodiamina
- Tris; tris(hidroximetil)aminometano

Nota: Por dificuldade de tradução, alguns termos, correntemente utilizados em linguagem de Biologia Molecular, foram conservados no Inglês original e aparecem entre aspas no texto.

fNDICE

1. RESUMO 1

2. INTRODUÇÃO 5

3. MATERIAL E MÉTODOS 12

3.1. Firmas 12
3.2. Organismos e vectores utilizados 13
3.3. Preparação do complexo I de N. crassa 13
3.4. Purificação de subunidades polipeptídicas do complexo I 14
3.5. Electroforese preparativa de proteínas em gel de agarose (SDS/AGE) 18
3.6. Imunização de animais e obtenção de antissoros 20
3.7. Teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony 21
3.8. Marcação radioactiva "pulse-chase" de células de N. crassa 21
3.9. Electroforese de proteínas (SDS/PAGE), sua transferência para papel de nitrocelulose e decoração imunológica 22
3.10. Técnicas de imunoprecipitação e de análise e quantificação dos precipitados 23
3.11. Clonagem molecular 25
3.12. Preparação e indução de lisogénios 26
3.13. Purificação de anticorpos por afinidade 27
3.14. Purificação de DNA fágico 28
3.15. Subclonagem de inserções de cDNA em plasmídeos 28
3.16. Isolamento de DNA plasmídico
a) em pequena escala 29
b) em larga escala 30
3.17. Transformação de células bacterianas 31
3.18. Transcrição/tradução in vitro em sistemas heterólogos 32
3.19. Importação de proteínas por mitocôndrias isoladas de N. crassa 33
3.20. Electroforese de ácidos nucleicos e sua transferência para membranas de nylon 34
3.21. Marcação radioactiva de DNA 35
3.22. Hibridação 35
3.23. Encurtamento de segmentos de DNA para sequenciação 35
3.24. Sequenciação de DNA 36

3.25. Preparação de géis de sequenciação 37
3.26. Purificação de oligonucleótidos ("primers") para sequenciação de DNA 37
3.27. Sequenciação parcial da proteína de 22 kDa 38
3.28. Outros métodos 39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

4.1. Composição polipeptídica do complexo I de N. crassa ... 40
4.2. Caracterização de antissoros contra subunidades do complexo I de N. crassa 45
4.3. Cinética de reunião das subunidades do complexo I 49
4.4. Cálculo de parâmetros cinéticos 55
4.5. Cinética de marcação radioactiva de precursores de subunidades do complexo I 57
4.6. Comparação de precursores citoplasmáticos do complexo I sintetizados in vitro com as respectivas subunidades maduras 60
4.7. A subunidade de 22 kDa contém pontes dissulfídricas no estado nativo 63
4.8. Isolamento de clones de cDNA codificantes de subunidades do complexo I 65
4.9. Expressão da subunidade de 22 kDa in vitro 69
4.10. Análise de sequenciação parcial da subunidade de 22 kDa e de sequências de cDNAs correspondentes 72
4.11. Expressão da subunidade de 29 kDa in vitro 77
4.12. Sequência de uma inserção de cDNA codificante da subunidade de 29 kDa 78
4.13. Importação da subunidade de 29 kDa por mitocôndrias isoladas de N. crassa 82
4.14. Expressão da subunidade de 31 kDa in vitro 85
4.15. Sequência de uma inserção de cDNA codificante do precursor da subunidade de 31 kDa 86

5. COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS 91

6. BIBLIOGRAFIA 93

1. RESUMO

O complexo I da cadeia respiratória de Neurospora crassa foi preparado. Seguidamente, a enzima foi fraccionada por tratamento com diferentes agentes caotrópicos e pela utilização de várias técnicas de cromatografia. Foram isoladas sete subunidades polipeptídicas, de origem nuclear, com massas moleculares aparentes de 12.5, 14, 21, 22, 29, 31 e 33 kDa. Anticorpos policlonais específicos contra estas proteínas foram produzidos em coelhos. Os antissoros obtidos foram utilizados para estudar a composição polipeptídica do complexo I, para analizar o processo de reunião das diferentes subunidades da enzima in vivo, e para a detecção de proteínas precursoras in vitro. Finalmente, os mesmos antissoros permitiram o isolamento e caracterização de clones de cDNAs codificantes de subunidades do complexo I.

Células de N. crassa foram marcadas radioactivamente na ausência e na presença de inibidores da síntese proteica citoplasmática (cicloheximida). Técnicas imunológicas foram aplicadas no estudo de mitocôndrias destas células, revelando que o complexo I de N. crassa é constituído por cerca de 22 proteínas diferentes com massas moleculares aparentes variando entre 12 e 69 kDa. Destas, pelo menos 7 subunidades são sintetizadas na mitocôndria (massas moleculares aparentes de 12, 17, 22, 29, 33, 38 e 47 kDa). As restantes (incluindo todas as proteínas isoladas neste trabalho) são sintetizadas no citoplasma e, portanto, o produto de genes nucleares. A análise de filmes de raios-X por densitometria permitiu estimar a estequiometria dos diversos constituintes proteicos, sugerindo que alguns deles estão presentes em mais do que uma molécula por complexo.

Mitocôndrias de N. crassa foram isoladas a partir de células previamente marcadas com aminoácidos radioactivos (marcação "pulse-chase"). Utilizando técnicas de imunoprecipitação, foi calculada a cinética de incorporação de radioactividade em subunidades do complexo I. A enzima apresenta um tempo de incorporação semi-máximo de 1Ø minutos, valor semelhante ao obtido com citocromo oxidase. As proteínas individuais radioactivas (acabadas de sintetizar) reunem-se no complexo I a ritmos muito diversos, sugerindo a existência de reservas de polipéptidos precursores, com tamanhos diferentes. Duas proteínas sintetizadas na mitocôndria, um polipéptido de 29 kDa (produto do gene ND-1) e um polipéptido de 12 kDa, foram os componentes a aparecer na enzima mais rapidamente. Estimou-se que o tamanho das reservas de precursores varia entre 1 a 25% das quantidades de subunidades presentes no complexo final.

Proteínas precursoras do complexo I foram sintetizadas num sistema heterólogo in vitro. Após imunoprecipitação, o seu tamanho foi comparado com o das proteínas maduras correspondentes. Três subunidades (com massas moleculares aparentes de 25, 31 e 33 kDa) parecem ser inicialmente sintetizadas, nos ribossomas citoplasmáticos, como precursores de maior massa molecular (28, 34 e 36 kDa, respectivamente). Quatro subunidades (com massas moleculares aparentes de 12.5, 14, 22 e 29 kDa) são sintetizadas com o mesmo tamanho das suas formas maduras, em contraste com a maior parte das proteínas mitocondriais importadas.

Os antissoros obtidos foram utilizados no rastreio de um banco de expressão de cDNAs de N. crassa (o vector utilizado foi o fago lambda gt11). Vários clones reagiram com cada antissoro, foram isolados e alguns posteriormente caracterizados. Resultados obtidos com hibridização de RNA de N. crassa indicaram que os genes codificantes das subunidades do complexo I de 22, 29, 31 e 33 kDa são

transcritos em mRNAs de Ø.85, Ø.95, 1.3 e 1.4 kb, respectivamente. Rastreio do banco de cDNAs foi também efectuado com inserções de cDNA obtidas, utilizando técnicas de hibridação, de maneira a obter clones de maior tamanho. Foram obtidos clones de cDNA que contêm toda a informação necessária para a síntese dos precursores das subunidades de 22, 29 e 31 kDa. A partir destes clones, as proteínas puderam ser eficientemente sintetizadas in vitro (por meio de transcrição com RNA polimerase SP6 e de tradução em lisados de reticulócitos de coelho).

A sequenciação de inserções de cDNA correspondentes à subunidade de 22 kDa revelou um quadro de leitura codificante de uma proteína de 183 aminoácidos. Foi calculada uma massa molecular de 2Ø828 Da para esta subunidade do complexo I. Dados obtidos indicam que o polipéptido forma pontes dissulfídricas intramoleculares após a sua entrada na mitocôndria, mas antes de se associar com o complexo I. A sequência de aminoácidos deduzida mostra que oito cisteínas, distribuídas de uma maneira regular, fazem parte da estrutura primária desta proteína. Assim, é provável que a proteína forme pelo menos um dos centros [Fe/S] presentes no complexo I da cadeia respiratória.

A sequência de uma inserção de cDNA (889 bp) correspondente à subunidade de 29 kDa contém um quadro de leitura codificante de uma proteína de 2Ø1 aminoácidos. Foi calculada uma massa molecular de 21323 Da para este polipéptido, valor substancialmente mais pequeno do que o estimado por técnicas electroforéticas. A proteína precursora sintetizada in vitro pôde ser importada por mitocôndrias isoladas de N. crassa. Estas experiências indicaram que, para que o precursor se ligue às membranas mitocondriais, é necessário um potencial de membrana intacto.

A sequência de uma inserção de cDNA (1153 bp) correspondente ao precursor da subunidade de 31 kDa contém um quadro de leitura codificante de uma proteína de 283 aminoácidos. Foi calculada uma massa molecular de 32247 Da para este polipéptido. O precursor pôde ser processado in vitro com a peptidase da matriz mitocondrial purificada, originando a proteína madura. Para esta, é proposta uma massa molecular de 30446 Da. A subunidade de 31 kDa apresenta zonas de homologia com proteínas do cloroplasto, sustentando a hipótese de que, neste organelo celular, existe uma enzima estruturalmente semelhante ao complexo I.

2. INTRODUÇÃO

Uma das áreas do conhecimento de grande interesse actual e ainda pouco conhecidas é, sem dúvida, a biogénese mitocondrial. Em particular, a cadeia de transporte de electrões, dadas as suas funções bioenergéticas vitais, representa um modelo atractivo de estudo. Numa tentativa de contribuir para o esclarecimento de algumas das múltiplas questões possíveis, relativamente à formação daquele organelo celular, este trabalho debruça-se sobre a biogénese de um dos seus componentes.

A cadeia respiratória mitocondrial é constituída por cinco complexos de múltiplas subunidades polipeptídicas (complexo I ou NADH:coQ oxidorreductase; complexo II ou succinato:coQ oxidorreductase; complexo III ou ubiquinol:citocromo c oxidorreductase; complexo IV ou ferrocitocromo c:oxigénio oxidorreductase ou citocromo c oxidase; complexo V ou ATP sintetase ou FøF$_1$-ATPase), localizados na membrana interna da mitocôndria. Os complexos I, III e IV promovem uma translocação vectorial de protões através da membrana interna do organelo, concomitantemente com as suas reacções de transferência de electrões. O gradiente de protões é utilizado pelo complexo V para a formação de ATP. As reacções consumidoras ou libertadoras de energia resultam na translocação de protões do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial ou vice versa, respectivamente. A existência no complexo I, assim como nos complexos III, IV e V, de proteínas de origem mitocondrial e citoplasmática tornam-no um bom modelo para o estudo das relações entre o núcleo e a mitocôndria (como artigos de revisão, v. Ragan, 1976; Hatefi, 1985; Tzagoloff & Myers, 1986; Ragan, 1987). As técnicas imunológicas têm-se mostrado instrumentos poderosos para a caracterização de complexos supramoleculares. Decidimos começar pelo isolamento de

subunidades do complexo I e pela produção de anticorpos contra estas proteínas. O nosso fim era obter ferramenta específica para estudar esta unidade oligomérica.

É suposto que as desidrogenases do NADH, que simultaneamente promovem translocação de protões, são estrutural e funcionalmente semelhantes em diferentes espécies (Ragan, 1987). O complexo I (EC 1.6.5.3) de mamíferos e de fungos é constituído por cerca de 25 subunidades polipeptídicas diferentes, de origem nuclear ou mitocondrial (os produtos dos genes ND) (Heron et al., 1979; Anderson et al., 1981; Cleeter & Ragan, 1985; Nelson & Macino, 1985; Ise et al., 1985a, 1985b; Chomyn et al., 1985, 1986; Mariottini et al., 1986), representando assim o componente mais complicado da cadeia respiratória mitocondrial. A enzima contém ainda flavina (FMN) e 6-8 aglomerações [Fe/S] como grupos prostéticos. O complexo I de bovinos pode ser fraccionado na presença de perclorato originando 2 subcomplexos solúveis distintos: uma fracção flavoproteica (FP) e um fragmento contendo Fe/S (IP) (Davis & Hatefi, 1969; Hatefi & Stempel, 1969; Galante & Hatefi, 1979). O primeiro contém toda a FMN, 6 átomos de ferro e 3 polipéptidos (51, 24 e 10 kDa) em quantidades equimolares. O fragmento IP contém 9-10 do total de mais de 20 átomos de ferro por FMN no complexo I e um baixo conteúdo em flavina, provavelmente causado por contaminação com o fragmento FP. Os constituintes principais do IP são proteínas de 75, 49, 30, 18, 15 e 13 kDa, sendo também observadas quantidades variáveis de outros componentes menos abundantes. Um terceiro fragmento (HP), insolúvel após o tratamento com perclorato, contém o grosso das subunidades da enzima e cerca de 6-7 átomos de ferro. A estequiometria H+/e- do complexo I é conhecida: por cada electrão transferido entre NADH e ubiquinona, dois protões passam da matriz para o espaco intermembranar da mitocôndria (Wikstroem, 1984). Esta alta estequiometria requer, por analogia com os complexos

III e IV, uma via de transporte de electrões complicada, representando uma explicação óbvia para a complexa estrutura da enzima (Ragan, 1987).

A investigação tem-se concentrado principalmente na estrutura e/ou função do complexo I, utilizando a enzima de corações bovinos como modelo. A identificação de uma subunidade de 51 kDa como o local de ligação do NADH (Chen & Guillory, 1981), sugere fortemente que o grupo FMN, como o mais provável oxidante do NADH, também está localizado nesta subunidade (Ragan, 1987). A ubiquinona liga a uma subunidade de 14 kDa (Suzuki & Ozawa, 1986) e várias proteínas do complexo I têm sido isoladas e identificadas como fazendo parte dos centros [Fe/S] (Ohnishi et al., 1981, 1985; Ragan et al., 1982a, 1982b). Compostos específicos que interferem em locais catalíticos definidos (e.g., inibidores), têm também sido experimentados no estudo da estrutura/função de complexos oligoméricos. Análogos da petidina, inibidores da função NADH:coQ oxidorreductase, marcaram as subunidades ND do complexo I (Werner, 1989). O produto do gene ND-1 foi marcado por um derivado da rotenona sugerindo um papel na ligação e redução da ubiquinona (Earley et al., 1987), ou marcado com DCCD (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) radioactivo (Yagi & Hatefi, 1988). As subunidades que ligam o DCCD nos complexos I, III, IV e, em alguns organismos, V, têm origem mitocondrial; considera-se que estão envolvidas na translocação de protões (Yagi & Hatefi, 1988). De facto, o DCCD inibe a actividade de NADH:coQ oxidorreductase apenas em organismos em que esta função está acoplada à translocação de protões (Yagi, 1987). A estrutura do complexo I tem sido investigada, p. e., utilizando sondas hidrofóbicas e hidrofílicas e experiências de ligação cruzada ("cross-linking") (Smith & Ragan, 1980; Cleeter et al., 1985; Ragan, 1987; Patel et al., 1988). Foi já proposto um modelo representando o complexo I constituído por um domínio catalítico essencialmente hidrofílico e

transmembranar, protegido da interacção com o meio lipídico da membrana por outras proteínas mais hidrofóbicas, como os produtos dos genes ND (Ragan, 1987; Patel et al., 1988). A evidência para isto parece, no entanto, ser fraca e sem precedentes (Fearnley et al., 1989). De facto, a marcação de subunidades ND com várias substâncias inibidoras, como atràs referido, sugere o seu envolvimento mais directo na actividade do complexo I. Por outro lado, o efeito inibidor pode ser indirecto, resultante, por exemplo, de uma alteração da conformação geral da enzima. A comparação entre genes ND de diferentes espécies não sugere uma função especial para os polipéptidos, apesar de existirem regiões altamente conservadas (Ragan, 1987).

A composição em subunidades, parâmetros de actividade e estrutura tri-dimensional do complexo I de Neurospora foram determinados recentemente (Ise et al., 1985a, 1985b; Leonard et al., 1987). De qualquer modo, pouco é sabido àcerca do processo de reunião desta proteína oligomérica. A formação de outros complexos da cadeia respiratória tem sido examinada tanto in vivo (Schwab et al., 1972; Werner & Sebald, 1981; Sidhu & Beattie, 1983) como in vitro (Wielburski et al., 1982; Lewin & Norman, 1983; Wielburski & Nelson, 1984), revelando que os componentes individuais recentemente sintetizados se associam a taxas distintas. Os resultados têm sido atribuídos à existência de diferentes reservas de subunidades não associadas ou a diferentes taxas de integração dos polipéptidos. Utilizando técnicas de marcação "pulse-chase", resolvemos estudar a cinética de formação do complexo I em mitocôndrias de N. crassa.

Uma descoberta interessante foi a de que o complexo I de mamíferos e fungos contém proteínas de origem mitocondrial, representando nos primeiros cerca de 60% da capacidade codificante do genoma da mitocôndria. Em N. crassa, existem homólogos dos genes humanos ND-1, ND-2, ND-3, ND-4, ND-4L, ND-5 e ND-6 (Breitenberger & RajBhandary,

1985; Burger & Werner, 1985; de Vries et al., 1986, e comunicação pessoal; Nelson & Macino, 1987). Contudo, a maioria das subunidades da enzima são sintetizadas no citoplasma e necessitam, por isso, de ser dirigidas para a mitocôndria. Os mecanismos e componentes deste processo (como a compreensão dos sinais necessários, os receptores mitocondriais, a translocação das proteínas, o tipo de energia necessário, etc.) têm sido alvo de investigação intensa (como artigos de revisão v. Pfanner & Neupert, 1987; Eilers & Schatz, 1988; Pfanner et al., 1988; Roise & Schatz, 1988; Verner & Schatz, 1988; Hartl et al., 1989; Tropschug & Neupert, 1989). A maior parte das proteínas da matriz e membrana interna mitocondriais são inicialmente sintetizadas com sequências sinal removíveis (pré-sequências). Por exemplo, isto aplica-se à maioria das subunidades do complexo III de N. crassa (Teintze et al., 1982) e a algumas subunidades do complexo I bovino, recentemente analizadas (Gibb & Ragan, 1989). Para investigar a situação no complexo I de N. crassa, precursores de componentes da enzima codificados no núcleo foram sintetizados em lisados de reticulócitos de coelho e comparados com as respectivas subunidades maduras isoladas da mitocôndria.

No complexo I de corações bovinos, a subunidade que liga o NADH é provavelmente uma proteína de 51 kDa de origem nuclear (Chen & Guilory, 1981; Ragan, 1987). Recentemente, foi demonstrado que a maior parte das subunidades que ligam centros [Fe/S] são também codificadas no núcleo (Chomyn et al., 1988). Parece de interesse referir que, a partir de células de N. crassa tratadas com cloranfenicol, foi isolada uma isoforma do complexo I contendo apenas subunidades de origem nuclear (Friedrich et al., 1989). A actividade desta isoforma da enzima é insensível à rotenona, em acordo com resultados que imputam a ligação deste inibidor a uma subunidade do complexo I de origem mitocondrial (Earley et al., 1987; v. acima). Apesar de terem sido publicadas as

sequências de genes mitocondriais do complexo I humano (Anderson et al., 1981; Chomyn et al., 1985, 1986) e de várias outras espécies (v. Ragan, 1987), existe pouca informação disponível no que diz respeito aos genes de subunidades sintetizadas no citoplasma. Tanto quanto sabemos, sequências totais ou parciais foram publicadas apenas para uma subunidade bovina de 24 kDa (von Bahr-Lindstroem et al., 1983; Pilkington & Walker, 1989), para a sua equivalente de ratos (Nishikimi et al., 1988) e de humanos (Pilkington & Walker, 1989), para um polipéptido humano de 75 kDa (Gershwin et al., 1987; v. também Frostell et al., 1988), e para uma subunidade bovina de 49 kDa (Fearnley et al., 1989).

Por outro lado, a natureza complicada do complexo I faz supor que outras funções, para além da transferência de electrões e translocação de protões, são efectuadas por esta enzima. De facto, enzimas de composição mais simples realizam aquelas funções em organismos procarióticos como, e.g., Paracoccus denitrificans (Yagi, 1986; George et al., 1986; Meinhardt et al., 1987) ou Thermus thermophilus (Yagi et al., 1988). Além disso, as funções de subunidades de complexos proteicos que não contêm grupos prostéticos são essencialmente desconhecidas (Hatefi, 1985). Nos últimos anos, temos assistido à acumulação de sequências de DNA e de proteínas em bancos de dados. A possibilidade de procurar sequências homólogas nestes bancos, poderá ajudar a desvendar outras funções do complexo I ainda desconhecidas. Apenas como exemplo, a comparação de sequências levou à identificação de proteínas envolvidas no processo de reunião de complexos proteicos (v. Ellis & Hemmingsen, 1989), ou de proteínas com funções simultaneamente bioenergéticas e de biogénese (Schulte et al., 1989). Para obter informação sobre a estrutura de subunidades do complexo I, sintetizadas no citoplasma, decidimos isolar e sequenciar clones de cDNA correspondentes.

Grande interesse no complexo I de mamíferos surgiu após a descoberta de deficiências da enzima em várias doenças humanas. Um largo espectro de doenças neuromusculares têm sido recentemente associadas com alterações da estrutura mitocondrial e da capacidade de gerar ATP, afectando principalmente os tecidos mais dependentes da energia formada na mitocôndria (Morgan-Hughes, 1986; Capaldi, 1988; Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988; Wallace, 1989). Mais especificamente, foram detectadas deficiências do complexo I em certos tecidos (Watmough et al., 1989) ou em subunidades da enzima (Moreadith et al., 1987). Na síndrome de Kearns-Sayre (caracterizada por deficiências dos complexos I e III), p.e., observaram-se delecções no DNA mitocondrial. As moléculas deficientes do genoma mitocondrial parecem co-existir com moléculas normais, sendo a quantidade relativa de cada uma delas responsável pelo aparecimento do fenótipo observado (Morgan-Hughes, 1986; Wallace, 1989). Esta situação é comparável à existente nos mutantes "stopper" de N. crassa (Bertrand et al., 1980; Gross et al., 1984). Um destes mutantes, p.e., apresenta deficiências na actividade do complexo I e delecções do DNA mitocondrial cobrindo 2 subunidades da enzima (ND-2 e ND-3, de Vries et al., 1981, 1986). Embora mais investigação seja necessária, estas semelhanças abrem boas perspectivas à utilização de fungos como modelo para o estudo de fenómenos equivalentes aos observados em doenças humanas, com as vantagens inerentes àqueles organismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Firmas (por ordem alfabética) onde foi adquirido o material a seguir discriminado:

- Aldrich, RFA: CF_3SO_3Li.
- Amersham Buchler, RFA: Amplify; lisados de reticulócitos de coelho; [^{3}H]leucina (64 Ci/mmol); [^{3}H]valina (44 Ci/mmol); [^{35}S]metionina (500 Ci/mmol).
- Behring Werk AG, RFA: adjuvante de Freund.
- Bethesda Research Lab., USA: agarose ultrapura de baixa endoosmose; marcadores de peso molecular de RNA.
- Biorad, RFA: Amberlite XAD-2
- Boehringer Mannheim, RFA: ATP; CIP; DNase I; exonuclease III; fragmento Klenow da DNA polimerase I; DNA ligase T7; nuclease S1; proteinase K; RNA polimerases SP6 e T7; RNase A; todas as enzimas de restricção.
- Carl Roth, RFA: cicloheximida (Actidion).
- Diagen, RFA: material para purificação de ácidos nucleicos (Qiagen-tips).
- Dupont NEN, USA: [^{32}P]dATP (800 Ci/mmol); [^{35}S]dATP (800 Ci/mmol).
- Janssen, Bélgica: partículas coloidais de ouro (AuroDye); proteína A ou anticorpos contra IgG de coelho marcados com partículas de ouro (AuroProbe BL) e respectivo reagente de prata intensificador (IntenSE II).
- Kodak, USA: filmes de raios-X (X-Omat AR-5).
- Pall Filtration Corp., USA: membranas de nylon para transferência de ácidos nucleicos (Biodyne™ A).
- Pharmacia LKB, RFA: DEAE-Sepharose; Phenyl-Sepharose; Sephadex G-50; Sepharose-proteína A.
- Riedel de Haen, RFA: Areia de quartzo (ø = 0.4 mm); Cloreto de césio.

- Schleicher & Schüll, RFA: "Biotrap" com respectivas membranas (B1 e B2) utilizadas para a eluição electroforética de DNA; filtros de nitrocelulose; papel de filtro.
- Serva, RFA: acrilamida; lisozima; membranas de diálise (Visking); N,N´-metilenobisacrilamida; TEMED.
- Sigma, USA: ampicilina; BSA; cloranfenicol; DNA de esperma de salmão; marcadores de peso molecular de proteínas; PEG; peroxidase ligada a anticorpos contra IgG de coelho; polivinilpirrolidona.
- U.S. Biochemicals Corporation, USA: "kit" para sequenciação de DNA; Sequenase (DNA polimerase T7 modificada).
- Whatman, Inglaterra: papel Whatman (3MM).

3.2. Organismos e vectores utilizados

A estirpe de N. crassa utilizada foi o tipo selvagem 74-OR23-1A do Fungal Genetic Stock Center. As estirpes de Escherichia coli Y1088, Y1089 e Y1090 foram usadas como hospedeiros de fagos lambda gt11 quiméricos; a primeira para a amplificação de fagos, a segunda como estirpe lisogénica e a terceira como hospedeiro lítico (Young & Davis, 1983a, 1983b). A estirpe DH1 de E. coli (Low, 1968) foi utilizada para transformação com plasmídeos derivados do vector de transcrição pGEM4 (Melton et al., 1984).

3.3. Preparação do complexo I de N. crassa

O complexo I foi preparado com algumas modificações (Filser & Werner, 1988) do método de Ise et al. (1985a, 1985b). Todos os processos foram efectuados a 4°C. Membranas mitocondriais eram suspendidas em 50 mM Tris/HCl pH 7.5 (20

mg de proteína/ml) e, seguidamente, era adicionada a quantidade de uma solução de 10% Triton X-100 necessária para obter 0.66 g de detergente/g de proteína. O material era centrifugado a 100000 x g durante 50 min. O sedimento era ressuspendido em 50 mM Tris/HCl pH 7.5, uma solução de 20% Triton X-100 era adicionada de maneira a obter 1.8 g de detergente/g de proteína, e a mistura novamente centrifugada. O sobrenadante era incubado durante a noite com uma quantidade de Amberlite XAD-2 equivalente a 10 x o peso de detergente, filtrado por gaze e centrifugado a 100000 x g durante 50 min. O sedimento resultante era dissolvido em 50 mM Tris/HCl pH 7.5 contendo 3% Triton X-100 e aplicado numa coluna de DEAE-Sepharose CL 6B equilibrada com 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.3% Triton X-100. A coluna era lavada com esta última solução contendo 100 mM NaCl, e o complexo I eluído com a mesma solução contendo 200 mM NaCl. A solução era incubada com uma quantidade de Amberlite XAD-2 suficiente para remover 75% do detergente, filtrada por gaze e centrifugada a 100000 x g durante 60 min. O sedimento de complexo I era suspendido em 50 mM Tris/HCl pH 7.5 e conservado a -20°C.

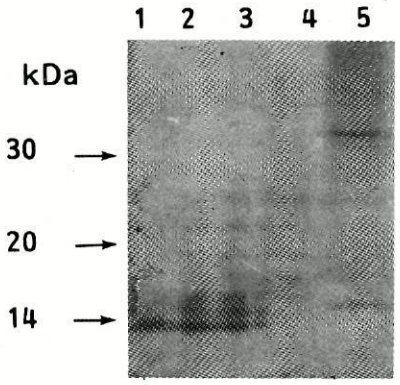
3.4. Purificação de subunidades polipeptídicas do complexo I

A consulta de várias referências (e.g., Davis & Hatefi, 1969; Moss & Rosenblum, 1972; Hatefi & Hanstein, 1974; Galante & Hatefi, 1979; Calbiochem-Behring, 1981; Pharmacia, 1983, 1984, 1986, 1987; Ohnishi et al., 1985) foi de grande ajuda tendo em vista o estabelecimento de protocolos para fraccionar o complexo I. As extracções do complexo I com agentes caotrópicos (4 mg proteína/ml) eram efectuadas a 37°C durante 30 min. As misturas eram depois centrifugadas a 50000 x g durante 20 min à temperatura ambiente, para separar as proteínas solubilizadas (sobrenadante). Estas

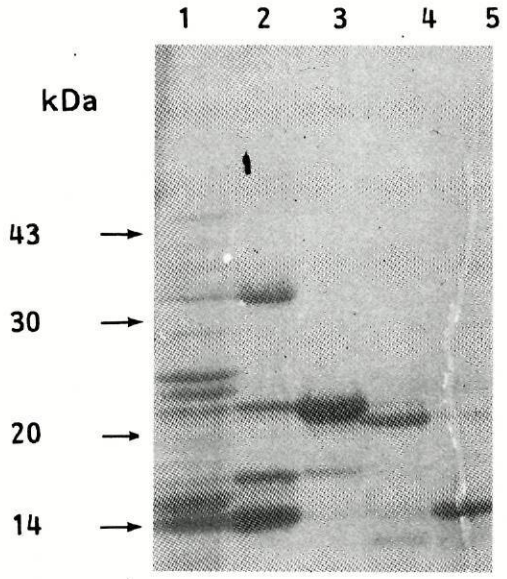
proteínas eram dializadas e liofilizadas para preparação em larga escala, ou obtidas por precipitação com sulfato de amónio (adição de 1 volume de uma solução saturada) quando se pretendia uma rápida análise. Todos os processos cromatográficos decorreram à temperatura ambiente. A taxa de fluxo aplicada nas colunas era sempre ligeiramente inferior à que era obtida apenas por acção da gravidade.

Inicialmente, o complexo I era extraído com Ø.15 M trifluorometanosulfonato de lítio (CF_3SO_3Li), Ø.1 M hidrocloreto de guanidina. As proteínas solubilizadas (predominantemente um polipéptido de 12.5 kDa) eram aplicadas numa coluna de hidroxilapatite equilibrada com 1Ø mM fosfato de sódio pH 6.4, Ø.1% SDS. A proteína de 12.5 kDa era eluída com 15Ø mM fosfato de sódio pH 6.4, Ø.1% SDS (fig. 1).

O sedimento de "complexo I" era depois tratado com 1.5 M CF_3SO_3Li, 1 M hidrocloreto de guanidina. As proteínas solubilizadas eram aplicadas numa coluna de Phenyl-Sepharose equilibrada com tampão A (2Ø mM Tris/HCl pH 7.Ø, 4 M ureia) contendo 1 M NaCl. Ao eluir com a mesma solução, eram obtidas duas fracções separadas, a primeira contendo uma mistura complexa de proteínas e a segunda 4 polipéptidos (massas moleculares aparentes de 33, 22, 17 e 14 kDa). A coluna era então eluída com um gradiente discontínuo e decrescente de NaCl no tampão A: polipéptidos com massas moleculares aparentes de 22, 21 e 14 kDa eram isolados a concentrações de 8ØØ, 6ØØ e 2ØØ mM NaCl, respectivamente. Os resultados obtidos nesta coluna estão ilustrados na figura 2. A fracção de 4 proteínas obtidas com 1 M NaCl era depois submetida a cromatografia em DEAE-Sepharose (fig. 3). Utilizando tampão A, os três polipéptidos mais pequenos não ligavam à coluna. Esta era então lavada com tampão A contendo 1ØØ mM NaCl, e a proteína de 33 kDa eluída com tampão A contendo 2ØØ mM NaCl. Alternativamente, esta proteína podia também ser isolada por cromatografia em



1



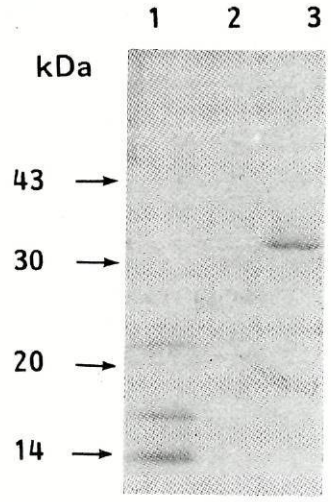
2

Figura 1. Cromatografia em colunas de hidroxilapatite.

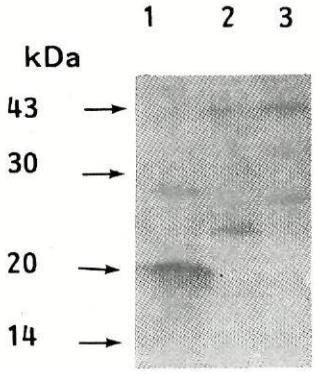
As proteínas do complexo I, solubilizadas com Ø.15 M CF_3SO_3Li, Ø.1 M hidrocloreto de guanidina, foram aplicadas numa coluna de hidroxilapatite equilibrada com 1Ø mM fosfato de sódio pH 6.4 contendo Ø.1% SDS. A coluna foi depois eluída com soluções contendo o detergente e concentracções crescentes de tampão fosfato de sódio pH 6.4. O material obtido com 15Ø mM (1), 175 mM (2), 2ØØ mM (3), 25Ø mM (4) e 35Ø mM (5) de tampão foi analizado por SDS/PAGE e o gel corado com azul de Coomassie.

Figura 2. Cromatografia em colunas de Phenyl-Sepharose.

As proteínas do complexo I, solubilizadas com 1.5 M CF_3SO_3Li, 1 M hidrocloreto de guanidina, foram aplicadas numa coluna de Phenyl-Sepharose equilibrada com tampão A contendo 1 M NaCl, tendo-se obtido 2 fracções separadas (1 e 2, sucessivamente). A coluna foi depois eluída com tampão A contendo 8ØØ mM (3), 6ØØ mM (4) e 2ØØ mM (5) NaCl. O material eluído foi separado por SDS/PAGE e o gel corado com azul de Coomassie.



3



4

Figura 3. Cromatografia em colunas de DEAE-Sepharose.

Uma fracção do complexo I contendo 4 subunidades (v. fig. 2, pista 2) foi aplicada numa coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com tampão A. A coluna foi então eluída com tampão A (1), e com tampão A contendo 100 mM (2) e 200 mM (3) NaCl. O material eluído foi separado por SDS/PAGE e o gel corado com azul de Coomassie.

Figura 4. Cromatografia em colunas de DEAE-Sepharose.

As proteínas solubilizadas do complexo I com 200 mM carbonato de sódio e não adsorvidas em Phenyl-Sepharose (v. pormenores em Material e Métodos) foram aplicadas numa coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com tampão A. A coluna foi então eluída com tampão A (1), e com tampão A contendo 100 mM (2) e 200 mM (3) NaCl. O material eluído foi separado por SDS/PAGE e o gel corado com azul de Coomassie.

hidroxilapatite, como descrito para a proteína de 12.5 kDa, uma vez que só é eluída com concentracções relativamente elevadas de fosfato de sódio (a partir de cerca de 350 mM).

O "complexo I" resultante era extraído com 200 mM carbonato de sódio. As proteínas libertadas eram submetidas a cromatografia em Phenyl-Sepharose, como descrito acima. Os polipéptidos não adsorvidos eram aplicados numa coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com tampão A. Uma fracção enriquecida num polipéptido de 29 kDa era eluída com tampão A na presenca de 100 mM NaCl (fig. 4). Esta proteína era posteriormente purificada por electroforese preparativa em gel de agarose (SDS/AGE, v. ponto seguinte).

Os sedimentos residuais de "complexo I" eram suspendidos em 2.5% SDS, 5% 2-mercaptoetanol e aquecidos a 95°C durante 5 min. As proteínas solubilizadas eram separadas por SDS/AGE e, em seguida, era excisada uma banda bem separada de 31 kDa.

A proteína de 22 kDa isolada, como descrito acima, era mais purificada utilizando a técnica de SDS/AGE, permitindo assim obter duas preparações do polipéptido (designadas 22a e 22b).

A figura 5 mostra um esquema resumido do procedimento utilizado para isolar subunidades do complexo I de N. crassa.

3.5. Electroforese preparativa de proteínas em gel de agarose (SDS/AGE)

As proteínas eram separadas em géis de 5% agarose de baixo ponto de fusão, essencialmente como descrito por Sakakibara et al. (1987). O tampão de electroforese era 25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% SDS. A electroforese era corrida a 7-8 V/cm, até a marca de azul de bromofenol migrar a uma distância de cerca de 1 cm do fim do gel (comprimento

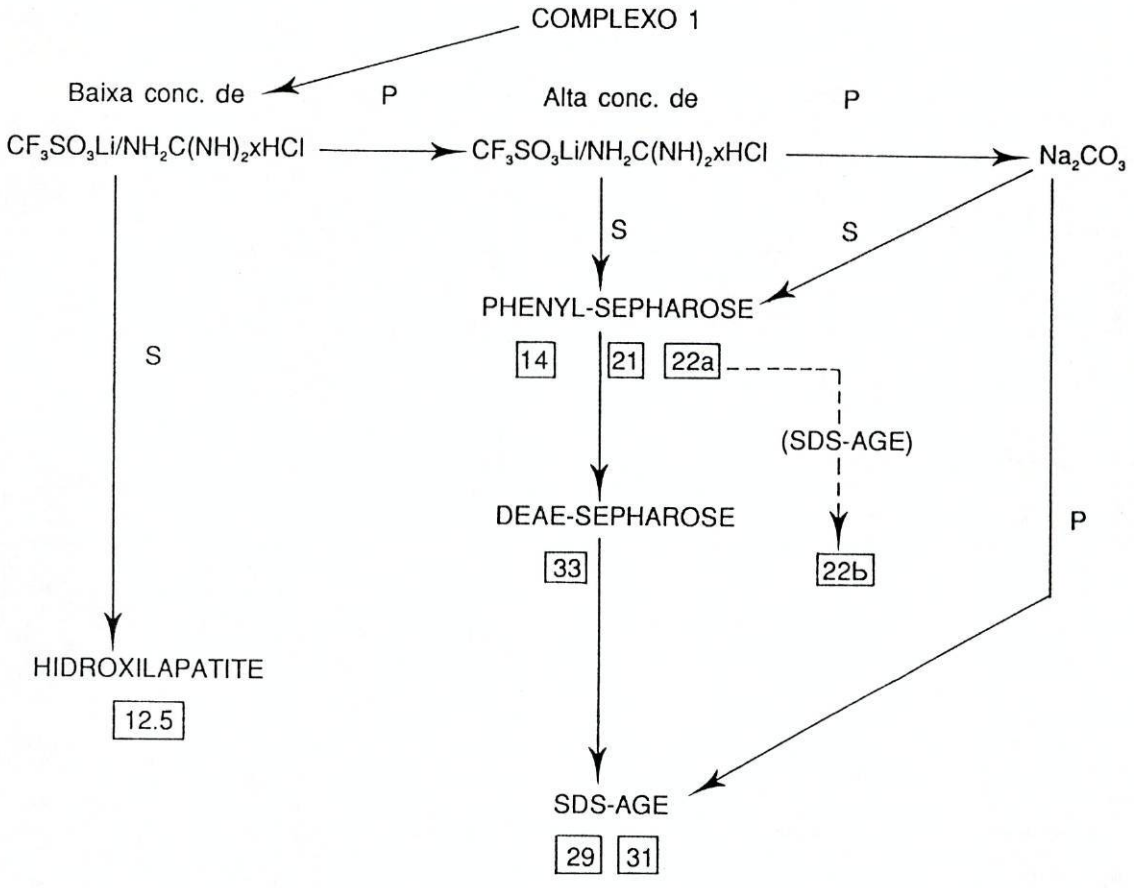


Figura 5. Esquema do procedimento utilizado para isolar subunidades do complexo I de N. crassa.

Os números entre quadrados representam massas moleculares aparentes (em kDa) das proteínas isoladas. P e S referem-se a sedimento e sobrenadante, respectivamente. As linhas tracejadas ligam as duas preparações obtidas de um polipéptido de 22 kDa (designadas 22a e 22b). Mais detalhes estão incluídos na secção de Material e Métodos.

do gel = 13.5 cm). O gel era corado com azul de Coomassie durante 60 min (azul de Coomassie dissolvido para uma conc. final de 2% numa solução contendo 1.3 l de dH_2O, 300 ml de ácido acético glacial e 750 ml de isopropanol) e descorado numa solução de 10% ácido acético glacial e 10% isopropanol. Os pedaços de gel contendo as proteínas relevantes eram excisados, imersos em dH_2O durante 30 min, pesados e conservados a -20°C. Quando necessários, eram fragmentados por passagem através de uma agulha, misturados com o volume de dH_2O necessário para obter uma conc. final de agarose de 1% e incubados em banho-maria a 65-70°C até a agarose liquidificar. A solução era imediatamente emulsionada com 1 vol. de adjuvante de Freund e utilizada directamente para a imunização de coelhos.

3.6. Imunização de animais e obtenção de antissoros

A imunização de coelhos foi efectuada essencialmente como descrito por Werner & Sebald (1981). Quando a técnica de SDS/AGE era utilizada, os pedaços de gel de agarose contendo proteínas eram injectados directamente, como referido acima. Soluções contendo 200-500 mg de proteína eram emulsionadas com volumes iguais de adjuvante de Freund (era utilizado adjuvante de Freund completo nas duas primeiras imunizações e incompleto nas seguintes). Com intervalos de 10-14 dias, injecções subcutâneas das emulsões eram efectuadas em vários locais do dorso dos animais. Uma semana após a segunda e cada injecção subsequente, uma pequena amostra de sangue era retirada e testada para a produção de anticorpos, utilizando a técnica de imunodifusão dupla (v. ponto seguinte).

O sangue dos coelhos era colhido por punção de uma veia da parte posterior da orelha e colocado em tubos de vidro durante 2 h à temperatura ambiente, para coagular.

Seguidamente, era colocado 2 h a 4°C e centrifugado a 3000 x g a 4°C durante 10 min. O soro era decantado para tubos de rotor Sorvall SS-34, centrifugado a 12000 x g durante 15 min para eliminar células residuais e conservado a -20°C.

3.7. Teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony (ref. Werner & Sebald, 1981)

Inicialmente, soluções de 1% agar em 50 mM tampão barbital sódico pH 8.3 eram autoclavadas e conservadas a 4°C em tubos de ensaio. Quando necessário, o agar era aquecido em banho-maria a 60-70°C, uma solução de 20% Triton X-100 era adicionada para obter uma concentração final de detergente de 1% e, em seguida, a mistura era plaqueada em lâminas de microscópio (2.3 ml por lâmina de 76 x 26 mm). Após solidificação do agar, cilindros de 5-7 mm eram recortados e aspirados com o auxílio de uma pipeta Pasteur ligada a um sistema de vácuo. Nos espaços livres eram colocados 20 µl dos antissoros e 5 µl dos antigénios a testar (em buracos com diâmetros de 6 e 3 mm, respectivamente). As lâminas eram colocadas em posição horizontal durante a noite numa câmara humidificada, o que normalmente era suficiente para a observação de linhas ténues de precipitação. Para uma melhor visualização, as lâminas eram imersas durante 1-2 dias numa solução 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, para remover proteínas solúveis e, seguidamente, tratadas com azul de Coomassie.

3.8. Marcação radioactiva "pulse-chase" de células de N. crassa (refs. Werner, 1974; Werner & Sebald, 1981)

Numa experiência típica, 15 mCi de [^{3}H]leucina eram adicionados a um litro de cultura de N. crassa em

crescimento exponencial (cerca de 4 g de células). Um excesso de leucina não marcada (conc. final de 10 mM) era adicionada, após 1 min, para parar a incorporação do aminoácido radioactivo em proteínas. A intervalos de tempo diferentes, após a adição de [^{3}H]leucina, aliquotas de 100-200 ml eram retiradas da cultura, as células recolhidas por rápida filtração e imediatamente congeladas em azoto líquido.

3.9. Electroforese de proteínas (SDS/PAGE), sua transferência para papel de nitrocelulose e decoração imunológica

O sistema de Laemmli (1970) foi utilizado para a separação electroforética de proteínas em géis de 17.5% acrilamida (1:150 bisacrilamida), como anteriormente descrito (Videira, 1986). As proteínas eram transferidas electroforeticamente durante a noite para filtros de nitrocelulose numa solução contendo 20 mM Tris, 150 mM glicina, 20% metanol (Towbin et al., 1979; Gershoni & Palade, 1983; Videira, 1986). Para a visualização de proteínas as membranas eram coradas com Ponceau S, ou com partículas coloidais de ouro quando era necessária uma maior sensibilidade (Hunter & Hunter, 1987).

Para a decoração imunológica de proteínas, as membranas de nitrocelulose eram imersas em tampão TNB (20 mM Tris/HCl pH 8.2, 0.9% NaCl, 0.1% BSA) contendo 5% BSA, durante 30 min a 37°C, de maneira a bloquear os locais livres dos filtros. Após 3 lavagens de 5 min cada em TNB à temperatura ambiente, as membranas eram incubadas durante 90 min numa solução de antissoro, diluído 1:1000 em tampão TNB (era também incluído 0.01 vol. de soro de cabra quando se pretendia utilizar um segundo anticorpo, v. abaixo). Os filtros eram lavados 3 vezes durante 5 min em TNB e, seguidamente, incubados

durante 120 min em tampão TNB contendo uma diluição de 1:20 de gelatina e uma diluição de 1:100 de proteína A ou de anticorpos de cabra contra imunoglobulinas totais de coelho (a proteína A e os anticorpos utilizados estavam marcados com partículas coloidais de ouro). Após 2 lavagens de 5 min cada em TNB e 2 lavagens de 1 min em dH_2O, as membranas de nitrocelulose eram incubadas numa solução de prata intensificadora (IntenSE II) até à visualização dos complexos antigénio/anticorpo (10-20 min). Seguidamente, eram lavadas repetidamente em dH_2O e secas ao ar.

3.10. Técnicas de imunoprecipitação e de análise e quantificação dos precipitados (refs. Werner, 1977; Werner & Sebald, 1981; Zauner et al., 1985; Videira, 1986)

Todas as operações eram efectuadas a 0-4°C, excepto quando especificado.

Para precipitar o complexo I, 1 mg de proteínas mitocondriais era incubado durante 5 min em 1 ml de 100 mM tampão fosfato de sódio pH 8.0 contendo 1-1.5% Triton X-100 e 0.1 mM PMSF. A mistura era centrifugada a 48000 x g durante 20-30 min, para eliminar material não solubilizado. O sobrenadante era misturado em tubos Eppendorf com 0.4 ml de antissoro contra o complexo I e incubado durante a noite ou, alternativamente, misturado com 30 µl de um antissoro específico contra uma subunidade do complexo I (designado AS-22a) e incubado durante 60 min. No primeiro caso, os imunoprecipitados eram recolhidos por centrifugação directa de 2 min; no segundo caso, os precipitados eram incubados durante 60 min com 0.15 ml de tampão fosfato de sódio pH 8.0 contendo 62.5 mg de proteína A-Sepharose/ml e recolhidos por centrifugação de 1.25 min. Os imunoprecipitados eram lavados cinco vezes com tampão fosfato de sódio pH 8.0 contendo 0.5% Triton X-100, duas vezes com tampão fosfato de sódio pH 8.0,

e solubilizados em 2.5% SDS durante a noite à temperatura ambiente.

Para isolar subunidades específicas do complexo I, 1 mg de proteínas mitocondriais era incubado durante 5 min em Ø.1 ml de 1ØØ mM tampão fosfato de sódio pH 8.Ø contendo 1% SDS. Seguidamente, eram adicionados Ø.9 ml de 1ØØ mM tampão fosfato de sódio pH 8.Ø contendo Ø.5% colato e Ø.5% desoxicolato e 1Ø µl de 1Ø mM PMSF, e a mistura era centrifugada a 48ØØØ x g durante 2Ø-3Ø min. O sobrenadante era incubado durante 6Ø min em tubos Eppendorf com 5-3Ø µl do antissoro relevante, e com 5Ø-25Ø µl de tampão fosfato de sódio pH 8.Ø contendo 62.5 mg de proteína A-Sepharose/ml durante mais 6Ø min. Os imunoprecipitados eram recolhidos por centrifugação de 1.25 min, lavados cinco vezes com tampão fosfato de sódio pH 8.Ø contendo Ø.1% SDS, Ø.5% colato e Ø.5% desoxicolato, duas vezes com tampão fosfato de sódio pH 8.Ø, e solubilizados em 2.5% SDS durante a noite à temperatura ambiente. O mesmo procedimento era utilizado com cerca de 2Ø µl de lisados de reticulócitos, para imunoprecipitar precursores de subunidades do complexo I sintetizadas in vitro.

Os imunoprecipitados eram analizados por SDS/PAGE, como descrito acima. Para obter uma melhor separação das subunidades do complexo I, géis de 22 cm de comprimento (em vez de 12 cm) eram utilizados. Os géis eram expostos a filmes de raios-X. A quantificação de radioactividade era feita por análise densitométrica dos filmes. Cada gel era exposto pelo menos duas vezes para garantir que a exposição analizada estava dentro da resposta linear do filme.

3.11. Clonagem molecular (refs. Grunstein & Hogness, 1975; Benton & Davis, 1977; Maniatis et al., 1982; Young & Davis, 1983a, 1983b; Amersham, 1987)

Um banco de expressão de cDNAs de N. crassa, previamente fraccionados por tamanho e inseridos no local de restricção Eco RI do fago lambda gt11, foi obtido do Dr. H. Schneider.

Para rastreio do banco com anticorpos, fagos contendo inserções de cDNA de 300-900 bp eram misturados com bactérias E. coli Y1090, previamente crescidas em meio LB (1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 0.625% NaCl) contendo 0.2% maltose e 50 µg de ampicilina /ml, durante 20 min a 37°C com ligeira agitação. Meio TSA (1% triptona, 0.625% extrato de levedura, 0.625% NaCl, 0.25% $MgSO_4.7H_2O$, 5% agarose) era adicionado e a mistura plaqueada. As placas de Petri eram incubadas a 42°C até ao aparecimento de placas fágicas (cerca de 3 h), cobertas com filtros de nitrocelulose previamente imersos numa solução de 10 mM IPTG e secos ao ar, e transferidas para uma temperatura de 37°C durante 3 h. Os filtros eram marcados, retirados e lavados três vezes durante 10 min numa solução de TBS (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.9% NaCl) contendo 0.5% gelatina e 0.1% Triton X-100. Em seguida, eram incubados durante a noite à temperatura ambiente naquela solução contendo o antissoro relevante, diluído 1:500. (Os antissoros eram previamente incubados com extratos de proteínas de E. coli, para evitar reacções imunológicas cruzadas). A detecção dos complexos antigénio/anticorpo era feita utilizando a enzima peroxidase ligada a anticorpos de carneiro contra imunoglobulinas G de coelho. Zonas de agar contendo placas fágicas positivas eram retiradas para meio SM (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.58% NaCl, 0.2% $MgSO_4.7H_2O$, 0.1% gelatina). O procedimento era repetido até obter placas fágicas isoladas.

Para obter inserções de cDNA completas, fagos contendo inserções de cDNA entre 300-900 bp e 900-1500 bp eram misturados (na proporção de 1:1), plaqueados juntamente com bactérias como descrito acima e incubados a 42°C até ao aparecimento de placas fágicas. Estas eram cobertas com membranas de nylon. As membranas eram retiradas 1 min depois e colocadas (placas fágicas para cima) durante 5 min em papel de filtro saturado com uma solução desnaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) e durante 5 min em papel de filtro previamente embebido numa solução neutralizante (3 M acetato de sódio pH 5.5). Seguidamente, os filtros eram secos ao ar durante 30 min e colocados numa estufa a 80°C durante 60 min. O DNA das membranas era hibridado com sondas radioactivas (inserções de cDNA previamente obtidas por rastreio do banco com anticorpos). A detecção de clones positivos era feita por exposição a filmes de raios-X das membranas de nylon secas.

3.12. Preparação e indução de lisogénios

Os procedimentos foram adaptados de métodos descritos (Young & Davis, 1983a, 1983b; Maniatis et al., 1982; Berger & Kimmel, 1987). Células de E. coli Y1089, crescidas durante a noite em meio LB, eram incubadas com um excesso de fagos recombinantes a 32°C durante 30 min, plaqueadas, e crescidas durante a noite a 32°C para a formação de colónias. Algumas colónias eram seleccionadas e incubadas simultaneamente a 32°C e a 42°C. As bactérias apresentando pouco ou nenhum crescimento a 42°C (lisogenizadas, mais de 50%) eram conservadas.

Para indução da expressão das proteínas de fusão, uma cultura saturada de lisogénios em meio LB era diluída 1:20 com meio fresco e incubada durante 90 min a 32°C e durante 15 min a 42°C. IPTG era adicionado à cultura (conc. final de

5 mM) e a incubação prosseguia durante 60 min a 37°C.

Para a preparação de lisados de proteínas, as células bacterianas eram obtidas por centrifugação das culturas, suspendidas em 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2% SDS, 5% mercaptoetanol (3-5% do volume original), congeladas e descongeladas, sonicadas durante 6 min, novamente congeladas e descongeladas, e centrifugadas a 50000 x g. O sobrenadante era conservado a -20°C.

3.13. Purificação de anticorpos por afinidade

As proteínas de lisados de bactérias lisogenizadas eram separadas por SDS/PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e coradas com Ponceau S. Por comparação dos padrões obtidos com lisogénios induzidos e não-induzidos, as bandas contendo as proteínas de fusão eram identificadas e excisadas. Os pedaços de membrana relevantes eram incubados em tampão TN (20 mM Tris/HCl pH 8.2, 0.9% NaCl) contendo 5% BSA durante 60 min a 37°C e, depois, três vezes durante 5 min em tampão TN contendo 0.1% BSA à temperatura ambiente. Seguidamente, os filtros eram incubados à temperatura ambiente durante 3-4 h numa diluição de 1:20 de antissoro em tampão TN contendo 0.1% BSA. Após lavagem durante pelo menos 1 h com várias mudanças de tampão, as imunoglobulinas eram eluídas por imersão das membranas em 1 ml de 0.2 M glicina/HCl pH 2.3. As membranas eram removidas passados 1.5 min e a solução neutralizada pela adição de 0.15 ml de 2 M Tris (adaptado de Johnson et al., 1985). Esta solução era depois diluída 1:15 e utilizada para a decoração imunológica de subunidades do complexo I e das proteínas de fusão expressas pelos lisogénios ("retroblots").

3.14. Purificação de DNA fágico (ref. Maniatis et al., 1982)

Cerca de 1/5 de uma placa fágica era incubado com 100 µl de uma cultura saturada de E. coli Y1088, durante 20 min a 37°C com ligeira agitação. Eram adicionados 4 ml de meio NZCYM (10 g de N-Z-Amin, 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levedura e 2 g de $MgSO_4.7H_2O$ por litro de dH_2O) e a cultura era incubada a 37°C com agitação, durante a noite ou até haver lise bem visível de células. Eram adicionados 100 µl de clorofórmio e a incubação prosseguia por mais 10-15 min. Após centrifugação a 8000 x g, a 4°C durante 10 min, o sobrenadante era tratado com RNase A e DNase I (conc. final de 1 µg/ml cada) durante 60 min a 37°C, misturado com 4.1 ml de meio SM contendo 20% PEG 6000 e 2 M NaCl, e colocado em gelo durante 60 min. Após centrifugação a 11000 x g, a 4°C durante 30 min, os fagos (sedimento) eram ressuspendidos em 0.5 ml de meio SM e transferidos para tubos Eppendorf. Estes eram centrifugados 2 min, o sobrenadante transferido para novos tubos, misturado com 5 µl de 10% SDS e 5 µl de 5 M EDTA pH 8.0 e colocado a 68°C durante 15 min. Seguia-se uma extracção com fenol, duas com clorofórmio e uma precipitação com etanol. O sedimento era lavado uma vez com 70% etanol, apenas ligeiramente seco e ressuspendido em 60 µl de dH_2O. O DNA era cortado com EcoR1 para excisão da inserção de cDNA, e analizado por PAGE (Maniatis et al., 1975) juntamente com plasmídeo pBR322 cortado com enzimas de restricção (Sutcliffe, 1978), para estimar o tamanho da inserção.

3.15. Subclonagem de inserções de cDNA em plasmídeos

O vector, digerido com a(s) enzima(s) de restricção relevante(s) e tratado com fosfatase alcalina (Maniatis et al., 1982), era directamente misturado com DNA de fagos recombinantes digerido com a(s) mesma(s) enzima(s) de

restricção. A mistura era incubada durante a noite a 4°C em tampão de ligação contendo 1 mM ATP e DNA ligase T4 e, seguidamente, utilizada para a transformação de células bacterianas.

3.16. Isolamento de DNA plasmídico (refs. Birnboim & Doly, 1979; Maniatis et al., 1982):

a) em pequena escala

Uma cultura saturada de E. coli, em 3-5 ml de meio LB contendo 50 µg de ampicilina/ml, era centrifugada a 4000 rpm (centrífuga Bactifuge) durante 10 min. As células eram ressuspendidas com o auxílio de um Vortex, em 100 µl de uma solução (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 20 mM CDTA pH 8.0, 100 mM glicose) previamente arrefecida em gelo, e colocadas em tubos Eppendorf à temperatura ambiente durante 5 min. 200 µl de outra solução (200 mM NaOH, 1% SDS) eram cuidadosamente misturados e os tubos colocados em gelo durante 5 min. 150 µl de 3 M acetato de potássio pH 4.8 eram então cuidadosamente misturados. Passados 5 min, os tubos eram centrifugados durante 10 min. O sobrenadante era tratado com 6 µl de uma solução de RNase A (2 mg/ml), 20-30 min a 37°C, e depois extraído com fenol/clorofórmio (1:1). 2.5 vol. de etanol eram adicionados, os tubos colocados a -80°C durante 10 min e centrifugados durante 20 min. O sedimento (bem visível) era lavado uma vez com 70 % etanol, seco e dissolvido em 16 µl de dH_2O. A solução era bem misturada com 4 µl de 4 M NaCl e 20 µl de 13 % PEG 8000, colocada 20 min em gelo e centrifugada durante 20 min a 4°C. O sedimento era lavado uma vez com 70 % etanol, seco e dissolvido em 15-25 µl de dH_2O. O DNA assim obtido podia ser eficientemente utilizado em diversas reacções, como sequenciação, marcação radioactiva, corte com enzimas de restricção, etc..

Como alternativa, DNA plasmídico era obtido em pequena (até 5 μg) ou média escala (15-20 μg) utilizando "Qiagen-tips" (Diagen, 1988).

Para sequenciação, o DNA era desnaturado por tratamento com 200 mM NaOH, 0.2 mM EDTA durante 5 min à temperatura ambiente, precipitado pela adição de 0.1 vol. de 2 M acetato de amónia pH 4.8 e 2 vol. de etanol, lavado uma vez com 70 % etanol e seco em vácuo.

b) em larga escala

As células bacterianas eram crescidas até à saturação de 800 ml de meio selectivo (LB + antibiótico). A cultura era centrifugada a 4000 x g durante 10 min a 4°C, as células ressuspendidas em 10 ml de 50 mM Tris/HCl pH 8.0, misturadas com 10 ml de uma solução contendo 20 mM CDTA pH 8.0, 200 mM glicose, 0.4% lisozima, e colocadas em gelo durante 30 min. Seguidamente, eram adicionados 40 ml de 1% SDS, 0.2 N NaOH e, 5 min depois, 30 ml de 3 M acetato de potássio pH 4.8. Após incubação por mais 10 min, a mistura era centrifugada a 10000 x g durante 10 min. O sobrenadante era filtrado por lenços de papel e o DNA precipitado à temperatura ambiente pela adição de 60 ml de isopropanol. A mistura era centrifugada a 10000 x g durante 10 min, o sedimento ressuspendido em 8 ml de 200 mM Tris/HCl pH 9.0, 0.5 mM EDTA pH 9.0, 10 mM NaCl, e misturado com 1 ml de uma solução de brometo de etídio (5 mg/ml). Por cada ml de solução, 1 g de cloreto de césio era depois adicionado e dissolvido. A mistura era centrifugada a 27000 x g durante 20 min a 15°C e, seguidamente, o sobrenadante centrifugado a 40000 rpm em rotor Beckman Ti-50, durante cerca de 40 h a 18°C. A banda contendo DNA plasmídico era identificada com auxílio de luz ultravioleta e retirada por punção do tubo com uma agulha. O DNA era precipitado durante a noite a -20°C após adição de 8 vol. de etanol. A mistura era colocada à temperatura

ambiente para redissolver outro material precipitado e centrifugada a 27ØØØ x g durante 2Ø min. O sedimento era seco em vácuo e ressuspendido em Ø.5 ml de 1Ø mM Tris/HCl pH 8.Ø, Ø.5 mM EDTA pH 8.Ø, 1Ø mM NaCl. A mistura era tratada uma vez com fenol e uma vez com clorofórmio. O DNA era precipitado pela adição de Ø.Ø5 vol. de 4 M NaCl e 2.5 vol. de etanol, lavado com 7Ø% etanol, seco em vácuo, ressuspendido em Ø.1 ml de 1Ø mM Tris/HCl pH 8.Ø, Ø.5 mM EDTA pH 8.Ø, 1Ø mM NaCl e conservado a 4°C. Um espectro de absorção entre 23Ø e 29Ø nm era determinado para avaliar da pureza do DNA. Era estimada a quantidade obtida deste ácido nucleico, assumindo que $A_{26Ø}$ = 1 equivale a uma concentração de 5Ø µg/ml de DNA.

3.17. Transformação de células bacterianas (ref. Hanahan, 1983)

Uma cultura saturada de E. coli DH1 era diluída (1:1ØØ) em meio SOB/Mg^{2+} (2% triptona, Ø.5% extrato de levedura, 1Ø mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2Ø mM $MgSO_4$, 2Ø mM $MgCl_2$) e novamente crescida a 37°C com agitação até atingir uma $A_{55Ø}$ de Ø.5. 1ØØ ml de cultura eram colocados em gelo durante 1Ø-15 min. As células eram centrifugadas a 8ØØ x g durante 12 min, ressuspendidas em 33 ml (1/3 do volume inicial) de meio TFB (1Ø mM ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (Mes)/KOH pH 6.3, 1ØØ mM RbCl, 45 mM $MnCl_2$, 1Ø mM $CaCl_2$, 3 mM cloreto de hexaminocobalto [III]), colocadas em gelo durante 1Ø-15 min, novamente centrifugadas, ressuspendidas em 2 ml de meio TFB e colocadas em gelo. Eram adicionados 7Ø µl de DMSO, 7Ø µl de 2.25 M DTT passados 5 min e 7Ø µl de DMSO passados mais 1Ø min. 5 min após a última adição, as células eram divididas em aliquotas de 2ØØ µl, misturadas com soluções contendo DNA (normalmente 1Ø µl) e colocadas em gelo durante 3Ø min. Depois, eram colocadas em banho-maria a 42°C durante

1.5 min, em gelo durante 1-2 min, misturadas com Ø.8 ml de meio SOB/Mg^{2+}, crescidas a 37°C durante 1 h e plaqueadas em meio selectivo apropriado (Ø.1 ml/placa de Petri de ø = 93 mm).

3.18. Transcrição/tradução *in vitro* em sistemas heterólogos (refs. Pelham & Jackson, 1976; Maniatis *et al.*, 1982; Melton *et al.*, 1984; Kleene *et al.*, 1987; Stuart *et al.*, 1987)

Para transcrição, era inicialmente preparada uma solução (4Ø mM Hepes/KOH pH 7.4, 6 mM acetato de magnésio, 2 mM espermidina, 1Ø mM DTT, Ø.5 mM rNTP, Ø.1 mM rG) que era aliquotada e conservada a -8Ø°C. Uma mistura de transcrição de 5Ø µl continha 3Ø µl desta solução, cerca de 1 µg de DNA plasmídico, 2.5 µl de 5 mM 7mG(5´)ppp(5´)G, 1.5 µl de 3Ø U/µl RNasin, 1.Ø µl de 2Ø U/µl RNA polimerase SP6. Esta mistura era incubada em banho-maria a 4Ø°C durante 45 min e imediatamente utilizada num sistema de tradução em lisados de reticulócitos de coelho (alternativamente, o RNA era precipitado com etanol, seco em vácuo, dissolvido em dH_2O e só então utilizado).

Os lisados de reticulócitos, preparados a partir de coelhos anémicos (Pelham & Jackson, 1976) eram obtidos do Dr. F.-U. Hartl. Ø.4 ml de lisados de reticulócitos eram tratados com 5 µl de nuclease de *Staphylococcus aureus* (solução de 1 mg/ml) na presença de 5 µl de Ø.1 M $CaCl_2$ e de 12.5 µl de 1 mM hemina. Após incubação a 3Ø°C durante 15 min, a nuclease era inactivada pela adição de 5Ø µl de Ø.1 M EGTA. Os lisados de reticulócitos tratados desta maneira eram, por vezes, congelados em azoto líquido e conservados a -8Ø°C. Uma mistura de tradução de Ø.25 ml continha normalmente 1ØØ µl de lisados de reticulócitos activados, 1Ø µl de uma mistura de todos os aminoácidos com excepção da metionina (as formas L dos aminoácidos numa conc. de Ø.5-3

mM cada), 25 µl de [^{35}S]metionina, 8Ø mM KCl/$MgCl_2$, 8 mM de fosfato de creatina, 12.5 µg de creatina cinase, 1Ø U de RNasin, e 25 µl de mistura de transcrição (ou cerca de Ø.1 µg de RNA poli(A)). Após incubação a 3Ø°C durante 6Ø min, a mistura era centrifugada a 1ØØØØ x g durante 6Ø min. O sobrenadante pós-ribossomal era misturado com metionina não marcada radioactivamente (conc. final 2ØØ mM) e 42.5 µl de 1.5 M sacarose, rapidamente congelado em azoto líquido e conservado a -2Ø°C.

3.19. Importação de proteínas por mitocôndrias isoladas de N. crassa (ref. Pfanner & Neupert, 1985)

As mitocôndrias eram isoladas na presença de meio SEM (Ø.25 M sacarose, 1 mM EDTA, 1Ø mM ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS)/KOH pH 7.2) contendo Ø.2 mM PMSF. Uma reacção de Ø.1 ml, de importação de proteínas por mitocôndrias, continha 2Ø-25 µl de lisados de reticulócitos com os precursores proteicos marcados radioactivamente, 6Ø-7Ø µl de tampão (1Ø mM MOPS/KOH pH 7.2, 25Ø mM sacarose, 8Ø mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM NADH, 3% BSA) e mitocôndrias (equivalentes a 3Ø µg de proteínas mitocondriais). Quando indicado, era adicionada valinomicina (conc. final 1 µM) para dissipar o potencial de membrana. A mistura era incubada a 25°C durante 3Ø min, centrifugada a 4°C a 12ØØ rpm durante 12 min (em rotor Sorvall SS-34 com adaptadores para tubos Eppendorf), as mitocôndrias ressuspendidas em Ø.1 ml de tampão SEM e divididas em 2 porções iguais. A uma delas era adicionada proteinase K para uma conc. final de 1Ø µg/ml, e as duas aliquotas eram incubadas a Ø°C durante 3Ø min. Após adição de PMSF (conc. final 2 mM), a incubação prosseguia por mais 5 min. As mitocôndrias eram recolhidas por centrifugação a 15ØØ rpm durante 1Ø min, solubilizadas com 2.5% SDS, 5% mercaptoetanol e analisadas por SDS/PAGE.

3.2Ø. Electroforese de ácidos nucleicos e sua transferência para membranas de nylon (Southern, 1975; Maniatis et al., 1982; Tropschug et al., 1988)

RNA poli(A) de N. crassa (Kleene et al., 1987; Stuart et al., 1987) foi obtido do Dr. M. Tropschug. Pouco antes da electroforese, cerca de 1Ø µg de RNA eram misturados com 11 µl de tampão (14 µl de Ø.2 M fosfato de sódio pH 7.Ø, 13Ø µl de glicerina contendo 1% de azul de bromofenol, 225 µl de formaldeído, 621 µl de formamida), incubados a 65°C durante 5 min e colocados em gelo. A separação do RNA era feita em géis de 1.6% agarose contendo 1Ø mM fosfato de sódio pH 7.Ø, e 1.1 M formaldeído. O tampão de electroforese era 1Ø mM fosfato de sódio pH 7.Ø, Ø.5 M formaldeído. A electroforese era corrida a 7-8 V/cm até o azul de bromofenol ter migrado cerca de 2/3 do tamanho do gel.

DNA digerido com enzimas de restricção era misturado com Ø.2 vol. de uma solução (15% Ficoll, Ø.Ø5% azul de bromofenol, Ø.Ø5% xilenocianol, Ø.5% SDS) e separado em géis de 1% agarose em tampão TAE (Ø.4 M Tris, 5Ø mM acetato de sódio, 1Ø mM EDTA, pH 7.6) contendo 5Ø µg de brometo de etídio/ml. Para desnaturar o DNA, o gel era imerso durante 6Ø min numa solução de 1.5 M NaCl, Ø.5 M NaOH. Seguidamente, era passado por dH_2O e colocado durante 6Ø min numa solução neutralizante de 1 M Tris/HCl pH 8.Ø, 1.5 M NaCl.

Ambos os tipos de ácidos nucleicos eram transferidos por difusão durante a noite para membranas de nylon em 1Ø x SSC (SSC é 15 mM citrato de sódio/HCl pH 7.Ø, 15Ø mM NaCl). As membranas eram colocadas em papel de filtro humedecido e expostas a raios ultravioleta para imobilizar os ácidos nucleicos.

3.21. Marcação radioactiva de DNA

O DNA foi marcado com [^{32}P]dATP e/ou [^{32}P]dCTP por "nick-translation", essencialmente como descrito (Rigby et al., 1977). A separação de DNA marcado dos nucleótidos radioactivos não incorporados era feita por cromatografia em Sephadex G-5Ø após extração com fenol/clorofórmio ou, alternativamente, utilizando "Qiagen-tips".

3.22. Hibridação (refs. Southern, 1975; Maniatis et al., 1982; Tropschug et al., 1988)

Membranas de nylon contendo ácidos nucleicos eram colocadas durante 3Ø min a 65°C numa solução de 2 x SSC, Ø.1% SDS, 1 x sol. de Denhardt (v. Maniatis et al., 1982). Os filtros eram depois transferidos para uma solução semelhante contendo 1 µg/ml de poli(A) e Ø.1 mg/ml de DNA de esperma de salmão, previamente colocado durante 3 min a 95°C e 3 min em gelo, e incubados a 65°C durante pelo menos 12Ø min. A sonda radioactiva, previamente colocada durante 3 min a 95°C e 3 min em gelo, era adicionada e a incubação prosseguia durante a noite a 65°C. As membranas eram lavadas à temperatura ambiente duas vezes durante 5 min numa solução de 2 x SSC, Ø.1% SDS, 1 x sol. de Denhardt, duas vezes durante 5 min em 2 x SSC contendo Ø.1% SDS e duas vezes durante 5 min em 2 x SSC. Por último, eram lavadas duas vezes durante 1Ø min a 65°C em Ø.2 x SSC, secas ao ar e expostas a filmes de raios-X.

3.23. Encurtamento de segmentos de DNA para sequenciação (ref. Henikoff, 1984)

Cerca de 1Ø µg de plasmídeo contendo a inserção de DNA

relevante eram completamente digeridos com duas enzimas de restricção apropriadas, precipitado com etanol, lavado com 70% etanol, seco, ressuspendido em 66 mM Tris/HCl pH 8.Ø, Ø.66 M $MgCl_2$ (2ØØ µg DNA/ml) e incubado com Ø.1 vol. de exonuclease III (67ØØØ U/ml) a 37°C. Com intervalos de 2Ø-3Ø s, aliquotas eram retiradas, misturadas com 3 vol. de Ø.2 N NaCl, 5 mM EDTA pH 8.Ø e aquecidas a 7Ø°C durante 1Ø min para inactivar a enzima. O DNA de cada aliquota era separadamente precipitado pela adição de 3 vol. de etanol, lavado uma vez, ressuspendido em 5Ø µl de Ø.25 M NaCl, 3Ø mM acetato de potássio pH 4.6, 1 mM $ZnSO_4$, 5% glicerol, 67 Vogt U de nuclease S1/ml, e incubado à temperatura ambiente durante 3Ø min. 6 µl de Ø.5 M Tris/HCl pH 8.Ø, Ø.125 M EDTA eram adicionados para parar as reacções. Seguidamente, as soluções eram extraídas com fenol/clorofórmio (1:1), o DNA precipitado com 3 vol. de etanol, dissolvido em 1Ø µl de 2Ø mM Tris/HCl pH 8.Ø, 7 mM $MgCl_2$, 1Ø U de fragmento Klenow de DNA polimerase I/ml e incubado a 37°C durante 2 min. 1 µl de uma solução contendo os 4 diferentes dNTPs (conc. Ø.125 mM cada) era adicionado e a reacção prosseguia por mais 2 min. Em seguida, 4Ø µl de tampão ligase contendo 1Ø mM ATP e 25 U de T4 DNA ligase/ml eram adicionados e a mistura incubada a 4°C durante a noite. 2Ø µl desta mistura eram utilizados para transformar 2ØØ µl de células bacterianas.

3.24. Sequenciação de DNA

As sequências de DNA foram determinadas pelo método de terminação de cadeias por incorporação de ddNTPs (Sanger et al., 1977). Para a síntese de cadeias de DNA era utilizada Sequenase, uma polimerase T7 do DNA modificada (Tabor & Richardson, 1987) na presença de [^{35}S]dATP. Sequências de DNA "iniciadoras" SP6 e T7 (e outras, v. secção 3.26) eram utilizadas para a sequenciação de ambas as cadeias dos

plasmídeos desnaturados (Chen & Seeburg, 1985). Quando necessário, dGTP era substituído por dITP para eliminar compressões de bandas no gel (Tabor & Richardson, 1987).

3.25. Preparação de géis de sequenciação

Para um gel de sequenciação (40 cm x 20 cm x 0.4 mm) era preparada uma solução de 100 ml contendo 50 g de uréia, 15 ml de 38% acrilamida/2% bisacrilamida, e 10 ml de 10 x tampão TBE (TBE é 0.89 M Tris/borato, 0.025 M EDTA). Esta solução era filtrada, desgaseificada, misturada com 50 µl de 40% peroxidissulfato de amónia e 100 µl de TEMED e colocada entre duas placas de vidro, previamente bem lavadas (as placas eram regularmente imersas numa solução de 1 N NaOH durante 30 min, numa solução de 1 N HCl durante 15 min, lavadas com água corrente e passadas por dH_2O. Antes de cada electroforese, as placas eram lavadas 2 x com sabão líquido e 2 x com etanol. Uma delas era depois tratada com uma solução de silicone).

A electroforese era corrida a 45 W em tampão TBE. As amostras eram separadas uma vez durante 2 h e uma vez durante 4 h, permitindo a leitura de cerca de 200 nucleótidos. Seguidamente, o gel era imerso em 5% ácido acético durante 30 min, transferido para papel de filtro, seco em vácuo e exposto a filmes de raios-X.

3.26. Purificação de oligonucleótidos para sequenciação de DNA ("primers")

Quatro oligonucleótidos (5'CATTTACATTTCTCCCGCCG; 5'GGGTGTATTCGGCCGCCG; 5'GATTGTCGGCCTTGGACTGG; 5'GCAGGGCAGAGCCAGGGCC) foram obtidos do Genzentrum Muenchen através do Dr. M. Tropschug. Estes iniciadores foram

necessários para a sequenciação total das duas cadeias da inserção de cDNA 606, codificante da subunidade de 31 kDa do complexo I. Os iniciadores foram separados em géis de 16% acrilamida e 1.5 mm de espessura, como descrito para a sequenciação de DNA. As bandas contendo os oligonucleótidos relevantes eram visualizadas com o auxílio de luz ultravioleta e excisadas. O DNA era eluído por electroforese em "Biotrap", precipitado duas vezes pela adição 0.1 vol de 3 M acetato de sódio pH 6.0, 0.01 vol de 1 M $MgCL_2$ e 2.5-3 vol de etanol, seco em vácuo e dissolvido em dH_2O. A concentração dos iniciadores era estimada por espectrofotometria e ajustada a 10 pmol/ml.

3.27. Sequenciação parcial da proteína de 22 kDa (refs. Gross, 1967; Wachter & Werhahn, 1979)

A solução de proteína era dializada extensivamente em tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 0.1% SDS, e liofilizada. O material era ressuspendido em ácido trifluoroacético e centrifugado durante 5 min em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante era transferido para novos tubos e evaporado num excicador na presença de NaOH. A proteína era ressuspendida em 80% ácido fórmico e clivada nos resíduos de metionina por incubação durante a noite à temperatura ambiente com um excesso de brometo de cianogénio. A separação por HPLC ("high performance liquid chromatography") dos fragmentos polipeptídicos resultantes e a sequenciação parcial de um deles foi efectuada pelo Dr. E. Wachter, como descrito (Wachter & Werhahn, 1979).

3.28. Outros métodos

Métodos para o crescimento de células de N. crassa (Davis & de Serres, 1970), sua marcação uniforme com aminoácidos radioactivos e marcação na presenca de inibidores específicos da síntese proteica (Werner & Sebald, 1981), a preparação de mitocôndrias e membranas mitocondriais (Weiss et al., 1970; Werner, 1974) e a quantificação de proteínas pelo método de Lowry, foram descritos mais pormenorizadamente num trabalho anterior (Videira, 1986). Várias técnicas básicas correntemente utilizadas em experiências de biologia molecular, como manuseamento e manutenção de bactérias e vectores, purificação de ácidos nucleicos, incluindo o seu tratamento com solventes orgânicos, precipitação e conservação, preparação de membranas de diálise, etc., foram efectuadas essencialmente como descrito (Maniatis et al., 1982; Berger & Kimmel, 1987).

Os perfis de hidrofobicidade (Hopp & Woods, 1981) e as potencialidades de proteínas para a formação de estruturas secundárias (Robson & Garnier, 1986) foram determinados de acordo com métodos publicados. As sequências de DNA determinadas e as sequências de proteínas deduzidas foram comparadas com as existentes em versões actualizadas de bancos de dados de DNA (MIPSY) e de proteínas (MIPSX e NBRF) do Max-Planck Institut de Munique.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição polipeptídica do complexo I de N. crassa

Para analizar a composição polipeptídica do complexo I, as mitocôndrias de células previamente marcadas com [^{3}H]leucina foram solubilizadas com Triton X-100 e tratadas com antissoro contra holo-complexo I. De maneira a identificar componentes da enzima sintetizados na mitocôndria (Chomyn et al., 1985, 1986; Ise et al., 1985a, 1985b), foram efectuadas experiências paralelas utilizando células marcadas com aquele aminoácido radioactivo após uma pré-incubação de 1.25 min com cicloheximida. O complexo I representa cerca de 1% das proteínas mitocondriais de células de N. crassa em crescimento exponencial, valor estimado a partir da quantidade de radioactividade imunoprecipitada das mitocôndrias. Os imunoprecipitados foram analizados por electroforese e o gel submetido a fluorografia (fig. 6A). Na maior parte dos casos, foram utilizados géis com um comprimento de 22 cm para conseguir uma separação aceitável dos diferentes polipéptidos. Pelo menos 22 bandas eram visíveis nas experiências em que eram utilizadas células marcadas radioactivamente de uma maneira uniforme e um antissoro contra holo-complexo I. O mesmo padrão de proteínas foi essencialmente obtido com AS-22a (fig. 6B), um antissoro específico capaz de co-precipitar holo-complexo I (v. secção seguinte). Estes resultados confirmam que todas as proteínas listadas na tabela 1 são constituintes intrínsecos daquele complexo oligomérico. Pelo menos sete subunidades são de origem mitocondrial, como revelado pelos padrões de marcação radioactiva de polipéptidos resistente à cicloheximida (pistas 2 da fig. 6).

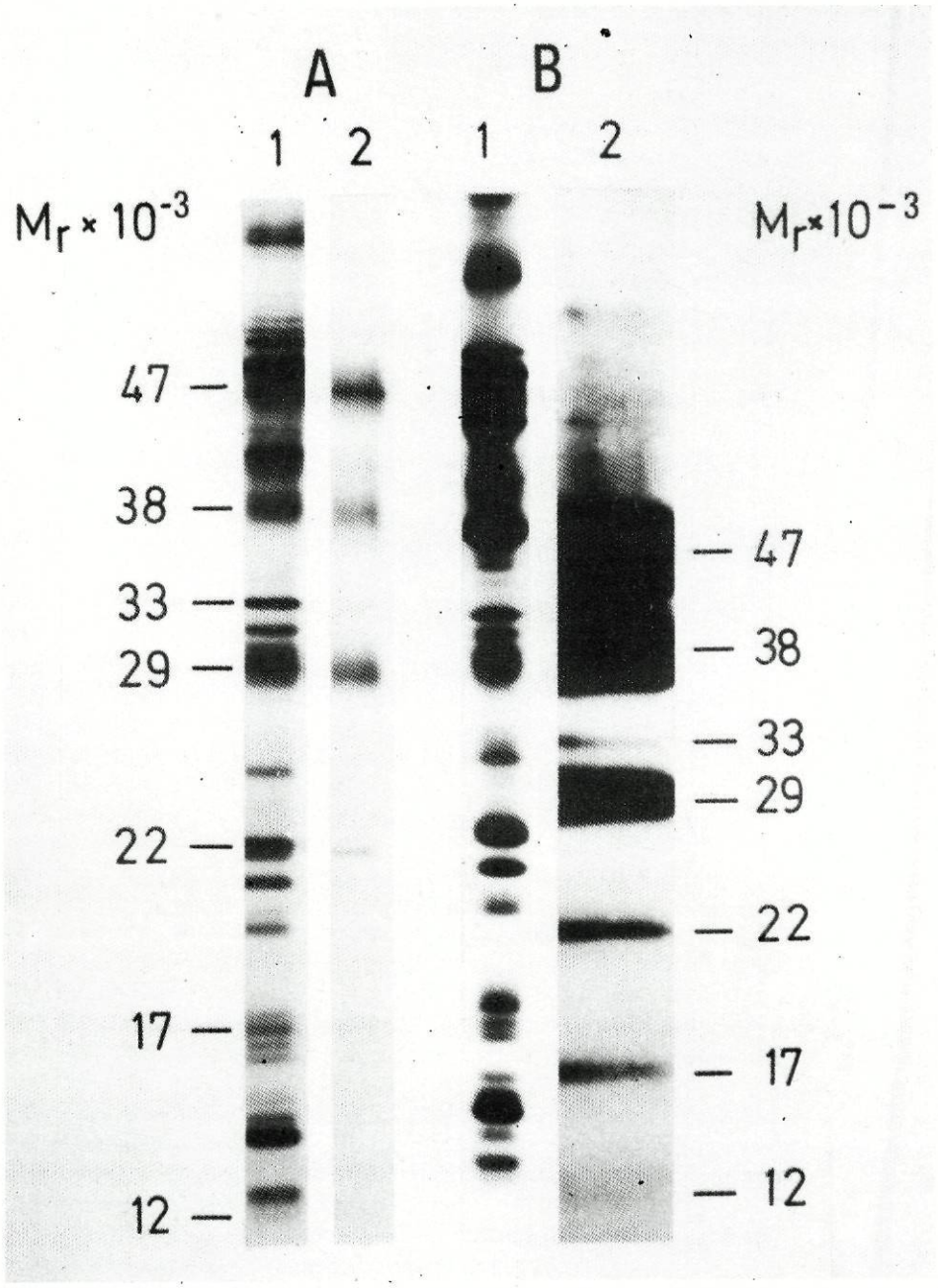


Figura 6. Composição polipeptídica do complexo I de N. crassa.

A) Mitocôndrias isoladas de células marcadas com [^{3}H]leucina foram solubilizadas com Triton X-100 e tratadas com antissoro contra o complexo I. Os imunoprecipitados foram analisados por SDS/PAGE e os géis (de 22 cm) submetidos a fluorografia. As mitocôndrias foram obtidas de células uniformemente marcadas (pista 1) ou de células marcadas após um período de 1.25 min de pré-incubação com cicloheximida (pista 2). As posições e massas moleculares aparentes das sete subunidades sintetizadas na mitocôndria estão indicadas. B) O mesmo que em A, excepto que os imunoprecipitados foram obtidos com AS-22a e a pista 2 mostra um fluorograma de um gel normal de 12 cm.

O padrão de proteínas mostrado nas pistas 1 da fig. 6 é semelhante ao obtido com complexo I isolado e corado com partículas coloidais de ouro (v. fig. 7) ou com azul de Coomassie, e está também em concordância com a composição do complexo I de N. crassa publicada por Ise et al. (1985a). Contudo, foram encontradas algumas diferenças no que diz respeito aos polipéptidos sintetizados na mitocôndria. Obtivemos incorporação de radioactividade resistente à cicloheximida em polipéptidos com massas moleculares aparentes de 12, 17, 22, 29, 33, 38 e 47 kDa (fig. 6, pistas 2). Aqueles autores referem incorporação de radioactividade numa proteína de 7Ø kDa (presumivelmente a nossa proteína de 69 kDa) e nenhuma marcação das proteínas de 12 e 33 kDa. Pequenas diferenças na experimentação podem explicar esta discrepância. No nosso caso, a marcação de células com [^{3}H]leucina comecou com uma pré-incubação de 1.25 min com cicloheximida. Em contraste, eles utilizaram [^{35}S]metionina 2Ø segundos após a adição do inibidor (Ise et al., 1985a). Considerando estes factos, sugerimos que os polipéptidos de 12 e 33 kDa possam não ter sido detectados devido a um baixo conteúdo em metionina (mesmo nas nossas experiências, utilizando um aminoácido mais abundante, os polipéptidos são visualizados como bandas radioactivas pouco intensas). A incorporação de radioactividade na proteína de 69/7Ø kDa pode ser devida a uma inibição incompleta da síntese proteica citoplasmática durante o periodo de pré-incubação com cicloheximida de apenas 2Ø segundos. Por outro lado, não se pode excluir que o polipéptido radioactivo não se tenha associado eficientemente com o complexo I, uma vez que o tamanho das reservas de precursores desta subunidade é grande (v. tabela 1).

Gostaríamos de sublinhar que o produto do gene mitocondrial ND-1 não é a proteína de 37 kDa, como referido por Ise et al. (1985a), mas corresponde ao componente de 29 kDa. Esta conclusão deriva de experiências de decoração

TABELA 1. Massas moleculares aparentes, estequiometria e parâmetros cinéticos dos componentes polipeptídicos do complexo I de N. crassa.

As subunidades sintetizadas na mitocôndria estão marcadas com um asterisco. [a] proteínas não separadas por SDS/PAGE; [b] proteínas parcialmente separadas por SDS/PAGE.

M_r x 10-3 subunidade	estequiometria	$t_{1/2}$ max subunidade	$t_{1/2}$ max precursor	Tamanho armazém precursores (%)
69	1	27	26	20
49	2-3	5.5	4.5	3.5
*47	1-2	6.5	5.5	4.2
43	1	10	9.0	6.9
41	1	8.5	7.5	5.8
40	1	34	33	25
*38	2	6.5	5.5	4.2
33 [a]		-	-	-
*33 [a]	2	-	-	-
31	1	12	11	8.5
29 [b]		6.5	5.5	4.2
*29 [b]	3-4	3.0	2.0	1.5
25	1	7.0	6.0	4.6
*22 [b]		24	23	18
22 [b]	3	26	25	19
21	2	8.5	7.5	5.8
19	1	4.0	3.0	2.3
*17	1	8.0	7.0	5.4
16.5	1	10	9.0	6.9
16	1	15	14	11
14	3-4	16	15	12
12.5	1	34	33	25
*12	1	2.0	1.0	0.8

imunológica com anticorpos específicos (v. fig. 7A, pista 6), e de determinação parcial da sequência amino-terminal do polipéptido, como descrito (Zauner et al., 1985). O material para sequenciação foi obtido por imunoprecipitação do complexo I de mitocôndrias de células marcadas radioactivamente na presença de cicloheximida, resolução da enzima por SDS/PAGE preparativo, excisão da banda radioactiva relevante e obtenção da proteína por difusão. Apesar de ser necessária mais informação sobre a estrutura primária dos outros polipéptidos de origem mitocondrial para os associar a genes conhecidos do DNA da mitocôndria, sugerimos que a proteína de 12 kDa representa o produto codificado pelo gene ND-4L. A massa molecular deste polipéptido é a única consistente com a de uma proteína com 89 resíduos de aminoácidos potencialmente codificada pelo quadro de leitura (Nelson & Macino, 1987). Foi mostrado que o produto do gene humano homólogo pertence ao complexo I neste organismo (Chomyn et al., 1985).

Assumindo que as diferentes subunidades do complexo I têm um conteúdo médio semelhante de leucina, foi estimada a sua estequiometria na enzima (tabela 1). Os valores são preliminares, uma vez que nem o conteúdo em leucina nem as massas moleculares exactas das proteínas são conhecidas, e poderão ter que ser corrigidos quando for conhecida a estrutura primária das proteínas. A banda de 33 kDa contém dois componentes, um de origem mitocondrial e outro de origem nuclear (v. secções 4.2 e 4.6). A estequiometria destas subunidades, assim como a de outras só parcialmente separadas, foi calculada para as bandas compostas. Também não é possível excluir que outras bandas contenham mais do que um polipéptido. Infelizmente, a aplicação de electroforese bidimensional, como no caso do complexo I de corações bovinos (Heron et al., 1979), parece não levar a uma melhor resolução (foram observadas 26 bandas), e uma avaliação quantitativa dos padrões bidimensionais seria

extremamente complicada levando a erros maiores. De qualquer maneira, é possível afirmar que algumas subunidades estão presentes na enzima em mais do que uma cópia por complexo proteico. Somando as massas moleculares aparentes listadas na tabela 1, estimou-se uma massa molecular de cerca de 900 kDa para o complexo I de N. crassa. Este valor está de acordo com dados anteriormente publicados (Ise et al., 1985a).

Considerando a grande quantidade de subunidades polipeptídicas do complexo I, poder-se-á imaginar que outras funções, além das conhecidas (transferência de electrões e translocação de protões), estão associadas com esta unidade membranar. Por exemplo, trabalhos recentes mostrando uma interacção directa entre o complexo I e outros componentes da cadeia respiratória (Ragan & Heron, 1978; Zhu & Beattie, 1988) ou enzimas da matriz mitocondrial (Sumegi & Srere, 1984; Porpaczy et al., 1987) sugerem papéis especiais para pelo menos alguns dos constituintes do complexo I.

4.2. Caracterização de antissoros contra subunidades do complexo I de N. crassa

Para fraccionar o complexo I, vários agentes caotrópicos foram experimentados. A combinação de trifluorometanosulfonato de lítio e hidrocloreto de guanidina foi considerada a melhor para a extração específica de polipéptidos. O procedimento utilizado para o isolamento de subunidades do complexo I (cujo esquema aparece na fig. 5), permitiu a obtenção de sete subunidades individuais com massas moleculares aparentes de 12.5, 14, 21, 22 ,29, 31 e 33 kDa. Foram obtidos antissoros de coelhos contra estas subunidades, que passarão a ser designados pelo termo AS- seguido pelo tamanho aparente (em kDa) da proteína utilizada como antigénio.

A caracterização dos antissoros foi feita por meio de uma técnica de decoração imunológica. Complexo I isolado foi separado por SDS/PAGE, transferido para membranas de nitrocelulose e imunodecorado separadamemte com os diferentes antissoros. A fig. 7A mostra os resultados obtidos. Cinco antissoros (AS-14, AS-22b, AS-29, AS-31 e AS-33) reconhecem especificamente uma subunidade do complexo I, que corresponde à proteína usada para imunização. O AS-12.5 reconhece um componente adicional da enzima com uma massa molecular aparente de 25 kDa. O AS-21 reage fracamente com vários outros polipéptidos. Foram obtidos dois antissoros diferentes contra a proteína de 22 kDa. Um deles (AS-22a) foi obtido por imunização de um coelho com a proteína isolada por cromatografia em Phenyl-Sepharose. Esta preparação foi mais purificada por SDS/AGE e usada para produzir o outro antissoro (AS-22b). O AS-22a reage com o componente de 33 kDa (fig. 7A, pista 4) É interessante verificar que, em contraste com o AS-22b, o AS-22a é capaz de co-precipitar os diferentes constituintes do complexo I a partir de mitocôndrias solubilizadas com Triton X-100 (fig. 6B). Isto sugere que a capacidade do AS-22a para precipitar a holoenzima é devida à sua reacção cruzada com a subunidade de 33 kDa. De facto, o AS-33 também é capaz de co-precipitar os vários polipéptidos do complexo I, indicando que os determinantes antigénicos desta subunidade estão expostos na enzima.

Foram obtidos essencialmente os mesmos resultados quando a decoração imunológica foi efectuada em complexo I isolado por imunoprecipitação ou no conjunto das proteínas mitocondriais, como ilustrado na figura 7B para o AS-31. Verificaram-se duas excepções: tanto o AS-21 como o AS-33 reconheceram uma proteína adicional, com uma massa molecular aparente de 52 kDa, exclusivamente na amostra de mitocôndrias.

Anticorpos contra o produto do gene ND-1 do DNA

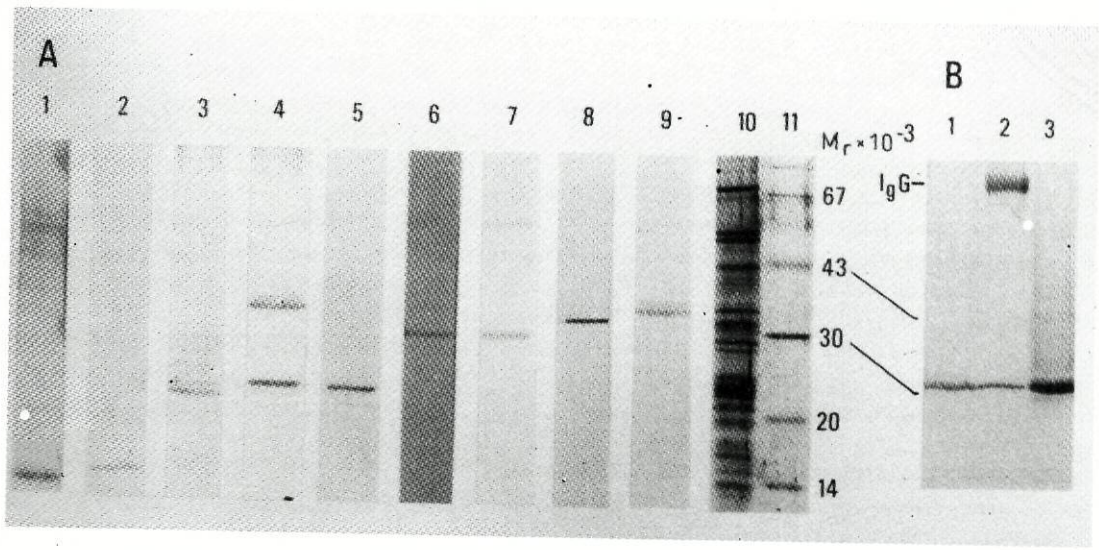


Figura 7. Decoração imunológica com antissoros contra subunidades individuais do complexo I.

A) Complexo I isolado foi separado por SDS/PAGE e transferido para papel de nitrocelulose. As membranas foram depois decoradas imunológicamente com AS-12.5 (1), AS-14 (2), AS-21 (3), AS-22a (4), AS-22b (5), AS-29/ND-1 (6), AS-29 (7), AS-31 (8) e AS-33 (9). 15 µg de complexo I isolado (10) e massas moleculares de referência (11) corados com ouro estão incluídas. B) Proteínas mitocondriais totais (1), complexo I imunoprecipitado (2) e complexo I isolado (3) foram separados por SDS/PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose. A decoração imunológica foi efectuada com AS-31.

mitocondrial (uma proteína de 29 kDa) (Zauner et al., 1985) foram incluídos nestas experiências, já que o análogo humano deste polipéptido pertence ao complexo I (Chomyn et al., 1985). Como esperado, esta proteína é também uma subunidade do complexo I em N. crassa (fig. 7A, pista 6). Apesar de ela co-migrar com um dos polipéptidos isolados (comparar pistas 6 e 7), estamos em presença de espécies diferentes, como demonstrado pela seguinte experiência: mitocôndrias solubilizadas com SDS foram incubadas com cada antissoro. O material precipitado foi separado por electroforese, transferido para papel de nitrocelulose e separadamente tratado com os dois antissoros (fig. 8). Pode-se ver que os antissoros reconhecem polipéptidos diferentes. De facto, foi possível separar parcialmente as duas proteínas por SDS/PAGE utilizando um gel de 22 cm (fig. 6).

Todas as proteínas isoladas neste trabalho parecem ser produtos de genes nucleares. Nenhum dos antissoros consegue precipitar material radioactivo a partir de mitocôndrias de células marcadas na presença de cicloheximida (não mostrado), em contraste com a imunoprecipitação das proteínas radioactivas a partir de mitocôndrias de células marcadas na ausência do inibidor (v. secção 4.6). Outros argumentos provêm do facto destes polipéptidos não co-migrarem com as subunidades do complexo I de origem mitocondrial (assinaladas na fig. 6, pistas 2) e/ou de ser possível sintetizar precursores das proteínas num sistema heterólogo in vitro programado com mRNA contendo poli(A) (v. secção 4.6). Além disso, clones de cDNA codificantes de algumas subunidades foram isolados (v. últimas secções). É possível que as proteínas sintetizadas na mitocôndria (normalmente de carácter mais hidrofóbico) não tenham sido extraídas pelas soluções aquosas aplicadas. De facto, a extracção de produtos de alguns genes ND a partir de mitocôndrias humanas e bovinas envolveu a utilização de solventes orgânicos (Fearnley & Walker, 1987).

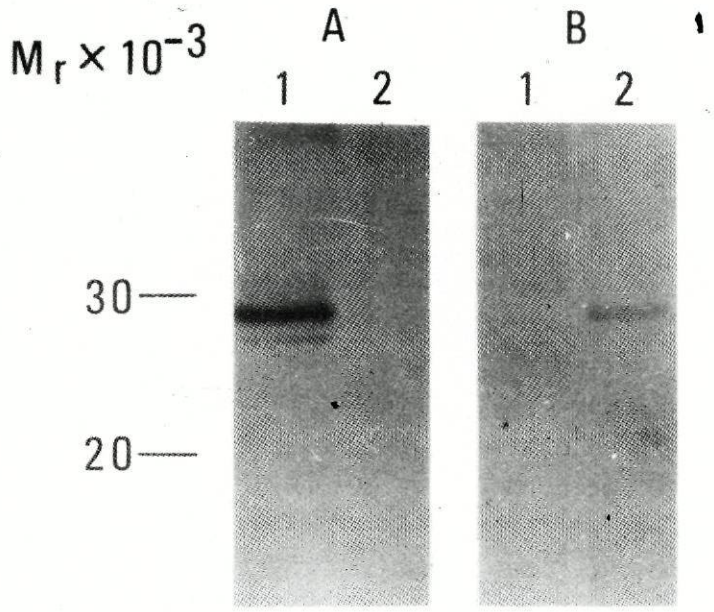


Figura 8. A proteína de 29 kDa isolada e o produto do gene ND-1 de 29 kDa são espécies distintas.

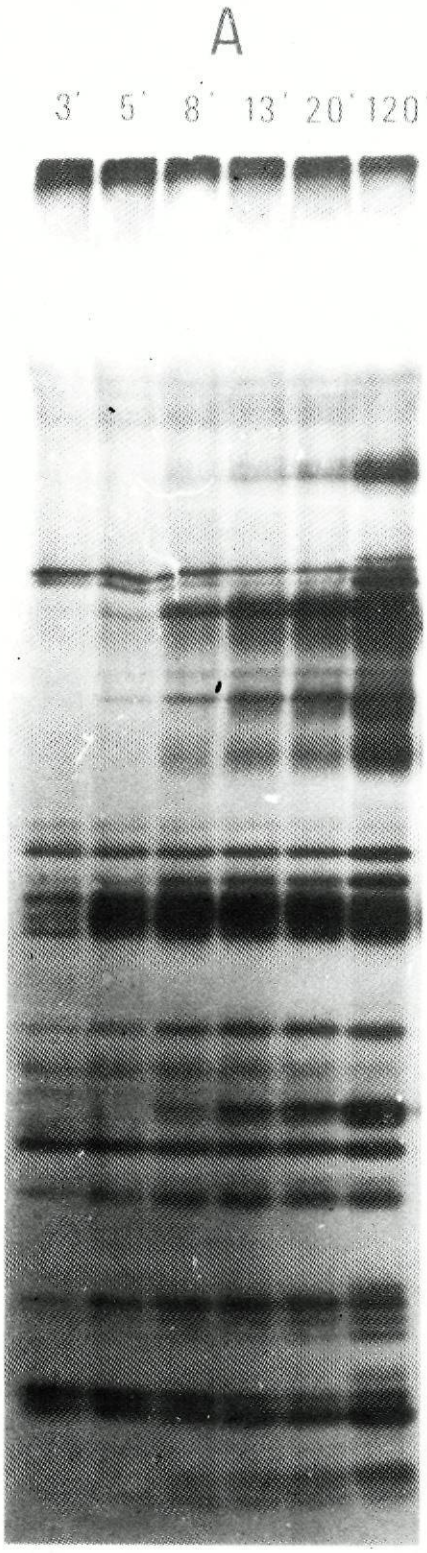
Mitocôndrias foram lisadas com SDS e separadamente incubadas com antissoro contra cada uma das proteínas. Os imunoprecipitados obtidos com AS-29 (1) e com AS-29/ND-1 (2) foram separados por SDS/PAGE e trasferidos para papel de nitrocelulose. A decoração imunológica foi efectuada com AS-29 (A) ou com AS-29/ND-1 (B).

4.3. Cinética de reunião das subunidades do complexo I

A cinética de construcção do complexo I foi estudada com experiências de marcação "pulse-chase": a uma cultura de N. crassa em crescimento exponencial era adicionada [^{3}H]leucina e, 1 min após, o aminoácido não marcado radioactivamente. A diferentes tempos, amostras de células eram retiradas da cultura, e suas mitocôndrias preparadas. Amostras de mitocôndrias, contendo a mesma quantidade de radioactividade, foram solubilizadas em Triton X-100 e

incubadas com antissoro contra o complexo I (ou alternativamente com AS-22a). Este procedimento assegura que a mesma quantidade de proteínas radioactivas está a ser analizada, podendo depois ser discriminada a porção associada em complexo (não ocorre degradação significativa de polipéptidos mitocondriais em células de N. crassa a crescer exponencialmente (Schwab et al., 1972)). Os imunoprecipitados eram separados por SDS/PAGE, utilizando géis de 22 cm, e a radioactividade contida nas diferentes bandas era quantificada.

A figura 9 apresenta exemplos de uma fluorografia (A) e a análise densitométrica de um filme completo (B). Os dados foram recolhidos de várias experiências deste tipo, pela análise densitométrica de apenas partes dos filmes com uma escala horizontal expandida. Uma vez que não foi detectada mais incorporação de [^{3}H]leucina no complexo I, 9Ø min após a sua adição, a quantidade de radioactividade encontrada nas diferentes subunidades associadas com o complexo I, neste tempo, foi considerada como valor máximo. A radioactividade incorporada a tempos diferentes, após a sua adição, foi então calculada relativamente àquele valor. Uma vez que o antissoro contra o complexo I podia ter co-precipitado algumas subunidades não associadas na enzima, experiências paralelas foram também efectuadas com AS-22a. Neste caso, subunidades não associadas para além das espécies de 22 e 33 kDa (os polipéptidos reconhecidos pelos anticorpos) não são precipitadas. Os resultados obtidos com todas as outras subunidades eram semelhantes aos obtidos com antissoro contra o complexo I. Isto sugere que subunidades individuais não associadas no complexo não são precipitadas pela técnica de imunoprecipitação directa, aqui utilizada com o antissoro contra o complexo I. De qualquer maneira, devido aos factos referidos e a erros aleatórios inerentes a este tipo de experiências, os dados obtidos devem ser vistos como uma estimativa e não como uma determinação de valores exactos.


A
3'
5'
8'
13'
20'
120'

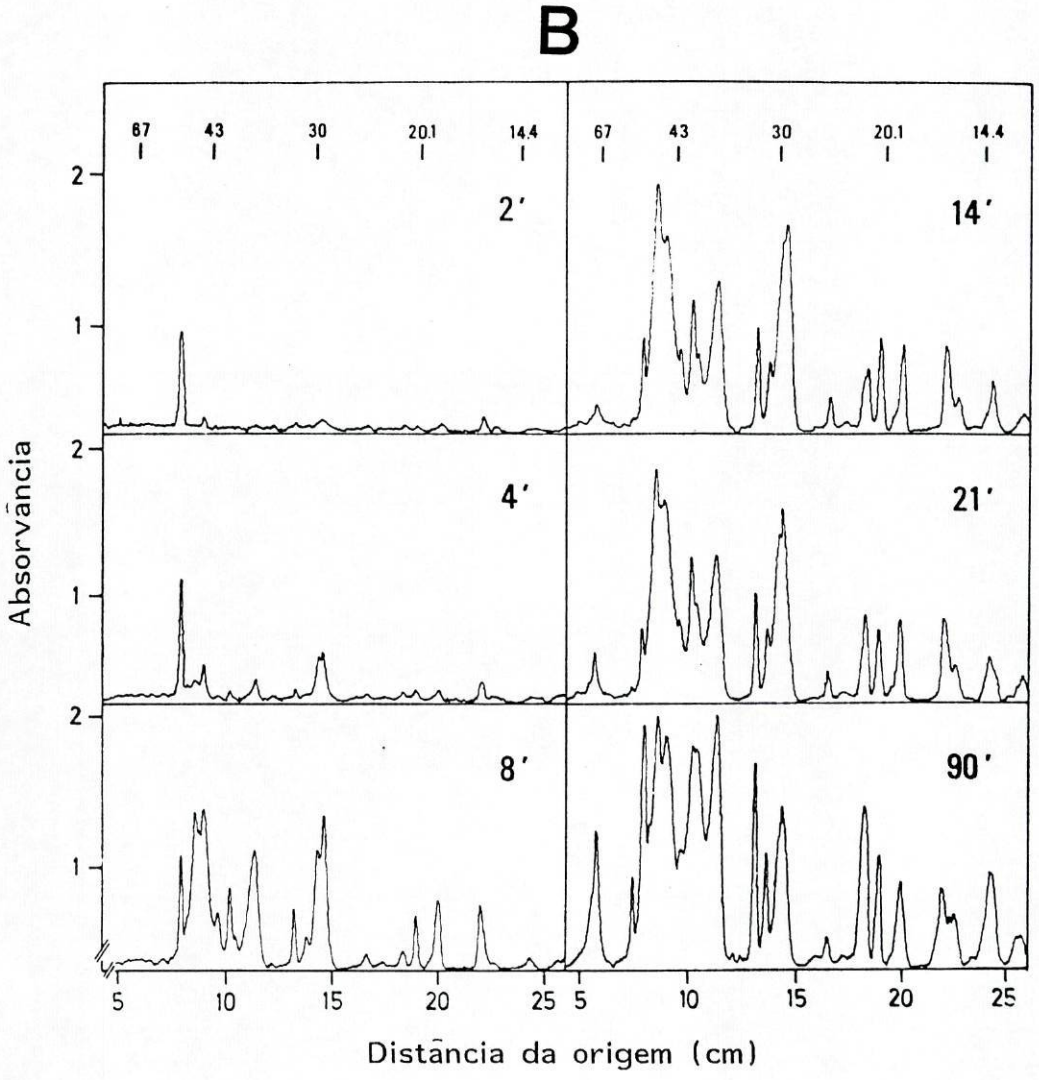


Figura 9. Análise electroforética da incorporação de subunidades individuais recém-sintetizadas no complexo I.

Células de N. crassa foram marcadas com [^{3}H]leucina (marcação "pulse-chase"). Nos tempos indicados (min), o complexo I foi imunoprecipitado das mitocôndrias e separado por SDS/PAGE. A figura mostra um fluorograma (A) e a análise densitométrica de um filme (B). Massas moleculares de referência estão incluídas no topo de B.

A figura 1Ø mostra as quantidades relativas de subunidades radioactivas associadas no complexo I a diferentes tempos. Enquanto a incorporação de radioactividade no conjunto das proteínas mitocondriais é muito rápida com um tempo de semi-incorporação máxima ($t_{1/2\ máx}$) de 1 min, o valor correspondente para o complexo I é de 1Ø min. Um valor semelhante (9 min) foi publicado para o $t_{1/2\ máx}$ de citocromo oxidase em N. crassa (Werner & Sebald, 1981). As taxas de incorporação de radioactividade nas subunidades individuais são significativamente diferentes. Duas proteínas mitocondriais de 12 kDa e 29 kDa (o produto do gene ND-1) foram os polipéptidos a aparecer mais rapidamente na enzima. Embora tenha sido sugerida uma incorporação lenta dos produtos dos genes ND no complexo I de células HeLa (Chomyn et al., 1985), estes resultados podem ser reflexo das condições particulares de cultura e marcação radioactiva, incluindo inibidores da síntese proteica. Proteínas de origem mitocondrial parecem ser também as mais rápidas a aparecer em outros complexos da cadeia respiratória (Schwab et al., 1972; Werner & Sebald, 1981; Sidhu & Beattie, 1983).

As diferentes taxas de reunião observadas entre subunidades radioactivas individuais, reflectem provavelmente a existência de reservas de precursores independentes e com tamanhos diferentes. Esta hipótese foi já sugerida para outros complexos respiratórios (Schwab et al., 1972; Werner & Sebald, 1981; Sidhu & Beattie, 1983). Uma explicação alternativa foi proposta por Wielburski et al. (1982) em estudos sobre a reunião de citocromo oxidase in vitro. A reunião da enzima foi vista como "um processo sequencial reflectindo diferentes taxas de associação de subunidades". Por não terem encontrado diferentes taxas de síntese ou de degradação de polipéptidos, os autores argumentam que não há evidência para reservas de precursores de tamanhos diferentes. Não concordamos com este argumento.

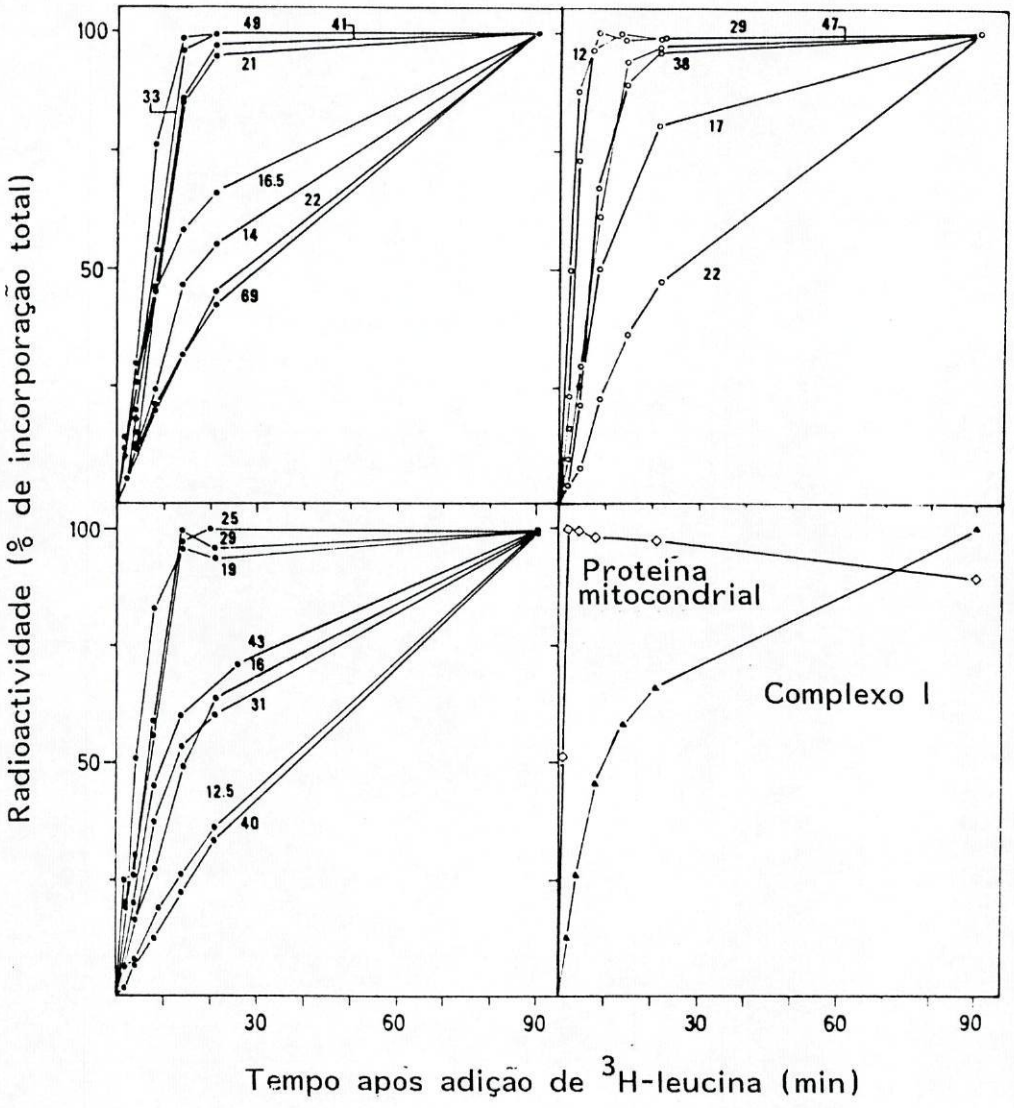


Figura 10. Cinética de marcação radioactiva das proteínas mitocondriais, complexo I e constituintes individuais.

Os números representam massas moleculares aparentes de subunidades do complexo I sintetizadas no citoplasma (A e B) e na mitocôndria (C). As quantidades relativas de radioactividade nestes polipéptidos e no complexo I (D) foram calculadas de experiências efectuadas como descrito na legenda da fig. 9. A radioactividade incorporada em proteínas mitocondriais foi determinada a partir do material precipitado pelo ácido tricloroacético.

Acreditamos que tanto taxas de síntese e degradação de polipéptidos iguais como diferentes podem co-existir com reservas de tamanho diferente (v. também secção seguinte). De facto, a observação de que as subunidades II e III se associam em citocromo oxidase imediatamente após a sua síntese, em contraste com a subunidade I que apresenta um atraso marcado na reunião (Wielburski et al., 1982), pode ser interpretada como boa evidência para a existência de reservas de precursores com tamanhos diferentes.

4.4. Cálculo de parâmetros cinéticos

O tempo de semi-vida de precursores de subunidades do complexo I foram estimados pela seguinte fórmula (Schwab et al., 1972): $t_{1/2\ máx}$ (precursor) = $t_{1/2\ máx}$ (subunidade) - $t_{1/2\ máx}$ (proteínas mitocondriais). O tamanho das reservas de precursores foi calculado como previamente nos casos dos complexos III e IV (Schwab et al., 1972; Werner & Sebald, 1981; Sidhu & Beattie, 1983). Este método assume que a razão entre a quantidade de precursor e a quantidade da subunidade correspondente é igual à razão entre o tempo de semi-vida dos precursores e o tempo de duplicação da massa celular. O tempo de duplicação das células nestas experiências foi de 130 min e a mesma taxa pode ser assumida para o complexo I. Os valores dos tamanhos das reservas de precursores são dados como uma percentagem das quantidades das correspondentes subunidades associadas ao complexo I (tabela 1). Os valores correspondentes aos polipéptidos de 12 e 29 kDa sintetizados na mitocôndria são extremamente pequenos, representando provavelmente apenas o material que se liberta dos ribossomas. O tamanho das reservas de precursores da maioria das proteínas é da ordem dos 2-11%. Cinco polipéptidos apresentam reservas de precursores bastante grandes, indicando uma molécula livre por cada quatro ou

cinco associadas ao complexo I.

Do padrão de marcação radioactiva do complexo I na presença de cicloheximida, mostrado na figura 2, pode ver-se que as proteínas de 47, 38, e 29 kDa aparecem como bandas de radioactividade intensa, em contraste com as proteínas de 33, 22, 17 e 12 kDa. Isto pode ser parcialmente explicado da seguinte maneira: pouco após a exposição das células ao inibidor, o processo de reunião do complexo I pára devido à exaustão de subunidades sintetizadas no citoplasma e/ou de produtos codificados no núcleo que regulam aquele processo. Assim, apenas subunidades com reservas pequenas de precursores poderão associar-se à enzima de uma maneira considerável. De facto, o tamanho das reservas de precursores calculado para aquelas proteínas é relativamente pequeno (tabela 1). A presença das subunidades de 47, 38 e 29 kDa no complexo I em maiores quantidades estequiométricas (v. tabela 1) pode também ser responsável pela sua marcação radioactiva intensa. Esta explicação não é aparentemente aplicável ao polipéptido de 12 kDa (que apresenta a reserva de precursores mais pequena) e ao polipéptido de 17 kDa (cuja reserva de precursores é apenas ligeiramente maior do que a das proteínas de 47, 38 e 29 kDa). Isto pode ser devido à menor contribuição destes polipéptidos para o complexo I, tanto em termos de massa proteica como de estequiometria. É também possível que, para a sua associação ao complexo I, os polipéptidos necessitem de produtos de origem nuclear não acessíveis quando a síntese proteica citoplasmática é bloqueada por acção da cicloheximida.

Foi já sugerido, para outros componentes da cadeia respiratória, que as subunidades "que se associam rapidamente" podem servir como locais de reconhecimento para a integração dos outros polipéptidos (Sidhu & Beattie, 1983; Wielburski et al., 1982). Parece provável, contudo, que os locais de reconhecimento sejam fornecidos por proteínas que existem na membrana em maiores quantidades, i.e., aquelas

com grandes reservas de precursores. É razoável assumir que quando a massa de complexo I duplica as suas subunidades duplicam simultaneamente, o que significa que todos os componentes apresentam a mesma taxa de associação à enzima. Podem ter taxas diferentes de síntese e/ou de degradação, mas os efeitos no seu conjunto (incluindo taxas de transcrição, estabilidade de mRNAs, etc.) devem ser compensatórios. Assim, a expressão "associação a taxas diferentes" é aplicável apenas aos polipéptidos radioactivos sintetizados recentememte durante a marcação "pulse-chase" (a sua associação mais ou menos rápida aos complexos proteicos dependendo da sua diluição por reservas de precursores menores ou maiores, respectivamente). Pelo exposto, sugerimos que os locais de reconhecimento são fornecidos pelos componentes "que se associam mais tarde". Esta proposta sugere um papel para as formas não associadas de proteínas, em alguns casos representando uma molécula livre por cada quatro ou cinco associadas. Mais especulativamente, poderia sugerir-se que estas formas livres estão envolvidas na importação de outras subunidades pela mitocôndria. É sabido que esta importação ocorre em locais de contacto entre as membranas interna e externa da mitocôndria (v. Hartl et al., 1989).

4.5. Cinética de marcação radioactiva de precursores de subunidades do complexo I

Mitocôndrias, isoladas de células recolhidas a diferentes tempos após marcação "pulse-chase", foram solubilizadas em Triton X-100 e tratadas com antissoros contra subunidades específicas do complexo I. Nestas condições, alguns polipéptidos são precipitados apenas a partir das reservas de precursores. Após a sua reunião em complexos proteicos, os determinantes antigénicos deixam de estar acessíveis aos anticorpos. A figura 11 mostra uma

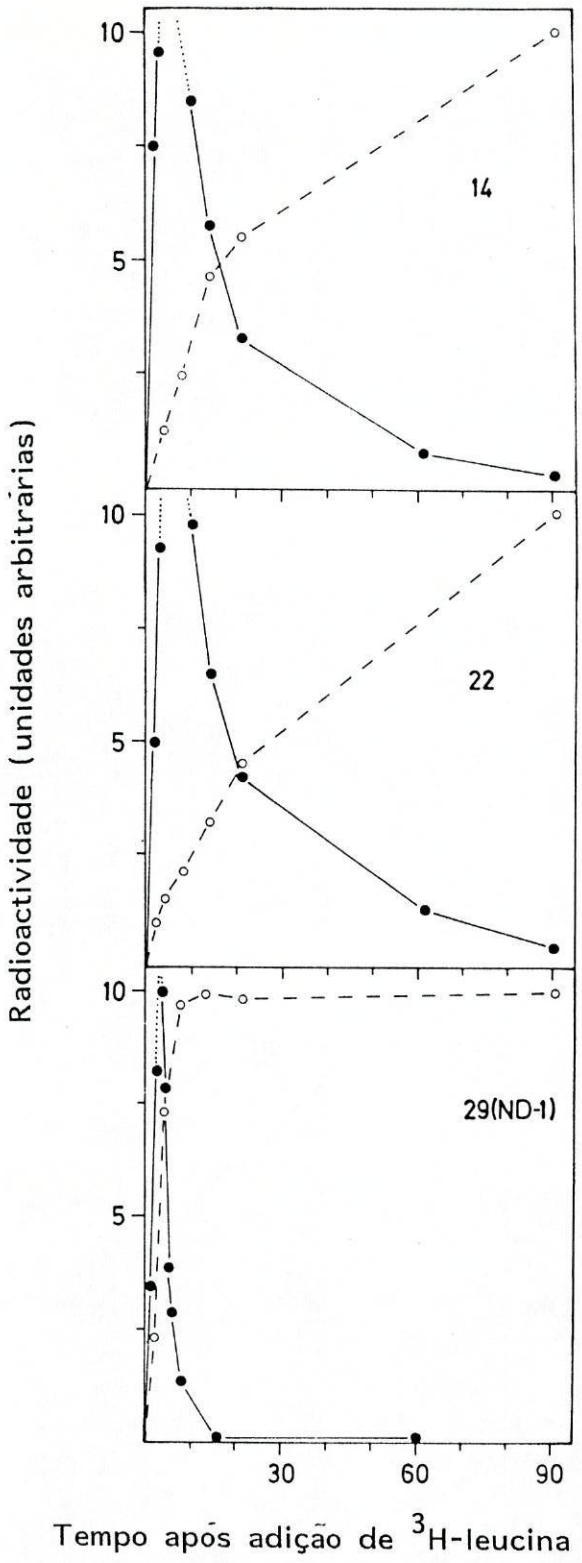


Figura 11. Cinética de marcação de formas livres de subunidades do complexo I.

Células de N. crassa foram marcadas com [^{3}H]leucina (marcação "pulse-chase"). Aliquotas foram retiradas da cultura a tempos diferentes, mitocôndrias foram preparadas e solubilizadas com Triton X-100. Os lisados foram incubados separadamente com AS-14, AS-22b e AS-29/ND-1. Os imunoprecipitados foram analisados por SDS/PAGE e a radioactividade quantificada. A figura mostra um gráfico dos valores relativos obtidos em relação ao tempo. As linhas a tracejado representam a cinética de incorporação das subunidades correspondentes no complexo I, para comparação.

cinética de marcação radioactiva de subunidades livres na mitocôndria, obtida com AS-14, AS-22b e AS-29/ND-1. Os polipéptidos aparecem marcados em poucos minutos. Observa-se uma boa correlação entre o desaparecimento subsequente destes precursores radioactivos e a cinética de aparecimento no complexo I das correspondentes subunidades. A forma livre da proteína radioactiva codificada pelo gene ND-1 é detectada pelos anticorpos apenas durante 15 min após a marcação radioactiva, devido à rápida associação deste polipéptido com o complexo. Em contraste, os precursores radioactivos das subunidades de 22 e 14 kDa permanecem acessíveis aos anticorpos por um período de tempo mais longo.

Tem sido demonstrada a existência de reservas, mitocondriais e extra-mitocondriais, de precursores de proteínas mitocondriais importadas (Schwab et al., 1972; Hallermayer et al., 1977; Werner & Sebald, 1981; Reid & Schatz, 1982a, 1982b; Lewin & Norman, 1983; Sidhu & Beattie, 1983). A marcação radioactiva máxima das formas mitocondriais livres das proteínas de 14 e 22 kDa ocorre 3-8 min após a adição de [^{3}H]leucina (fig. 11). Por outro lado, foi determinado, para estas proteínas, um tempo de incorporação semi-máxima no complexo I de 16 e 26 min, respectivamente (tabela 1). Assim, as reservas extra-mitocondriais de precursores destes polipéptidos são necessariamente pequenas em comparação com as da mitocôndria, e a importação das proteínas pelo organelo é um processo rápido. Estas observações suportam a ideia de que as diferentes taxas de associação em complexo observadas entre proteínas individuais resultam predominantemente da existência de reservas de precursores com diferentes tamanhos. No caso da subunidade nuclear de 22 kDa, a formação de pontes dissulfídricas intramoleculares (v. secção 4.7) poderá contribuir para um "aparecimento retardado" desta proteína no complexo I.

4.6. Comparação de precursores citoplasmáticos do complexo I sintetizados in vitro com as respectivas subunidades maduras

Como já referido, as proteínas isoladas do complexo I são codificadas pelo genoma nuclear. Muitas proteínas mitocondriais importadas são sintetizadas com sequências sinal adicionais, que são posteriormente removidas durante ou após o processo de importação (Pfanner & Neupert 1987; Eilers & Schatz, 1988; Pfanner et al., 1988; Verner & Schatz,1988; Hartl et al., 1989; Tropschug & Neupert, 1989). Para analizar a situação no complexo I, um sistema heterólogo (lisados de reticulócitos de coelho) de síntese de proteínas in vitro foi programado com RNA poli(A) de N. crassa na presença de [^{35}S]metionina. Seguidamente, os lisados de reticulócitos foram tratados com antissoros específicos contra subunidades do complexo I. Paralelamente, lisados de mitocôndrias de células marcadas com [^{3}H]leucina foram incubados com os mesmos antissoros. Após separação dos imunoprecipitados por SDS/PAGE, foi comparado o comportamento electroforético dos precursores citoplasmáticos e das correspondentes subunidades maduras. Os resultados estão expostos na figura 12.

O AS-12.5 reconhece dois componentes do complexo I (já mostrado na pista 1 da fig. 7A) e precipita ambos (12.5 e 25 kDa) da mitocôndria. A partir de lisados de reticulócitos, este antissoro precipita dois polipéptidos com massas moleculares aparentes de 12.5 e 28 kDa, que representam provavelmente os precursores das subunidades de 12.5 e 25 kDa, respectivamente. O AS-14 precipita um polipéptido dos lisados de reticulócitos com a mesma massa molecular aparente da subunidade madura (14 kDa), provavelmente o seu precursor. Um segundo polipéptido (cerca de 43 kDa) é obtido neste sistema de tradução in vitro. Devido à grande discrepância de massas moleculares não é provável que este polipéptido seja um precursor da proteína de 14 kDa, podendo

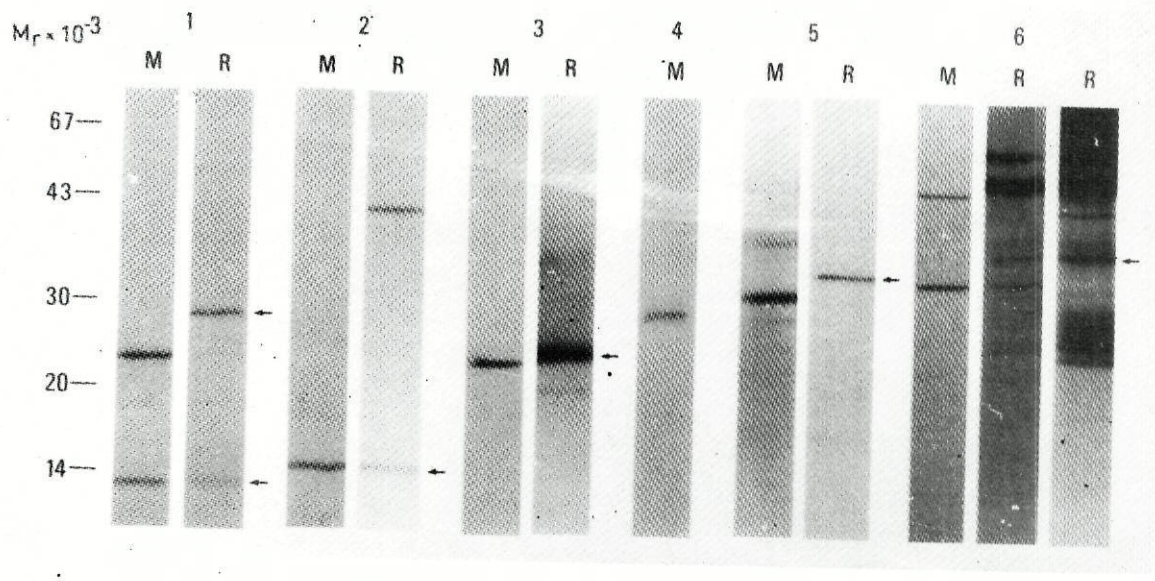


Figura 12. Identificação de precursores citoplasmáticos de subunidades do complexo I.

Mitocôndrias foram preparadas a partir de células marcadas uniformemente com [^{3}H]leucina. Precursores foram sintetizados em lisados de reticulócitos de coelhos na presença de [^{35}S]metionina. As mitocôndrias (M) e os lisados de reticulócitos (R) foram tratados com SDS e incubados com antissoros específicos. Os imunoprecipitados obtidos com AS-12.5 (1), AS-14 (2), AS-22b (3), AS-29 (4), AS-31 (5) e AS-33 (6) foram separados por SDS/PAGE e os géis submetidos a fluorografia. As setas apontam para os putativos precursores.

TABELA 2. Massas moleculares aparentes dos putativos precursores de subunidades do complexo I de N. crassa.

[a] o precursor não parece conter uma pré-sequência (v. Resultados e Discussão).

[b] v. Zauner et al. (1985).

M_r x 10-3 da subunidade	M_r x 10-3 do precursor
12.5	12.5
14	14
22	23-24 [a]
25	28
29	29
29 (ND-1)	29 [b]
31	34
33	36

representar reacção cruzada do antissoro ou uma forma agregada da proteína. Os AS-22 e AS-31 precipitam especificamente apenas um polipéptido tanto de lisados de reticulócitos (23-24 e 34 kDa, respectivamente) como da mitocôndria. Inicialmente, concluímos que as subunidades de 22 e 31 kDa são sintetizadas inicialmente como precursores de maior massa molecular. No entanto, parece que a proteína de 22 kDa não é sintetizada com sequências sinal removíveis e a discrepância observada entre a migração em gel desta subunidade e do seu precursor é devida apenas à formação de pontes dissulfídricas da proteína madura (v. também secções 4.7, 4.9 e 4.1Ø). Com o AS-29 não foi possível detectar qualquer material nos lisados de reticulócitos, apesar da proteína de 29 kDa ter sido imunoprecipitada da mitocôndria. O isolamento de um cDNA codificante desta proteína pode explicar aquele resultado negativo: a metionina inicial é a única presente na sequência do polipéptido (v. secção 4.12) e este resíduo amino-terminal é frequentemente removido nos lisados de reticulócitos (R. Zimmermann, comunicação pessoal). Aplicando AS-33 a um lisado de mitocôndrias, obtém-se uma segunda proteína (cerca de 52 kDa) para além da subunidade do complexo I de 33 kDa. Várias proteínas são precipitadas dos lisados de reticulócitos, sendo difícil identificar o precursor relevante. De qualquer modo, uma banda representando um polipéptido com uma massa molecular aparente de 36 kDa foi o produto mais persistente em cinco experiências independentes (duas das quais estão ilustradas na fig. 12), sendo o candidato mais provável. Os resultados estão sumarizados na tabela 2.

As subunidades do complexo I são sintetizadas nos ribossomas citoplasmáticos como precursores com ou sem sequências adicionais, indicando diferentes vias de translocação para a mitocôndria. Estudos destes processos podem ajudar a perceber mais detalhadamente a complicada biogénese do complexo I.

4.7. A subunidade de 22 kDa contém pontes dissulfídricas no estado nativo

O complexo I isolado foi incubado com SDS na presença e na ausência de mercaptoetanol. As subunidades dissociadas foram separadas por SDS/PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Os filtros foram depois decorados imunologicamente com um antissoro contra a subunidade de 22 kDa (AS-22b). Quando a proteína foi previamente exposta ao mercaptoetanol, os anticorpos detectaram uma banda de migração mais lenta em comparação com a banda visualizada em condições em que o polipéptido não foi tratado com este agente redutor (fig. 13, pistas 1 e 2). Este resultado sugere que a proteína de 22 kDa contém pontes dissulfídricas intramoleculares quando associada ao complexo I. No entanto, a formação das ligações dissulfídricas pode ser um artefacto que tenha ocorrido, por exemplo, durante a preparação do complexo I. Para excluir esta possibilidade, membranas mitocondriais foram dissociadas com SDS na presenca de 1Ø mM iodoacetamida (Parham et al., 1989), seguindo-se o mesmo procedimemto descrito atrás com complexo I isolado. A figura 13 (pista 3) mostra que, neste caso, a banda reconhecida pelo antissoro tem uma migração electroforética semelhante àquela do polipéptido separado do complexo I sem tratamento com mercaptoetanol. Isto indica que a subunidade contém pontes dissulfídricas intramoleculares no estado nativo. Caso contrário, a alquilação dos grupos sulfidril livres, por acção da iodoacetamida, teria impedido a formação de ligações dissulfídricas levando a uma migração electroforética mais lenta do polipéptido. Na enzima de corações bovinos foram identificadas subunidades que formam ligações dissulfídricas intermoleculares (Gondal & Anderson, 1985).

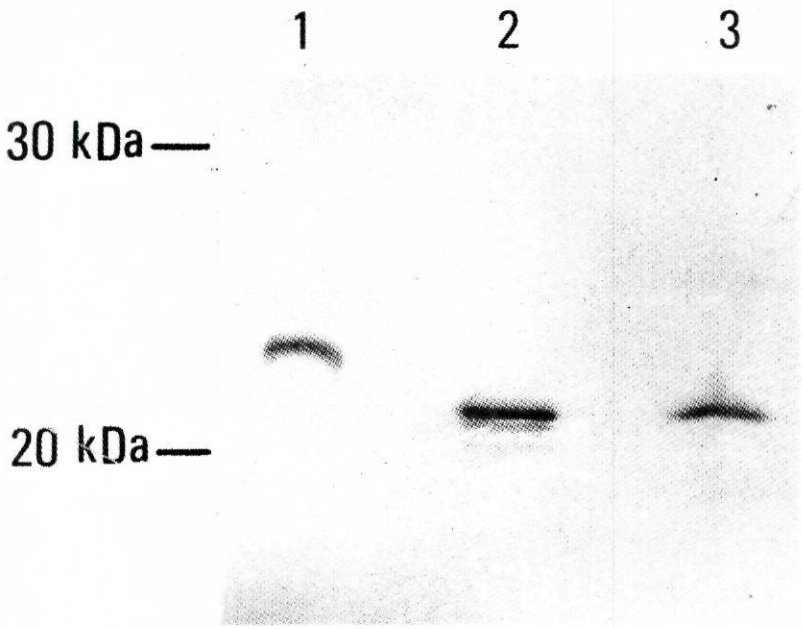


Figura 13. Efeito do mercaptoetanol na migração electroforética na subunidade do complexo I de 22 kDa.

Complexo I isolado (15 µg) foi dissociado com SDS na presença (1) ou ausência (2) de mercaptoetanol. Membranas mitocondriais (5Ø µg) foram dissociadas com SDS na presença de 1Ø mM iodoacetamida (3). As proteínas foram separadas por SDS/PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Os filtros foram tratados com um antissoro contra o polipéptido de 22 kDa (AS-22b). Os complexos antigénio/anticorpo foram visualizados com um segundo anticorpo marcado com ouro.

Utilizando o mesmo procedimento, não foi detectada qualquer alteração no comportamento electroforético das outras subunidades do complexo I isoladas neste trabalho (resultados não mostrados).

4.8. Isolamento de clones de cDNA codificantes de subunidades do complexo I

O rastreio do banco de expressão de cDNAs clonado no fago lambda gt11 foi efectuado com anticorpos específicos contra as subunidades do complexo I com massas moleculares aparentes de 22, 29, 31 e 33 kDa. Cerca de 1 clone entre 1-2 x 10^5 recombinantes reagiu com cada antissoro. Cada clone será designado por um número a seguir ao nome do vector utilizado. Números começados por 4, 5, 6 ou 7 representam inserções de cDNA correspondentes às subunidades de 22, 29, 31 e 33 kDa, respectivamente; números com 2 ou 3 dígitos referem-se a clones obtidos por rastreio do banco com antissoros ou por hibridação, respectivamente. Vários fagos lambda gt11 recombinantes (nºs 41, 42, 44, 51, 52, 53, 61, 62, 71, e 72) foram isolados e utilizados para lisogenizar *E. coli* Y1089. Todas as proteínas β-galactosidase de fusão expressas pelos lisogénios reagiram fortemente com os antissoros correspondentes, a julgar por experiências de decoração imunológica (resultados não mostrados).

As bactérias lisogenizadas com os fagos contendo as maiores inserções de cDNA foram utilizadas para purificar imunoglobulinas dos antissoros individuais, como descrito na secção de Material e Métodos. Mais especificamente, foram isolados anticorpos dos antissoros contra as proteínas de 22, 29, 31 e 33 kDa com a ajuda dos lisogénios que continham os fagos lambda gt11.42, gt11.51, gt11.62 e gt11.72, respectivamente. As proteínas sintetizadas por estes lisogénios, após indução, e as subunidades do complexo I foram depois separadas por SDS/PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. A decoração imunológica foi efectuada nestes filtros com as imunoglobulinas purificadas por afinidade ("retroblots"). Os resultados (fig. 14) mostram que cada preparação de anticorpos purificados

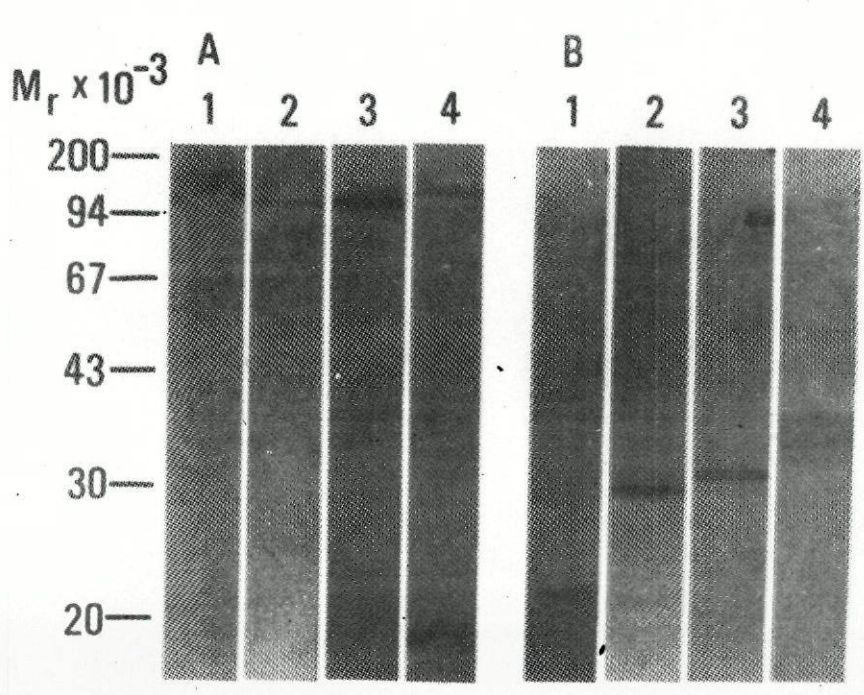


Figura 14. Decoração imunológica com anticorpos purificados por afinidade.

Lisogénios contendo os fagos recombinantes gt11.42, gt11.51, gt11.62 e gt11.72, foram induzidos para a produção das proteínas β-galactosidase de fusão. As proteínas celulares totais de cada lisogénio foram separadas por SDS/PAGE e transferidas para nitrocelulose (pistas 1-4 de A, respectivamente). As subunidades polipeptídicas de complexo I isolado de N. crassa foram separadas por SDS/PAGE e transferidas para nitrocelulose (todas as pistas de B).

A decoração imunológica foi efectuada com as imunoglobulinas purificadas por afinidade e com um segundo anticorpo marcado com ouro. As imunoglobulinas específicas foram isoladas de antissoros contra os polipéptidos de 22, 29, 31 e 33 kDa e aplicadas, nesta ordem, às pistas 1-4 de A e B.

reconhece especificamente tanto a proteína β-galactosidade de fusão como a subunidade particular do complexo I utilizada para imunização de coelhos.

As inserções de cDNA nºs 42, 51, 62 e 72 foram subclonadas no vector de transcrição pGEM4, isoladas, marcadas com [^{32}P]dATP, e utilizadas como sondas radioactivas em experiências de hibridação. Cada inserção de cDNA radioactiva foi usada como sonda em DNA de fagos quiméricos isolados com o mesmo antissoro, previamente digerido com enzimas de restrição. Esta análise ("Southern blot") revelou que fagos recombinantes indivíduais obtidos com um determinado antissoro continham inserções com sequências de DNA homólogas (resultados não mostrados).

A figura 15 mostra os resultados de uma análise "Northern blot". Nestas experiências foi utilizado RNA poli(A) de N. crassa. A hibridação foi efectuada, separadamente, com as sondas radioactivas individuais acima descritas. Os resultados indicam que RNA mensageiros de cerca de Ø.85, Ø.95, 1.3 e 1.4 kbp correspondem a subunidades citoplasmáticas do complexo I com massas moleculares aparentes de 22, 29, 31 e 33 kDa, respectivamente. A inserção de cDNA nº 42 também hibridou ligeiramente com uma banda de mRNA de cerca de Ø.95 kbp. Os tamanhos dos RNA mensageiros estão dentro de limites esperados, considerando as massas moleculares aparentes das proteínas por eles codificadas.

Foi descrito o isolamento de clones de cDNA codificantes de subunidades do complexo I de N. crassa com massas moleculares aparentes de 22, 29, 31 e 33 kDa, a partir de um banco de expressão clonado no fago lambda gt11, utilizando anticorpos contra estes componentes. Os resultados obtidos com "retroblots" e com hibridação de DNA e RNA sugerem fortemente que foram isolados os clones correctos. Utilizando o clone pGEM4.42 em experiências de transcrição/tradução in vitro, foi possível exprimir um

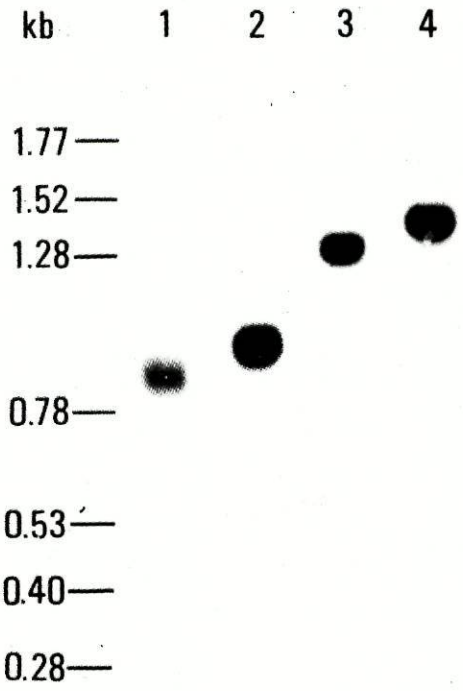


Figura 15. Análise electroforética de RNA mensageiros correspondentes a subunidades do complexo I.

RNA poli(A) de N. crassa foi separado em gel de agarose em condições desnaturantes e transferido para membranas de nylon. A hibridação foi efectuada nos filtros, utilizando diferentes inserções de cDNA previamente marcadas com [^{32}P]dATP. As inserções de cDNA nºs 42, 51, 62 e 72 (correspondentes, nesta ordem, às subunidades do complexo I de 22, 29, 31 e 33 kDa) foram aplicadas nas pistas 1-4, respectivamente.

polipéptido que foi reconhecido especificamente com um antissoro contra a subunidade do complexo I de 22 kDa (v. secção 4.9). Este resultado, juntamente com o alinhamento de dados obtidos por sequenciação da proteína e do DNA (v. secção 4.10), confirmou que o clone pGEM4.42 codifica, de facto, a subunidade do complexo I de 22 kDa. Do mesmo modo, a expressão das subunidades de 29 e 31 kDa num sistema heterólogo in vitro e a sua imunoprecipitação com os respectivos antissoros (v secções 4.11 e 4.14) apoia a sugestão de que os clones correctos foram isolados.

4.9. Expressão da subunidade de 22 kDa *in vitro*

Utilizando o plasmídeo pGEM4.42 num sistema heterólogo de transcrição/tradução *in vitro*, foi possível sintetizar e imunoprecipitar especificamente uma proteína usando um antissoro contra o polipéptido de 22 kDa (AS-22b, v. fig. 16). Este resultado indica fortemente que a inserção de cDNA nº 42 codifica, de facto, a subunidade do complexo I de 22 kDa de origem nuclear.

Em experiências mais antigas, tinha sido observado que a proteína de 22 kDa imunoprecipitada de mitocôndrias apresentava uma migração mais rápida em SDS/PAGE do que o respectivo precursor sintetizado *in vitro* num sistema de lisados de reticulócitos programado com RNA poli(A) de *N. crassa* (v. fig. 12). Esta discrepância de mobilidade foi inicialmente atribuída ao facto do precursor ser sintetizado com uma extensão amino-terminal (pré-sequência). Contudo, como já ilustrado (fig. 13), o tratamento com mercaptoetanol tem um efeito marcado no comportamento electroforético da proteína madura. Isto levantou a seguinte questão: a diferença de migração observada entre o precursor citoplasmático e a forma mitocondrial do polipéptido de 22 kDa será de facto devida à síntese da proteína com uma pré-sequência, ou causada pela subsequente formação de pontes dissulfídricas após a sua importação pela mitocôndria?

Para tentar esclarecer esta questão foram efectuadas as seguintes experiências: RNA poli(A) total de *N. crassa* e RNA transcripto do clone pGEM4.42 com RNA polimerase SP6 foram separadamente traduzidos em lisados de reticulócitos na presença de [^{35}S]metionina. A mistura foi incubada com AS-22b. Os complexos imunológicos foram solubilizados ou com tampão contendo 2.5% SDS e 5% mercaptoetanol ou com tampão contendo apenas SDS, e submetidos a electroforese. No mesmo gel, foram incluídas amostras do polipéptido de 22 kDa

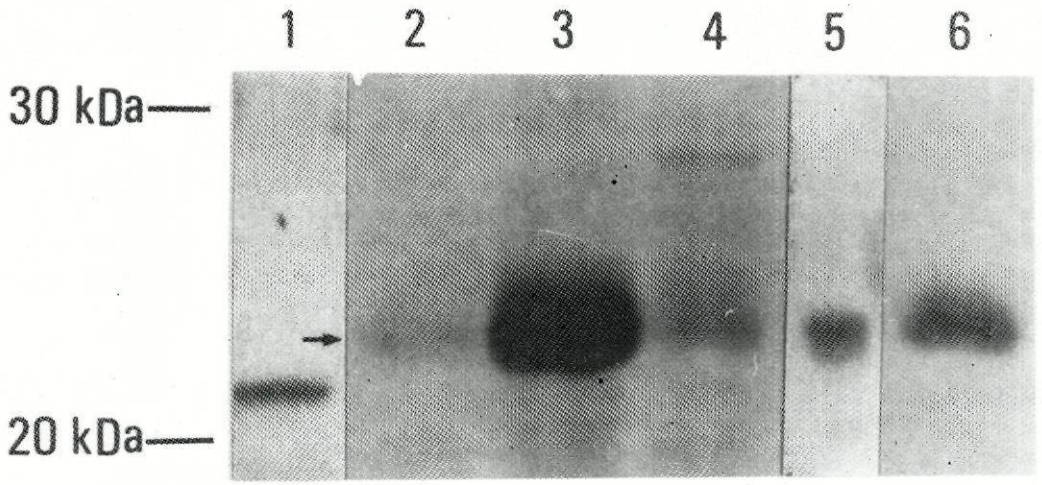


Figura 16. Comparação da migração electroforética da subunidade madura de 22 kDa com a de precursores sintetizados in vitro.

5 µg da subunidade de 22 kDa isolada do complexo I foram separados por SDS/PAGE (pistas 1 e 5). RNA poli(A) de N. crassa foi traduzido em lisados de reticulócitos de coelho na presença de [^{35}S]metionina, a mistura foi incubada com um antissoro contra a proteína de 22 kDa (AS-22b), e os imunoprecipitados resultantes foram separados por SDS/PAGE (pistas 2 e 4). O plasmídeo pGEM4.42 foi transcripto com RNA polimerase SP6 e, depois, foi efectuado o procedimento experimental (i.e., tradução, imunoprecipitação e electroforese) descrito acima (pistas 3 e 6).

As amostras das pistas 1-3 não foram expostas a agentes redutores. As amostras das pistas 4-6 foram tratadas com mercaptoetanol antes da electroforese. A figura mostra uma coloração com azul de Coomassie (pistas 1 e 5) e uma fluorografia (pistas 2-4 e 6) do gel.

isolado do complexo I, previamente incubadas na presença e ausência daquele agente redutor. O gel foi corado com azul de Coomassie, seco em vácuo e submetido a fluorografia. Os resultados estão ilustrados na figura 16. A massa molecular aparente de 22 kDa é apresentada apenas quando a subunidade é isolada do complexo I e não é exposta a um agente redutor. Nos outros casos, é observada uma banda com uma maior massa molecular aparente (23-24 kDa). Estes resultados sugerem que o precursor citoplasmático da proteína de 22 kDa não é sintetizado com uma pré-sequência e ainda não contém pontes

dissulfídricas. Além disso, a inserção de cDNA nº 42 parece conter toda a região codificante do gene respectivo, uma vez que o polipéptido sintetizado em lisados de reticulócitos (a partir de RNA poli(A) de N. crassa ou de RNA transcripto do clone pGEM4.42) apresenta o mesmo comportamento electroforético.

A subunidade de 22 kDa associada ao complexo I contém pontes dissulfídricas intramoleculares, como deduzido do efeito do mercaptoetanol no seu comportamento electroforético. A migração mais lenta na presença de mercaptoetanol pode ser atribuída a um estado mais "relaxado" da proteína, resultante da cisão das pontes dissulfídricas por acção do agente redutor. Em contraste, o precursor citoplasmático parece não conter as pontes dissulfídricas. Quando o polipéptido é sintetizado in vitro, não é observado qualquer efeito do mercaptoetanol na sua migração electroforética. Em adição, experiências de marcação in vivo revelaram que o polipéptido está presente no citosol (sobrenadante pós-ribossomal) de células de N. crassa sem pontes dissulfídricas (resultados não mostrados). Estas observações estão de acordo com os conhecimentos actuais sobre translocação de proteínas através de membranas. As proteínas têm de estar numa conformação "relaxada" de maneira a poderem atravessar a membrana (Eilers & Schatz, 1986; Chen & Douglas, 1987; Pfanner et al., 1987b; Verner & Schatz, 1987) e polipéptidos contendo pontes dissulfídricas não são competentes para translocação (Maher & Singer, 1986; Müller & Zimmermann, 1988). Por outro lado, a proteína imunoprecipitada a partir da sua reserva mitocondrial de precursores apresenta a mesma massa molecular aparente da subunidade madura associada ao complexo I (na fig. 11 é mostrada apenas a quantificação do precursor mitocondrial). Assim, para este polipéptido, a sequência dos processos de maturação parece ser a seguinte: i) síntese de um precursor sem pré-sequência nos ribossomas

citoplasmáticos, ii) sua importação pela mitocôndria, iii) formação das pontes dissulfídricas e iv) sua associação ao complexo I.

4.1Ø. Análise de sequenciação parcial da subunidade de 22 kDa e de sequências de cDNA correspondentes

A figura 17 mostra a estratégia utilizada para sequenciar a inserção de cDNA nº 42. Na região codificante, ambas as cadeias de DNA foram completamente sequenciadas. A sequência desta inserção de cDNA comporta 755 bp (começando com o nucleótido em posição -7 na fig. 18), e parece conter a região codificante completa do RNA mensageiro que especifica a subunidade do complexo I de 22 kDa. Uma sequência proteica de 183 aminoácidos foi deduzida do quadro de leitura (fig. 18). Foi calculada uma massa molecular de 2Ø828 dalton para este polipéptido. Foram encontrados 8 resíduos de cisteína, dispostos de uma maneira regular na estrutura primária da proteína; cada um está separado do seguinte por 9-11 resíduos de aminoácidos. Não foi encontrada homologia significativa com outras sequências contidas em versões actualizadas de bancos de dados de proteínas ou de DNA.

Foi ainda considerada a possibilidade de outro codão ATG preceder o codão de iniciação putativo, levando à formação de um polipéptido ligeiramente maior. Embora pouco provável, uma vez que uma diferença de cerca de Ø.5 kDa teria já sido detectada por electroforese, foi decidido caracterizar a região 5´ do mRNA omissa na inserção de cDNA nº 42. Foi feito novamente um rastreio do banco de cDNA usando, desta vez, a inserção 42 marcada radioactivamente como sonda. Foram isolados 19 clones positivos. A maioria

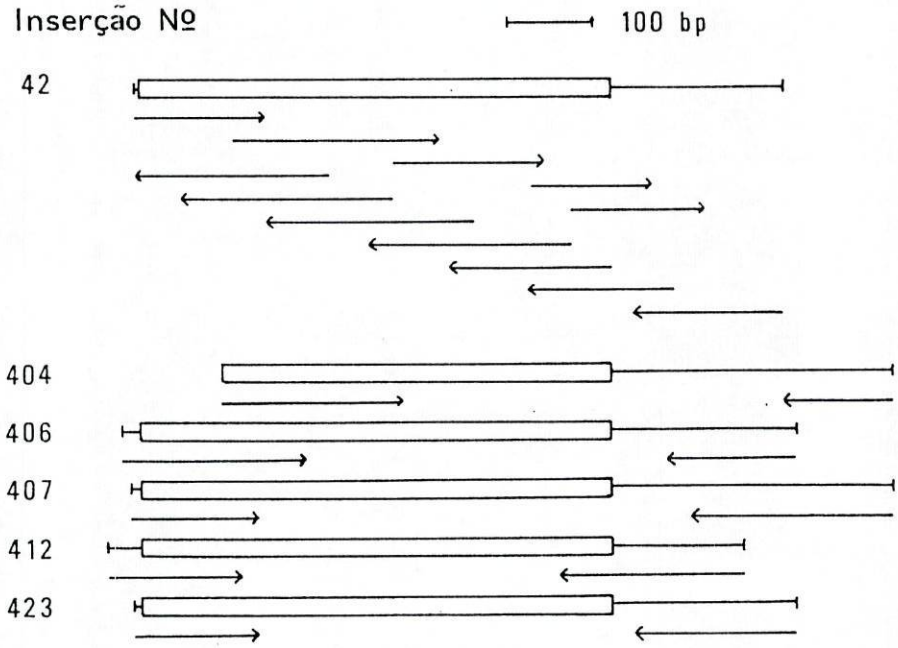


Figura 17. Estratégia utilizada para a sequenciação de inserções de cDNA codificantes da subunidade do complexo I de 22 kDa.

As caixas representam a região do gene codificante da proteína. As setas por baixo de cada inserção indicam a direcção e extensão de sequência determinada.

deles continha inserções de cDNA sensivelmente do mesmo tamanho ou maiores do que a inserção 42. Cinco inserções de cDNA (nºs 404, 406, 407, 412 e 423) foram subclonadas no vector pGEM4 e as suas sequências 5´ e 3´ terminais foram determinadas (v. figs. 17 e 18). A sequência total de DNA, combinada dos vários clones, abrange 914 bp. A inserção 404 contém cinco resíduos de nucleótidos de adenina no seu término 3´, que podem ser (parte d´) a cauda de poli(A). As inserções 406 e 412 incluem um codão de terminação (TGA), 12 nucleótidos acima, e no mesmo quadro de leitura, do primeiro tripleto ATG, confirmando assim que este representa o codão de iniciação.

```
                                -37  CTTTGCGATCAACGACAAGCTCGCCTGAACCGACAGG
  1  ATGGCTTCTCGGATTCCCCAGTTCAACCAGCAGGTCCTTTACGACACCACCCCCTTGCCG
  1   M  A  S  R  I  P  Q  F  N  Q  Q  V  L  Y  D  T  T  P  L  P

 61  GACTCGATCCCCAAGGTCAAGGAACTCGGTGCCAGTTCTGCCCCGCTTATGCCGGCCGCC
 21   D  S  I  P  K  V  K  E  L  G  A  S  S  A  P  L  M  S  A  A

121  TACTTCATCGGAGCCCGGTGCCGCGATTACAACGATGATTTCATGCAGTGTAAGAACGAG
 41   Y  F  I  G  A  R  C*  R  D  Y  N  D  D  F  M  Q  C*  K  N  E

181  AACCCTGGAAAGGGCGAGTTTGAGTGTTTGAAGGAGGGCCGAAGGCTTACCCGATGCGCC
 61   N  P  G  K  G  E  F  E  C*  L  K  E  G  R  R  V  T  R  C*  A

241  CGGAGCGTTATCGCCGACATCAACAAGTCATGTCTGGAAGAGTTCCGCAAGCACTGGACA
 81   R  S  V  I  A  D  I  N  K  S  C*  L  E  E  F  R  K  H  W  T

301  TGCCTTGAGGACAACAACCAGCAGCTCTGGCAATGCCGACCTGCCGAATGGAAGCTGAAC
101   C*  L  E  D  N  N  Q  Q  L  W  Q  C*  R  P  A  E  W  K  L  N

361  AAGTGTGTTTTTGAGAACTTGGGTCTCAAGAAGGAAATCCCCGATCAGCCCCCCAACGTC
121   K  C*  V  F  E  N  L  G  L  K  K  E  I  P  D  Q  P  P  N  V

421  ACACCCGTCCACCTCAGGAAGCAGATGATCTATGCGCATTGGCCCATCCCCCGTTCCGCC
141   T  P  V  H  L  R  K  Q  M  I  Y  A  H  W  P  I  P  R  S  A

481  GAGCCTTTCGTTCCCCCAACACAGACTGGTGACAACAACAAGGCGCCACGTGCCGCTTCG
161   E  P  F  V  P  P  T  Q  T  G  D  N  N  K  A  P  R  A  A  S

541  TCATCGTCGTAAGGGCAATTCGAGCAGGAGTGAAGGGGAAGAAGGGGAAGGGAAGCCTGG
181   S  S  S

601  CAGAACAACAGGACTAGCAGGAAGAACAGAACTGCAAGGAGAATATGCCAAGGGCGAAGA
661  TAATTCCCAGAAAGACGGTATGGTAATGATTATAACTTCTACGTACCCTCTAGGACCATA
721  TGGTAAAGATGAATAGACAATGCAAACCAAGCGGTTGAGGATAGAACTGGGCGTTGTCTG
781  TGTAGGCTGGCATGTAATGTGTCAGGGCGGGGGGCGCTTCGAGTTGAACGGCAGCACACT
841  GTACATACGTTTATCCACCTTCGTCATCGGCCAAAAA
```

Figura 18. Sequência nucleotídica combinada de clones de cDNA e estrutura primária da proteína de 22 kDa daí deduzida.

A sequência de DNA foi obtida de vários clones independentes, como ilustrado na fig. 17. Os resíduos de cisteína estão assinalados com asteriscos. Os aminoácidos determinados por sequenciação directa da proteína (resíduos 38-45) estão sublinhados.

Não foi possível determinar experimentalmente a sequência amino-terminal da proteína de 22 kDA isolada do complexo I. Por isso, a proteína foi clivada com brometo de cianogénio e um dos fragmentos resultantes foi sequenciado parcialmente. A sequência proteica determinada está de acordo com a de um segmento deduzido da sequência de DNA (resíduos de aminoácidos nºs 38-45 da fig. 18) com uma excepção: foi obtido um ácido glutâmico em vez de um resíduo de isoleucina. Estes resultados confirmam que o clone

isolado codifica a subunidade do complexo I de 22 kDa.

A composição em aminoácidos da subunidade de 22 kDa revela uma proteína hidrofílica que não contém domínios óbvios que potencialmente atravessem a membrana (fig. 19). Foi já sugerido que pelo menos os determinantes antigénicos desta subunidade não estão expostos no complexo I (v. secção 4.2). É provável que o polipéptido esteja encoberto por outras subunidades do complexo I.

Não é claro se a proteína madura começa com o aminoácido metionina. Não foi possível determinar a sequência amino-terminal do polipéptido, presumivelmente devido a bloqueamento do aminoácido terminal. Contudo, em contraste com muitos dos componentes da membrana interna mitocondrial (v., e. g., Hartl et al., 1989), parece que este polipéptido não contém uma pré-sequência. Os sinais que dirigem a proteína para a mitocôndria devem, assim, estar contidos na estrutura da sequência final.

O complexo I contém cerca de 6-8 centros [Fe/S] (Ragan et al., 1982a, 1982b; Ohnishi et al., 1985; Ragan 1987). A composição em aminoácidos do polipéptido de 22 kDa, particularmente os seus 8 resíduos de cisteína, tornam-no um bom candidato para a ligação de pelo menos um destes centros, apesar do envolvimento de algumas cisteínas na formação de pontes dissulfídricas. É de notar que, em analogia com este polipéptido, a maior parte das subunidades do complexo I de bovinos contendo centros [Fe/S] podem também ser solubilizadas com agentes caotrópicos (Davis & Hatefi, 1969; Galante & Hatefi, 1979; Ragan et al., 1982a, 1982b; Ragan 1987) e são codificadas por genes nucleares (Chomyn et al., 1988). A estrutura primária do polipéptido de 22 kDa não apresenta homologia significativa com a de outras proteínas que se sabe conterem centros [Fe/S], onde

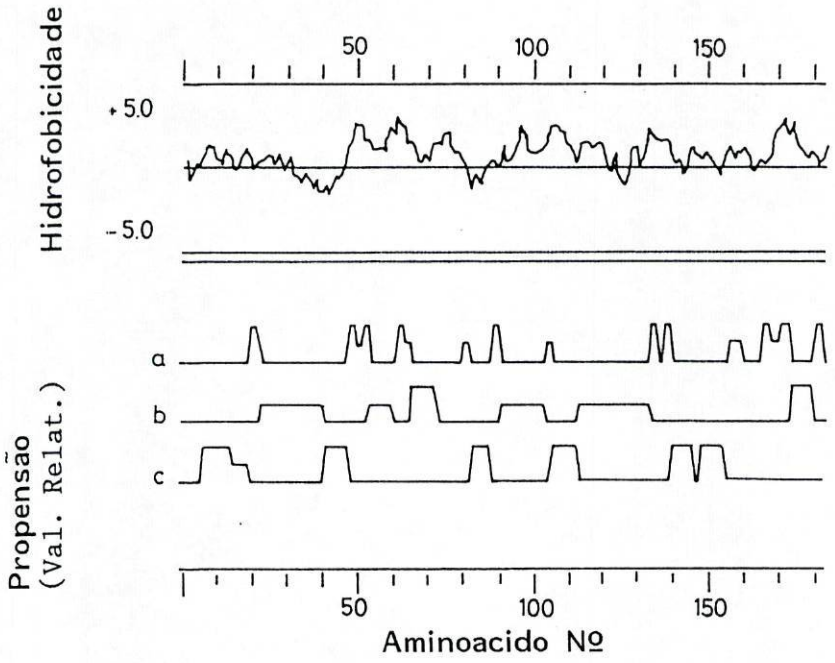


Figura 19. Características estruturais preditas para a subunidade de 22 kDa.

Painel superior: perfis de polaridade. Painel inferior: potencialidades para a formação de estruturas de hélices α (a), folha pregueada β (b) e enrolamento β (c).

os resíduos de cisteína estão mais "aglomerados". Contudo, é possível imaginar que as cisteínas da subunidade de 22 kDa se "aglomerem" na formação das estruturas secundária/terciária, como parece acontecer com os resíduos envolvidos na formação das pontes dissulfídricas. Além disso, a comparação de sequências de aminoácidos apenas entre proteínas contendo os centros mais simples [2 Fe/2 S] revelou a existência de vários tipos independentes de distribuição de cisteínas (Meyer et al., 1986), sugerindo assim que comparações baseadas apenas em estruturas primárias podem ser inconclusivas.

Na subunidade de 22 kDA isolada do complexo I foi também ensaiada uma técnica sensível e específica para a coloração de Fe (Kuo & Fridovich, 1988), após electroforese da proteína a 4 °C. Os resultados foram negativos devido

provavelmente à exposição da proteína a ureia durante o processo de isolamento, tratamento suficiente para a remoção do(s) hipotético(s) centro(s) [Fe/S] (Werner, comunicação pessoal).

Considera-se que o complexo I de diferentes espécies eucarióticas tem uma composição semelhante (Cleeter & Ragan, 1985; Ragan, 1987). Várias subunidades do complexo I de bovinos podem ser extraídas com agentes caotrópicos e posteriormente separadas em duas fracções, um fragmento contendo FMN e uma porção rica em Fe e S (Galante & Hatefi, 1979). Entre as proteínas contidas nestas duas fracções, um polipéptido de 24 kDa que liga um centro [Fe/S] pode representar (em termos de massa molecular) o equivalente do polipéptido de N. crassa. Informação sobre a sequência de DNA e de aminoácidos da subunidade de 24 kDa humana, de bovinos e de ratos foi obtida recentemente (von Bahr-Lindstrom et al., 1983; Nishikimi et al., 1988; Pilkington & Walker, 1989). A comparação entre o polipéptido do fungo e o de mamíferos revelou que ambas as espécies têm um carácter relativamente hidrofílico, mas não foi encontrada homologia significativa em termos de estrutura primária. Assim, não é possível prever se a subunidade de 22 kDa de N. crassa desempenha um papel semelhante no complexo I.

4.11. Expressão da subunidade de 29 kDa in vitro

A inserção de cDNA nº 51 foi marcada radioactivamente com [^{32}P]dATP e utilizada como sonda para rastreio do banco de cDNAs, por meio de hibridação. Foram isolados 4 fagos recombinantes independentes, e analizadas as inserções de

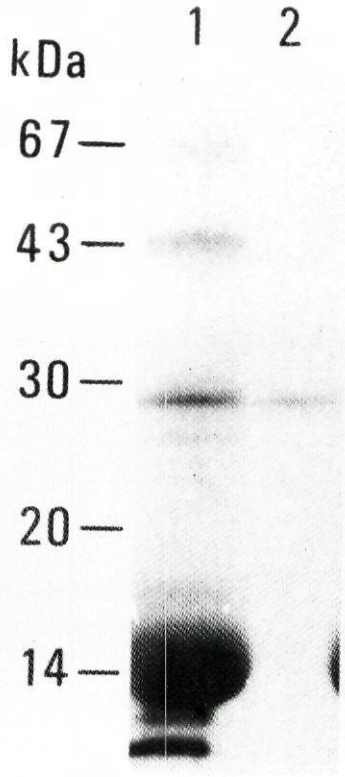


Figura 2Ø. Expressão da subunidade de 29 kDa in vitro.
O plasmídeo pGEM4.5Ø6 foi transcrito com RNA polimerase SP6 e traduzido em lisados de reticulócitos de coelho na presença de [^{35}S]metionina. A figura mostra a fluorografia de um gel, contendo os produtos de tradução totais (1) e o material imunoprecipitado com um antissoro contra a proteína de 29 kDa (2).

cDNA neles contidas. A maior destas inserções (nº 5Ø6) foi subclonada no plasmídio pGEM4, gerando pGEM4.5Ø6.

O plasmídeo pGEM4.5Ø6 foi transcrito in vitro com RNA polimerase SP6. O RNA foi traduzido num sistema de lisados de reticulócitos na presença de [^{35}S]metionina, e a mistura foi tratada com um antissoro contra a proteína de 29 kDa (AS-29). Os produtos de tradução totais e o material imunoprecipitado foram analisados separadamente por SDS/PAGE. A figura 2Ø mostra que um polipéptido marcado radioactivamente pôde ser sintetizado e precipitado especificamente com o antissoro. Este resultado sugere fortemente que a inserção de cDNA 5Ø6 codifica a subunidade do complexo I de 29 kDa.

4.12. Sequência de uma inserção de cDNA codificante da subunidade de 29 kDa

A estratégia utilizada para sequenciar a inserção de

cDNA de pGEM4.5Ø6 está ilustrada na figura 21. A figura 22 exibe a sequência nucleotídica e a sequência proteica deduzida da proteína de 29 kDa. A inserção de cDNA comporta 889 bp (foi estimado um tamanho de 95Ø bp para o mRNA correspondente, v. fig. 15), e contém um quadro de leitura codificante de um polipéptido com 2Ø1 aminoácidos. Um codão de terminação TAA precede, no mesmo quadro de leitura, o tripleto ATG, indicando que este representa o codão de iniciação. Foi calculada uma massa molecular de 21323 dalton para a proteína, valor substancialmente menor do que a massa molecular aparente de 29 kDa estimada por electroforese.

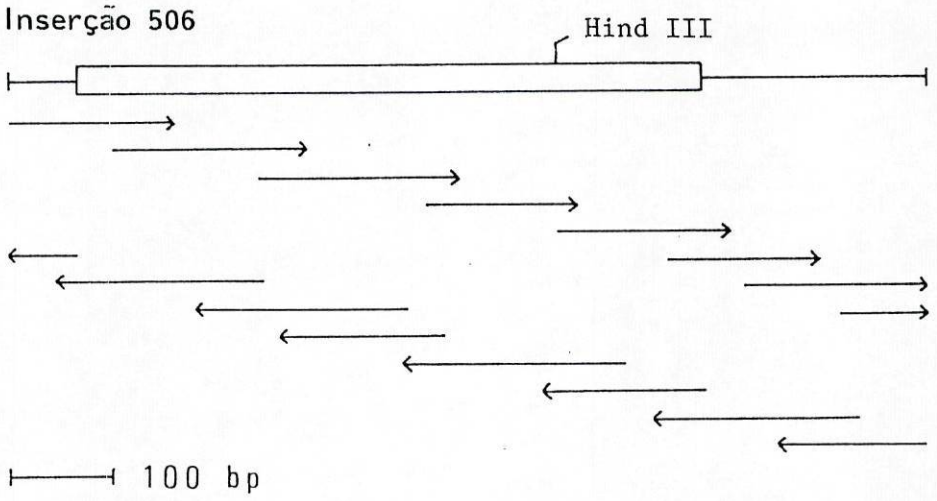


Figura 21. Estrutura e estratégia utilizada para a sequenciação da inserção de cDNA de pGEM4.5Ø6.

A caixa representa a região codificante. As setas indicam a direcção e extensão de sequência determinada.

```
                                                                  -64  GGAA
-60  TCCACACCTCGTCGTCGTTCACTTACACCACGATAACAAACGGGTTCTACAGCCGCCACC
  1  ATGGCTTCCAAAGTCGTCACCGGCGTGGTCAAGACCACCGCAGGCGGCGTTGTGCCCGTC
  1   M  A  S  K  V  V  T  G  V  V  K  T  T  A  G  G  V  V  P  V

 61  AGCCAGAAATACACTGTCCAATCCGTCGGCGTCTGGGAGCGCATCCGCCGCGCCTTCGCT
 21   S  Q  K  Y  T  V  Q  S  V  G  V  W  E  R  I  R  R  A  F  A

121  ATCGACCCTAACCGCTCCAACGGTGTTCCCTTGGTCCCCTACAATCGCAACCCATCCCCC
 41   I  D  P  N  R  S  N  G  V  P  L  V  P  Y  N  R  N  P  S  P

181  GGCTCCCTCGACCCCTTGGCCTACGACGATCCCGTCACCATTCCAGCCGGCGACATCGCC
 61   G  S  L  D  P  L  A  Y  D  D  P  V  T  I  P  A  G  D  I  A

241  GACAACCCGTACTGGAAGCGCGATGCCCGGCGCAACTACCCGCGCCTGAGCGTGGTGGGC
 81   D  N  P  Y  W  K  R  D  A  R  R  N  Y  P  R  L  S  V  V  G

301  CAGGCCGAGGCTGTTGCTCTGCTCAGTGTCGGCAGCGCGACGCACCCCCGTGTCGAGCTG
101   Q  A  E  A  V  A  L  L  S  V  G  S  A  T  H  P  R  V  E  L

361  GTGGGCGAGAACGGGAGCAAGCAGCTGGTTGCGGCGCAGGAGGCTGGCAAGACGGGTGGT
121   V  G  E  N  G  S  K  Q  L  V  A  A  Q  E  A  G  K  T  G  G
                                        Hind III
421  TTGGCCAAGTACTTTGAGGGAACCGGTGTGGAGGCTGGTAAGCTTGTGTTGGCGGAGACG
141   L  A  K  Y  F  E  G  T  G  V  E  A  G  K  L  V  L  A  E  T

481  GGAGGTCTGCCGCCGTTGCCTAGTGGTGAGAAGCTGGGGGAGGGCGGCAAGTGGGATGTT
161   G  G  L  P  P  L  P  S  G  E  K  L  G  E  G  G  K  W  D  V

541  TACAAGTATCAGTTGGCTGAGGAGCCTTCTTATTCTGAAGCCTACCCTTGCCGGTCGTTC
181   Y  K  Y  Q  L  A  E  E  P  S  Y  S  E  A  Y  P  C  R  S  F

601  TCTTAAATGGAAGAAGAGTGAGATGAGCTTGTGAGCAGGACACATGAGCAGAAAGGGACC
201   S

661  ACAGAACCTTTGATGGAGGGATAACAACAGACAGAACAAGACCACAGAGACCAGATACGT
721  TCGGGCTGGTGTACATAGCAGGCAAGCAAGCAAGCGGTAGACGGAACGTATAGACTTTGC
781  TTAGATTATGGCATTCAACGTCCAGAGGGAAATACGGTTTTTGAG
```

Figura 22. Sequência nucleotídica da inserção de cDNA de pGEM4.506 e estrutura primária da proteína de 29 kDa daí deduzida.

Modificações da proteína pós-tradução poderão estar na origem desta discrepância. O polipéptido tem um carácter hidrofílico e não contém segmentos óbvios que potencialmente atravessem a membrana (fig. 23). É previsível que a proteína forme numerosas estruturas de enrolamento β (fig. 23), refletindo o seu elevado conteúdo em glicina (11.4%).

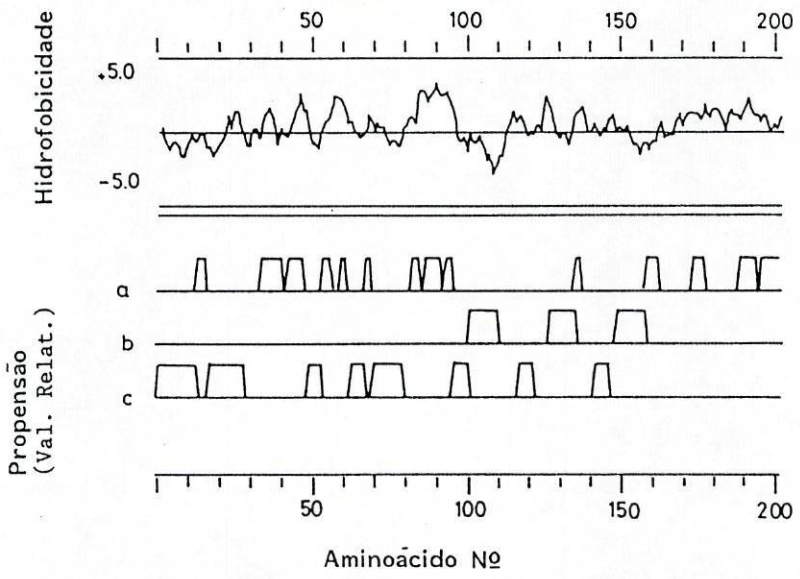


Figura 23. Características estruturais preditas para a subunidade de 29 kDa.

Painel superior: perfis de polaridade. Painel inferior: potencialidades para a formação de estruturas de hélices α (a), folha pregueada β (b) e enrolamento β (c).

O polipéptido sintetizado in vitro (fig. 2Ø) e a subunidade madura associada ao complexo I (figs. 4 e 6-8) apresentam a mesma massa molecular aparente de 29 kDa. Isto indica que esta subunidade do complexo I também não é sintetizada como um precursor contendo uma pré-sequência.

Como já referido, a metionina inicial é a única presente na sequência do polipéptido e este resíduo amino-terminal é frequentemente removido nos lisados de reticulócitos. Este facto poderá explicar não ter sido detectada a síntese do precursor em lisados de reticulócitos a partir de RNA poli(A) de N. crassa (v. secção 4.6, fig. 12). Contudo, na experiência da figura 2Ø foi detectado o precursor marcado com [^{35}S]metionina. Isto foi devido, provavelmente, a uma remoção incompleta do resíduo amino-terminal, associada a uma síntese mais eficiente do polipéptido (utilizando RNA específico neste último caso).

Não foi encontrada homologia significativa com outras sequências compiladas em versões actualizadas de bancos de dados de proteínas ou de DNA.

4.13. Importação da subunidade de 29 kDa por mitocôndrias isoladas de N. crassa

Utilizando um sistema de transcripção/tradução in vitro, como descrito acima, foi sintetizada a proteína de 29 kDa na presença de [^{3}H]valina. Depois, os lisados foram incubados com mitocôndrias isoladas de N. crassa tanto na presença como na ausência de valinomicina, um inibidor do potencial de membrana. Cada experiência foi efectuada em duplicado, tendo apenas uma das amostras sido depois tratada com proteinase K. Na ausência de valinomicina, o polipéptido foi importado pela mitocôndria (para um local resistente à proteinase, v. fig. 24A). Os fluorogramas de três experiências separadas foram analizados por densitometria, e foi estimado que cerca de 75% do polipéptido entrou na mitocôndria. Quando o potencial de membrana da mitocôndria foi abolido por acção da valinomicina, não ocorreu nem importação nem ligação do precursor à mitocôndria. Para confirmar que o material resistente à proteinase representa proteína importada, e não apenas resistência do polipéptido à digestão por proteinase K nas condições utilizadas, foi efectuada uma segunda experiência de importação. O material obtido foi dividido em duas metades. Uma das aliquotas foi tratada com Triton X-1ØØ e, em seguida, ambas as amostras foram tratadas com proteinase K. A figura 24B mostra que ocorreu digestão da proteína apenas na presença de detergente, indicando que esta tinha entrado na mitocôndria.

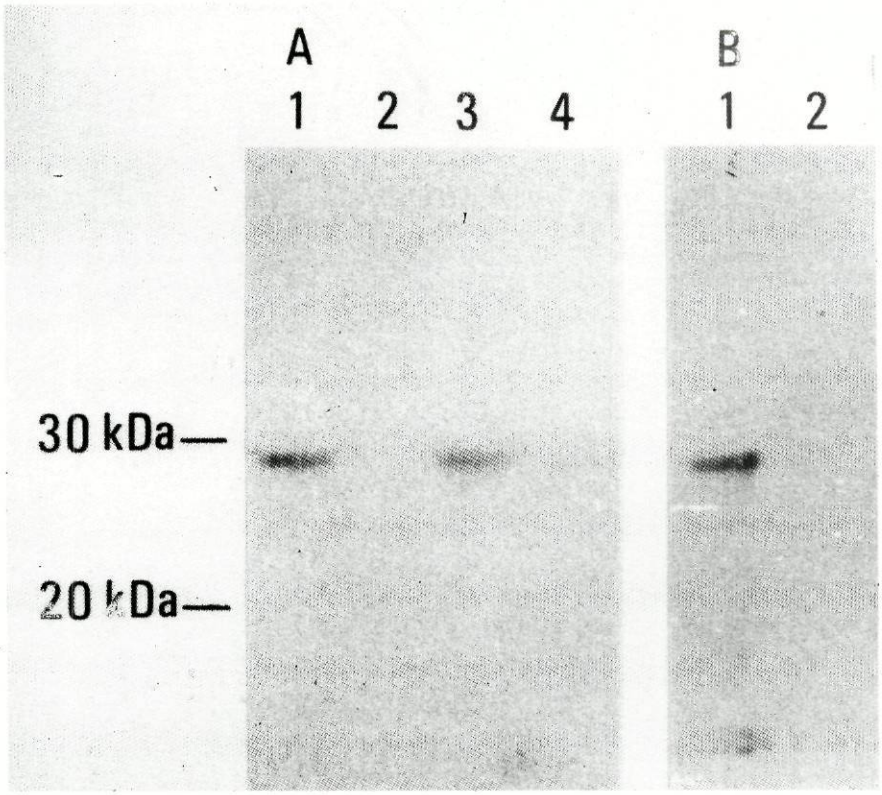


Figura 24. Importação da proteína de 29 kDa por mitocôndrias isoladas de N. crassa.

A figura mostra um fluorograma do gel. A) As experiências de importação foram efectuadas na ausência (pistas 1 e 3) ou na presença (pistas 2 e 4) de 1 μM valinomicina. Proteinase K foi adicionada às experiências das pistas 3 e 4 (conc. final de 80 μg/ml). B) Após uma experiência de importação, proteinase K foi adicionada na ausência (1) ou na presença (2) de 1% Triton X-100.

A proteína importada e a subunidade associada ao complexo I apresentam uma migração electroforética semelhante à do polipéptido precursor. Além disso, tratamento do polipéptido sintetizado in vitro com a peptidase processadora mitocondrial, uma enzima que remove sequências amino-terminais de proteínas mitocondriais importadas (Hawlitschek et al., 1988), não resulta numa migração electroforética alterada (fig. 25). Isto representa mais uma indicação de que a subunidade do complexo I de 29 kDa não é sintetizada com uma pré-sequência.

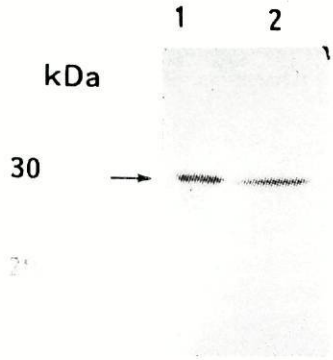


Figura 25. Tratamento do precursor da subunidade de 29 kDa sintetizado in vitro com a peptidase processadora mitocondrial purificada.

O plasmídeo pGEM4.5Ø6 foi transcripto com RNA polimerase SP6 e traduzido em lisados de reticulócitos de coelho na presença de [^{3}H]valina. Os lisados de reticulócitos foram incubados na ausência (1) ou na presença (2) da peptidase processadora mitocondrial, e analizados por SDS/PAGE e fluorografia.

Normalmente, os sinais que dirigem as proteínas para a mitocôndria contêm cargas positivas, são ampifílicos e estão localizados nas suas porções amino-terminais (Pfanner & Neupert 1987; Eilers & Schatz, 1988; Pfanner et al., 1988; Verner & Schatz,1988; Hartl et al., 1989). A região amino-terminal da proteína de 29 kDa assemelha-se claramente a uma sequência sinal, contendo resíduos de serina e treonina e resíduos básicos (lisina); o primeiro aminoácido acídico aparece na posição 33 (ácido glutâmico, v. fig. 22).

Os precursores de proteínas mitocondriais, que dependem de um potencial de membrana para serem importados, foram divididos em duas categorias: polipéptidos capazes (classe I) e incapazes (classe II) de ligar especificamente à mitocôndria na ausência de potencial de membrana (Pfanner et al., 1987a). Devido às suas características de importação, a subunidade do complexo I de 29 kDa pode ser incluída na classe II.

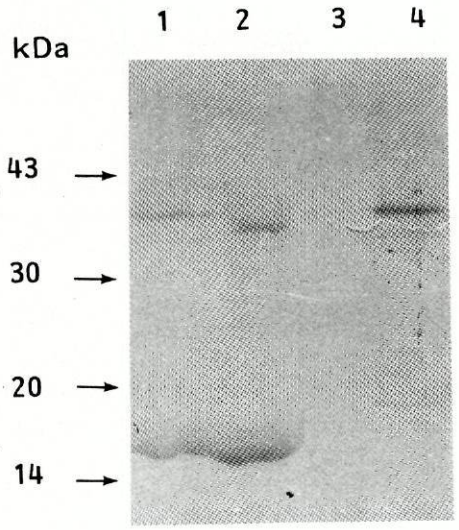


Figura 26. Expressão da subunidade de 31 kDa in vitro.

O plasmídeo pGEM4.6Ø6 foi transcripto com RNA polimerase SP6 e traduzido em lisados de reticulócitos de coelho na presença de [^{35}S]metionina. O fluorograma de um gel mostra os produtos de tradução totais incubados na ausência (1) ou na presença (2) da peptidase processadora mitocondrial, e o material obtido com um antissoro control (3) e com um antissoro contra a proteína de 31 kDa (4).

4.14. Expressão da subunidade de 31 kDa in vitro

A inserção de cDNA n° 62 foi marcada radioactivamente com [^{32}P]dATP e utilizada como sonda no rastreio do banco de cDNAs, por meio de hibridação. Foram isolados 6 fagos recombinantes independentes, e analizadas as inserções de cDNA neles contidas. A maior destas inserções (n° 6Ø6) foi subclonada no plasmídio pGEM4, gerando pGEM4.6Ø6.

O plasmídeo pGEM4.6Ø6 foi transcrito in vitro com RNA polimerase SP6. O RNA foi traduzido num sistema de lisados de reticulócitos na presença de [^{35}S]metionina, e a mistura foi tratada com um antissoro control (AS-22b) e com um antissoro contra a proteína de 31 kDa (AS-31). Os produtos de tradução totais e o material imunoprecipitado foram analisados separadamente por SDS/PAGE. A figura 26 mostra

que um polipéptido marcado radioactivamente e co-migrando com o precursor da proteína de 31 kDa (33 kDa, v. fig. 12 e tabela 2) pôde ser sintetizado e precipitado específicamente com AS-31. Após tratamento com a peptidase processadora mitocondrial, a proteína sintetizada nos lisados de reticulócitos (33 kDa) co-migra em gel com a subunidade madura (31 kDa, v. também fig. 26). Estes resultados sugerem fortemente que a inserção de cDNA 6Ø6 codifica a subunidade do complexo I de 31 kDa. Indicam ainda que esta proteína é realmente sintetizada como um precursor contendo uma pré-sequência e que a inserção de cDNA 6Ø6 contém toda a informação necessária para a síntese desse precursor.

4.15. Sequência de uma inserção de cDNA codificante do precursor da subunidade de 31 kDa

A estratégia utilizada para sequenciar a inserção de cDNA de pGEM4.6Ø6 está ilustrada na figura 27. A figura 28 mostra a sequência nucleotídica e a sequência proteica deduzida da proteína de 31 kDa. A inserção de cDNA inclui 1153 bp (foi estimado um tamanho de 1.3 kbp para o mRNA correspondente, v. fig. 15), e contém um quadro de leitura codificante de um polipéptido com 283 aminoácidos e uma massa molecular de 32247 dalton. Um codão de terminação TGA (nucleótidos -66 a -64 da fig. 28) precede, no mesmo quadro de leitura, o tripleto ATG, indicando que este representa o codão de iniciação para a síntese do precursor da proteína de 31 kDa.

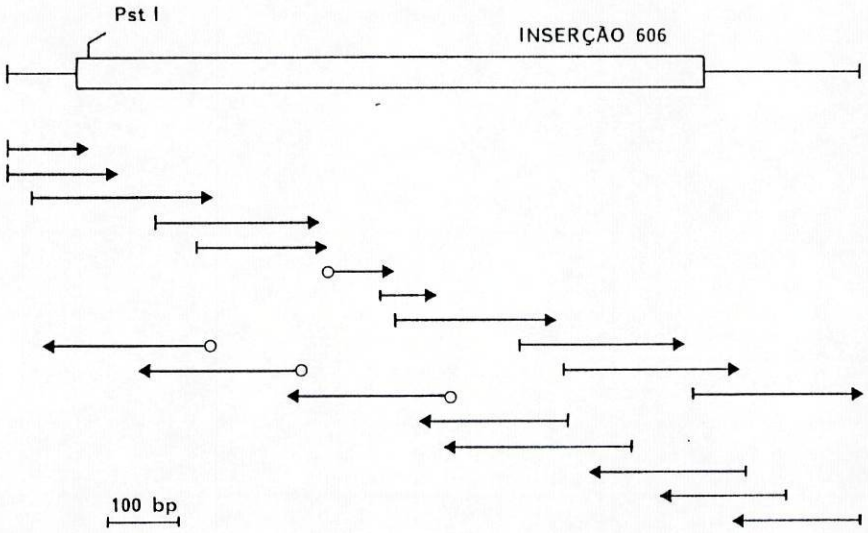


Figura 27. Estrutura e estratégia utilizada para a sequenciação da inserção de cDNA de pGEM4.606.

A caixa representa a região codificante. As setas indicam a direcção e extensão de sequência determinada. Oligonucleótidos iniciadores específicos foram utilizados para a determinação de algumas sequências (setas com círculos).

As pré-sequências de proteínas mitocondriais importadas são removidas pela peptidase processadora mitocondrial (Hawlitschek et al., 1988). A comparação entre os locais de clivagem de pré-sequências em 38 precursores diferentes não revelou uma sequência estrita de consenso, parecendo apenas importante que a posição -2 seja um aminoácido com carga positiva: foi notado que, em 21 de 22 casos típicos, esse resíduo é uma arginina (Hartl et al., 1989). Notámos ainda que isso é sempre verdade no caso de proteínas de N. crassa (7 exemplos). Assim, propomos que no caso do precursor da proteína de 31 kDa a clivagem ocorre entre os aminoácidos serina e alanina (posições 17 e 18 da fig. 28, respectivamente). Resultaria assim um polipéptido com 266 aminoácidos e uma massa molecular de 30446 dalton, em acordo com a massa molecular de 31 kDa estimada para a proteína madura por meio de SDS/PAGE.

```
                                    -92  CGAGGCTGCTGGCTGTTGTTGTTCCGTGATCC
-60 ATTGGCGCCTCTTCCCCAGTCTCGCCCATCTCGTTCAGGCCATCGCCAGCAACCTACAAG
                    Pst I
  1 ATGGCCAGCAAGCTCTGCAGAAGCAGGGCCCTGGCCTCTGCCCTGCGCTCCGCGAAGCCG
  1  M  A  S  K  L  C  R  S  R  A  L  A  S  A  L  R  S  A  K  P

 61 TCGCCAGCTATCAGGTGCCTCGCGACCACCAGCCGTAACCTTATCAACATGCCCGAACGC
 21  S  P  A  I  R  C  L  A  T  T  S  R  N  L  I  N  M  P  E  R

121 CCCAACCCGCGGCAGTTCCCCCGTGAGCCCCTGCCGGGCGCCCTGAATGCAGCCGTGGTC
 41  P  N  P  R  Q  F  P  R  E  P  L  P  G  A  L  N  A  A  V  V

181 AACCCGGCCGACAAGTACCAGTCCAAGGCCGACAATCTCCACAAGTACGGGTCGTGGCTC
 61  N  P  A  D  K  Y  Q  S  K  A  D  N  L  H  K  Y  G  S  W  L

241 ATGGGCTGTCTCCCCAAGTACATCCAGCAATTCTCGGTTTGGAAGGACGAGTTGACCATT
 81  M  G  C  L  P  K  Y  I  Q  Q  F  S  V  W  K  D  E  L  T  I

301 TACATTTCTCCCGCCGGAGTCATCCCTGTCTTTTCGTTCCTCAAGTACAATACGGCGGCC
101  Y  I  S  P  A  G  V  I  P  V  F  S  F  L  K  Y  N  T  A  A

361 GAATACACCCAAGTGAGTGACATCACTGCGGTTGATTTCCCCACCAAGGACCAGCGCTTC
121  E  Y  T  Q  V  S  D  I  T  A  V  D  F  P  T  K  D  Q  R  F

421 GAGGTCGTCTACAATCTGCTGAGCGTGCGCCACAACTCGAGAATCCGCGTCAAGACGTAC
141  E  V  V  Y  N  L  L  S  V  R  H  N  S  R  I  R  V  K  T  Y

481 GCCGACGAGGTGTCCCCCGTGCCCAGCATCACCCCCCTCTACGATGGCGCCAACTGGTAC
161  A  D  E  V  S  P  V  P  S  I  T  P  L  Y  D  G  A  N  W  Y

541 GAGCGCGAGGTCTACGATCTCTTTGGCGTCTTCTTCACCGGCCACCCGGACCTGCGCCGC
181  E  R  E  V  Y  D  L  F  G  V  F  F  T  G  H  P  D  L  R  R

601 ATCATGACCGACTACGGCTTCGACGGCCACCCGCTGCGCAAGGACTTCCCCATGACCGGC
201  I  M  T  D  Y  G  F  D  G  H  P  L  R  K  D  F  P  M  T  G

661 TACACCGAGATCCGCTACGACGAGGAGAAGAAGCGCATCGTGACGGAGCCTCTGGAGATG
221  Y  T  E  I  R  Y  D  E  E  K  K  R  I  V  T  E  P  L  E  M

721 ACACAGGCCTTCCGCAACTTTGAGGGTGGGTCCAGCGCCTGGGAGCAGGTCGGAGCCGGT
241  T  Q  A  F  R  N  F  E  G  G  S  S  A  W  E  Q  V  G  A  G

781 ATCGACCGCAAGCCCGAATCTTTCAAGCTCCCAACGCCGAAGCCGGAGACGAAGCCGGAG
261  I  D  R  K  P  E  S  F  K  L  P  T  P  K  P  E  T  K  P  E

841 GAGAAGAAGTAGACGGAAAGAAACGGCACACCAAACACCACTTCAAACACGAAATTTGGG
281  E  K  K

901 GGAGTGGAGAAAGGTTGTAGATATTTGCTGGGTATGGCAAGCCTTCTGCATCCAGCTGGT
961 TGGTTCTGTGGGTTTGCGCTTTGTAGATAGTTTACTCGGAGCACAGAACGAGAGCTACTA
1021 CTTAGATGGGGACGGCAATACAGAACGTCCACCACAAAAAA
```

Figura 28. Sequência nucleotídica da inserção de cDNA de pGEM4.606 e estrutura primária da proteína de 31 kDa daí deduzida.

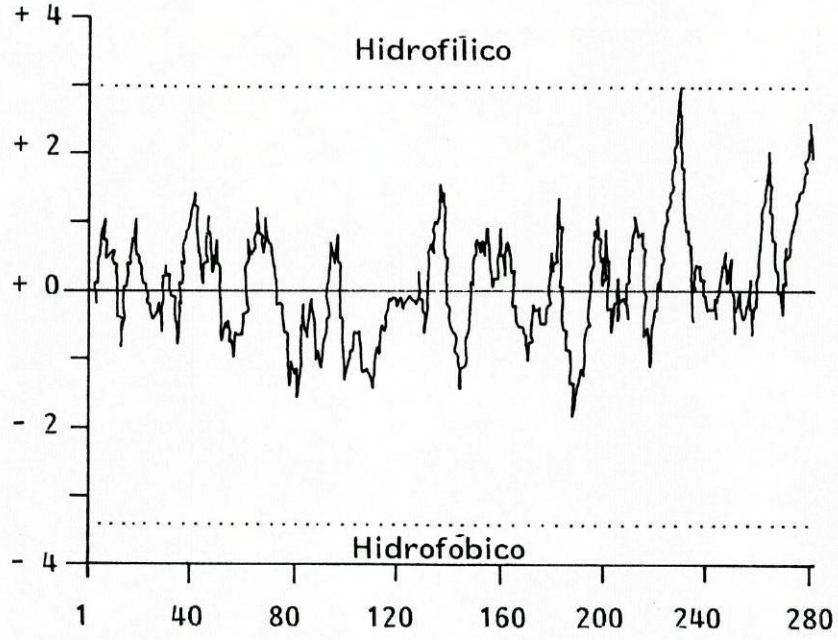


Figura 29. Perfil de polaridade predito para o precursor da subunidade de 31 kDa.

A figura 29 mostra que a subunidade de 31 kDa apresenta vários fragmentos hidrofóbicos, em contraste com as subunidades de 22 e 29 kDa, que poderão ser responsáveis pela resistência da proteína à sua extracção do complexo I com os agentes caotrópicos utilizados.

Foi encontrada homologia entre o polipéptido de 31 kDa e proteínas codificadas nos cloroplastos de várias espécies (resultados não mostrados), nomeadamente a proteína 157 de Synechocystis sp. PCC68Ø3 e a proteína 159 de milho (Steinmueller et al., 1989), a proteína 158 de Nicotiana tabacum (Shinozaki et al., 1986) e a proteína 169 de Marchantia polymorpha (Ohyama et al., 1986). Em cloroplastos, tinha sido já notada a existência de genes que potencialmente codificam homólogos de subunidades do complexo I sintetizadas na mitocôndria (Ohyama et al., 1986, 1988; Shinozaki et al., 1986; Matsubayashi et al., 1987). Mais recentemente, foi encontrada homologia entre 2 proteínas de cloroplastos, nomeadamente a proteína 392 de M. polymorpha (Ohyama et al., 1986) e a proteína 393 de N.

tabacum (Shinozaki et al., 1986), e uma subunidade citoplasmática de 49 kDa do complexo I bovino (Fearnley et al., 1989). Estes resultados levaram à sugestão de que, em cloroplastos, uma aglomeração de genes codifica componentes de uma enzima semelhante ao complexo I mitocondrial, possivelmente NADH:plastoquinona oxidorreductase (Fearnley et al., 1989). Os nossos resultados, mostrando um segundo exemplo de homologia entre proteínas de cloroplastos e uma subunidade do complexo I (de fungos) codificada no núcleo, sustentam esta hipótese.

5. COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho representa uma abordagem ao estudo do complexo I da cadeia respiratória de N. crassa. Grande parte do esforço foi dedicado à obtenção de instrumentos específicos para esse fim, como a produção de anticorpos contra proteínas individuais e o isolamento de clones codificantes de subunidades da enzima. Este material obtido permitirá seguir, mais detalhadamente, o processo de biogénese das proteínas, incluindo a transcrição dos genes respectivos, a sua síntese e o processo final de associação ao complexo I. Por outro lado, a síntese das proteínas in vitro possibilita também investigação sobre o processo de biogénese, incluindo a importação pelas mitocôndrias, e uma comparação entre estes fenómenos e os ocorridos in vivo. Mutagénese in vitro, e reintrodução dos genes mutados em células, poderá dar mais indicações sobre a função das respectivas proteínas no complexo I.

O estudo de organismos ou células com alterações ou deficiências em determinados processos celulares (mutantes), tem-se mostrado uma via única para elucidar variados fenómenos. Nesse sentido, foram já iniciados trabalhos preliminares em dois mutantes de N. crassa, putativamente deficientes em complexo I: um mutante "stopper" (Gross et al., 1984) e um mutante deficiente em síntese proteica mitocondrial (Videira, 1986; Videira et al., 1988). Notaram-se apenas ligeiras diferenças na estequiometria de algumas subunidades polipeptídicas do complexo I (padrão electroforético) e as proteínas isoladas neste trabalho parecem estar presentes nas mitocôndrias daqueles fungos (como deduzido por experiências de decoração imunológica). Isto não quer dizer que todas as subunidades estejam presentes e/ou associadas ao complexo I, nem dá qualquer indicação sobre a actividade enzimática.

Pelos motivos apresentados, e dada a complexidade desta unidade oligomérica, torna-se necessário o isolamento de mais proteínas e respectivos genes. Vários clones foram já obtidos com o antissoro contra a subunidade de 31 kDa do complexo I (v. Resultados e Discussão) e com antissoros contra as proteínas de 12.5 e 14 kDa, aguardando uma caracterização mais detalhada. O facto destes antissoros reconhecerem mais do que uma proteína requer uma análise mais cuidada dos clones. A determinação de estruturas primárias, além de ser útil per se, poderá indicar putativas funções das proteínas. Particularmente, suspeitamos que a proteína de 14 kDa é a subunidade que liga a ubiquinona, dada a coincidência de massa molecular e semelhanças no processo de isolamento com o "correspondente" polipéptido bovino (v. também Suzuki & Ozawa, 1986).

Verificada a existência de genes mitocondriais do complexo I homólogos em diferentes espécies, é de esperar que também haja equivalentes de genes nucleares. Os clones obtidos neste trabalho com N. crassa poderão, assim, servir para o isolamento dos genes desses organismos. Particularmente, os genes humanos deverão revelar-se úteis na detecção e/ou estudo de várias doenças neuromusculares.

Foi detectada homologia entre uma subunidade do complexo I de N. crassa e proteínas de cloroplastos de várias espécies. Haverá também o gene de uma proteína equivalente nos núcleos ou nas mitocôndrias de plantas? Ou será que proteínas codificadas em cloroplastos serão também constituintes de outros organelos celulares?

6. BIBLIOGRAFIA

Amersham (1987). cDNA Cloning System - lambda gt11. Amersham Buchler, Braunschweig, FRG.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.D., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. & Young, I.J. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 29Ø, 457-465.

Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977). Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196, 18Ø-182.

Berger, S.L. & Kimmel, A.R. (1987). Guide to molecular cloning techniques. Methods Enzymol. 15. Academic Press, London.

Bertrand, H., Collins, R.A., Stohl, L.L., Goewert, R.R. & Lambowitz, A.M. (198Ø). Deletion mutants of Neurospora crassa mitochondrial DNA and their relationship to the "stop-start" growth phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6Ø32-6Ø36.

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

Breitenberger, C.A. & RajBhandary, U.L. (1985). Some highlights of mitochondrial research based on analyses of Neurospora crassa mitochondrial DNA. Trends Biochem. Sci. 1Ø, 478-483.

Burger, G. & Werner, S. (1985). The mitochondrial URF1 gene in Neurospora crassa has an intron that contains a novel type of URF. J. Mol. Biol. 186, 231-242.

Calbiochem-Behring (1981). Hydroxylapatite; fast flow and high resolution. American Hoechst Corporation, La Jolla, USA.

Capaldi, R.A. (1988). Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. Trends Biochem. Sci. 13, 144-148.

Chen, E.J. & Seeburg, P.H. (1985). Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. DNA 4, 165-170.

Chen, S. & Guillory, R.J. (1981). Studies on the interaction of arylazido-β-alanyl NAD+ with the mitochondrial NADH dehydrogenase. J. Biol. Chem. 256, 8318-8323.

Chen, W.-J. & Douglas, M.G. (1987). The role of protein structure in the mitochondrial import pathway. Unfolding of mitochondrially bound precursors is required for membrane translocation. J. Biol. Chem. 262, 15605-15609.

Chomyn, A., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1986). URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. Science 234, 614-618.

Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1985). Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. Nature 314, 592-597.

Chomyn, A., Patel, S.D., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I. & Attardi, G. (1988). The site of synthesis of the iron-sulfur subunits of the flavoprotein and iron-protein fractions of human NADH dehydrogenase. J. Biol. Chem. 263, 16395-16400.

Cleeter, M.W.J., Banister, S.H. & Ragan, C.I. (1985). Chemical cross-linking of mitochondrial NADH dehydrogenase from bovine heart. Biochem. J. 227, 467-474.

Cleeter, M.W.J. & Ragan, C.I. (1985). The polypeptide composition of the mitochondrial NADH:ubiquinone reductase complex from several mammalian species. Biochem. J. 230, 739-746.

Davis, K.A. & Hatefi, Y. (1969). Kinetics of the resolution of complex I (reduced diphosphopyridine nucleotide-coenzyme Q reductase) of the mitochondrial electron transport system by chaotropic agents. Biochemistry 8, 3355-3361.

Davis, R.H. & de Serres, F.J. (1970). Genetic and microbiological research techniques for Neurospora crassa. Methods Enzymol. 17A, 79-143.

Deshaies, R.J., Koch, B.D. & Schekman, R. (1988). The role of stress proteins in membrane biogenesis. Trends Biochem. Sci. 13, 384-388.

de Vries, H., Alzner-DeWeerd, B., Breitenberger, C.A., Chang, D.D., de Jonge, J.C. & RajBhandary, U.L. (1986). The E35 stopper mutant of Neurospora crassa: precise localization of deletion endpoints in mitochondrial DNA and evidence that the deleted DNA codes for a subunit of NADH dehydrogenase. EMBO J. 5, 779-785.

de Vries, H., de Jonge, J.C., Van´tSant, P., Agsteribbe, E. & Arnberg, A. (1981). A "stopper" mutant of Neurospora crassa containing two populations of aberrant mitochondrial DNA. Curr. Genet. 3, 205-211.

Diagen (1988). The Qiagenologist; application protocols. Diagen, Düsseldorf, FRG.

Earley, F.G.P., Patel, S.D., Ragan, C.I. & Attardi, G. (1987). Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [^{3}H]dihydrorotenone. FEBS Lett. 219, 108-113.

Ellis, R.J. & Hemmingsen, S.M. (1989). Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. Trends Biochem. Sci. 14, 339-342.

Eilers, M. & Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. Nature 322, 228-232.

Eilers, M. & Schatz, G. (1988). Protein unfolding and the energetics of protein translocation across biological membranes. Cell 52, 481-483.

Fearnley, I.M, Runswick, J. & Walker, J.E. (1989). A homologue of the nuclear coded 49 kd subunit of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone reductase is coded in chloroplast DNA. EMBO J. 8, 665-672.

Fearnley, I.M. & Walker, J.E. (1987). Initiation codons in mammalian mitochondria: Differences in genetic code in the organelle. Biochemistry 26, 8247-8251.

Filser, M. & Werner, S. (1988). Pethidine analogues, a novel class of potent inhibitors of mitochondrial NADH:ubiquinone reductase. Biochem. Pharmacol. 37, 2551-2558.

Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B. & Weiss, H. (1989). A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated Neurospora crassa. Eur. J. Biochem. 180, 173-180.

Frostell, A., Mendel-Hartvig, I., Nelson, B.D., Toetterman, T., Bjoerkland, A. & Ragan, I. (1988). Evidence that the major primary biliary cirrhosis-specific mitochondrial autoantigen is a subunit of complex I of the respiratory chain. Scand. J. Immunol. 28, 157-165.

Galante, Y.M. & Hatefi, Y. (1979). Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys 192, 559-568.

George, C.L., Ferguson, S.J., Cleeter, M.W.J. & Ragan, C.I. (1986). Structural relashionships between the NADH dehydrogenases of Paracoccus denitrificans and bovine heart mitochondria as revealed by immunological cross-reactivities. FEBS Lett. 198, 135-139.

Gershoni, J.M. & Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. Anal. Biochem. 131, 1-15.

Gershwin, M.E., Mackay, I.R., Sturgess, A. & Coppel, R.L. (1987). Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. J. Immunol. 138, 3525-3531.

Gibb, G.M. & Ragan, C.I. (1989). Biosynthetic studies of several of the nuclear-encoded subunits of mammalian NADH dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 182, 367-372.

Gondal, J.A. & Anderson, W.M. (1985). The molecular morphology of bovine heart mitochondrial NADH-ubiquinone reductase; native disulfide-linked subunits and rotenone-induced conformational changes. J. Biol. Chem. 260, 12690-12694.

Gross, E. (1967). The cyanogen bromide reaction. Methods Enzymol. 11, 238-255.

Gross, S.R., Hsieh, T.-s. & Levine, P.H. (1984). Intramolecular recombination as a source of mitochondrial chromosome heteromorphism in Neurospora. Cell 38, 233-239.

Grunstein, M. & Hogness, D. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965.

Hallermayer, G., Zimmermann, R. & Neupert, W. (1977). Kinetic studies on the transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in intact cells of Neurospora crassa. Eur. J. Biochem. 81, 523-532.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hartl, F.-U., Pfanner, N., Nicholson, D.W. & Neupert, W. (1989). Mitochondrial protein import. Biochim. Biophys. Acta 988, 1-45.

Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem. 54, 1Ø15-1Ø69.

Hatefi, Y. & Hanstein, W.G. (1974). Destabilization of membranes with chaotropic ions. Methods Enzymol. 31, 77Ø-79Ø.

Hatefi, Y. & Stempel, K.E. (1969). Isolation and enzymatic properties of the mitochondrial reduced diphosphopyridine nucleotide dehydrogenase. J. Biol. Chem. 244, 235Ø-2357.

Hawlitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U. & Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. Cell 53, 795-8Ø6.

Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28, 351-359.

Heron, C., Smith, S. & Ragan, C.I. (1979). An analysis of the polypeptide composition of bovine heart mitochondrial NADH-Ubiquinone oxidoreductase by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. Biochem. J. 181, 435-443.

Holt, I.J., Harding, A.E. & Morgan-Hughes, J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331, 717-719.

Hopp, T.P. & Woods, K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3838.

Hunter, J.B. & Hunter, S.M. (1987). Quantification of proteins in the low nanogram range by staining with the colloidal gold stain AuroDye. Anal. Biochem. 164, 430-433.

Ise, W., Haiker, H. & Weiss, H. (1985a). Mitochondrial translation of subunits of the rotenone-sensitive NADH:ubiquinone reductase in Neurospora crassa. EMBO J. 4, 2075-2080.

Ise, W., Haiker, H. & Weiss, H. (1985b). Mitochondrial translation of subunits of the rotenone-sensitive NADH:ubiquinone reductase in Neurospora crassa. Em: Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research, vol II: Biogenesis (Quagliariello, E. et al. eds.) pp. 317-324. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Johnson, L.M., Snyder, M., Chang, L.M.S., Davis, R.W. & Campbell, J.L. (1985). Isolation of the gene encoding yeast DNA polymerase I. Cell 43, 369-377.

Kleene, R.,Pfanner, N., Pfaller, R., Link, T.A., Sebald, W., Neupert, W. & Tropschug, M. (1987). Mitochondrial porin of Neurospora crassa: cDNA cloning, in vitro expression and import into mitochondria. EMBO J. 6, 2627-2633.

Kuo, C.-F & Fridovich, I. (1988). A stain for iron-containing proteins sensitive to nanogram levels of iron. Anal. Biochem. 170, 183-185.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Leonard, K., Haiker, H. & Weiss, H. (1987). Three-dimensional structure of NADH:ubiquinone reductase (complex I) from Neurospora mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. J. Mol. Biol. 194, 277-286.

Lewin, A.S. & Norman, D.K. (1983). Assembly of F1-ATPase in isolated mitochondria. J. Biol. Chem. 258, 6750-6755.

Low, B. (1968). Formation of merodiploids in matings with a class of rec-recipient strains of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 160-167.

Maher, P.A. & Singer, S.J. (1986). Disulfide bonds and the translocation of proteins across membranes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83, 9001-9005.

Maniatis, T., Jeffrey, A. & van deSand, H. (1975). Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 14, 3787-3794.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mariottini, P., Chomyn, A., Riley, M., Cottrell, B., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1986). Identification of the polypeptides encoded in the unassigned reading frames 2, 4, 4L and 5 of human mitochondrial DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83, 1563-1567.

Matsubayashi, T., Wakasugi, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Zaita, N., Hidaka, T., Meng, B.Y., Ohto, C., Tanaka, M., Kato, A., Maruyama, T. & Sugiura, M. (1987). Six chloroplast genes (ndhA-F) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in ndhA and ndhB pre-mRNAs. Mol. Gen. Genet. 210, 385-393.

Meinhardt, S.W., Kula, T., Yagi, T., Lillich, T. & Ohnishi, T. (1987). EPR characterization of the iron-sulfur clusters in the NADH:ubiquinone oxidoreductase segment of the respiratory chain in Paracoccus denitrificans. J. Biol. Chem. 262, 9147-9153.

Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucl. Acids Res. 12, 7035-7056.

Meyer, J., Bruschi, M.H., Bonicel, J.J. & Bovier-Lapierre, G.E. (1986). Amino acid sequence of [2Fe-2S] ferredoxin from Clostridium pasteurianum. Biochemistry 25, 6054-6061.

Moreadith, R.W., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Batshaw, M.L. & Lehninger, A.L. (1987). Congenital deficiency of two polypeptide subunits of the iron-protein fragment of mitochondrial complex I. J. Clin. Invest. 79, 463-467.

Morgan-Hughes. J.A. (1986). Mitochondrial diseases. Trends Neurol. Sci., 15-19.

Moss, B. & Rosenblum, E.N. (1972). Hydroxylapatite chromatography of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. A new method for the separation of polypeptide subunits. J. Biol. Chem. 247, 5194-5198.

Müller, G. & Zimmermann, R. (1988). Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. EMBO J. 7, 639-648.

Nelson, M.A. & Macino, G. (1985). Gene organization and expression in Neurospora crassa mitochondria. Em: Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research, vol II: Biogenesis (Quagliariello, E. et al. eds.) pp. 293-304. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Nelson, M.A. & Macino, G. (1987). Structure and expression of the overlapping ND4L and ND5 genes of Neurospora crassa mitochondria. Mol. Gen. Genet. 206, 307-317.

Nishikimi, M., Hosokawa, Y., Toda, H., Suzuki, H. & Ozawa, T. (1988). The amino acid sequence of the 24-kDa subunit, an iron-sulfur protein, of rat liver mitochondrial NADH dehydrogenase deduced from cDNA sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157, 914-920.

Ohnishi, T., Blum, H., Galante, Y.M. & Hatefi, Y. (1981). Iron-sulfur N-1 clusters studied in NADH-ubiquinone oxidoreductase and in soluble NADH dehydrogenase. J. Biol. Chem. 256, 9216-9220.

Ohnishi, T., Ragan, C.I. & Hatefi, Y. (1985). EPR studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions of NADH:ubiquinone oxidoreductase. J. Biol. Chem. 260, 2782-2788.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Sano, T., Sano, S., Shirai, H., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S.-i., Inokuchi, H. & Ozeki, H. (1988). Structure and organization of Marchantia polymorpha chloroplast genome. I. Cloning and gene identification. J. Mol. Biol. 203, 281-298.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S.-i., Inokuchi, H. & Ozeki, H. (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort Marchantia polymorpha chloroplast DNA. Nature 322, 572-574.

Parham, P., Brodsky, M. & Drickamer, K. (1989). The occurrence of disulphide bonds in purified chlatrin light chains. Biocem. J. 257, 775-781.

Patel, S.D., Cleeter, M.W.J. & Ragan, C.I. (1988). Transmembrane organization of mitochondrial NADH dehydrogenase as revealed by radiochemical labelling and cross-linking. Biochem. J. 256, 529-535.

Pelham, H.R.B. & Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67, 247-256.

Pfanner, N., Hartl, F.-U. & Neupert., W. (1988). Import of proteins into mitochondria: a multi-step process. Eur. J. Biochem. 175, 205-212.

Pfanner, N., Müller, H.K., Harmey, M.A. & Neupert., W. (1987a). Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites. EMBO J. 6, 3449-3454.

Pfanner, N. & Neupert, W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: a potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier. EMBO J. 4, 2819-2825.

Pfanner, N. & Neupert, W. (1987). Biogenesis of mitochondrial energy transducing complexes. Curr. Top. Bioenerg. 15, 177-219.

Pfanner, N., Tropschug, M. & Neupert, W. (1987b). Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. Cell 49, 815-823.

Pharmacia (1983). Octyl-Sepharose CL-4B, Phenyl-Sepharose CL-4B; for hydrophobic interaction chromatography. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

Pharmacia (1984). Gel Filtration; theorie and practice. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

Pharmacia (1986). Affinity Chromatography; principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

Pharmacia (1987). Ion Exchange Chromatography; principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

Pilkington, S.J. & Walker, J.E. (1989). Mitochondrial NADH-ubiquinone reductase: complementary DNA sequences of import precursors of the bovine and human 24-kDa subunit. Biochemistry 28, 3257-3264.

Porpaczy, Z., Sumegi, B. & Alkonyi, I. (1987). Interaction between NAD-dependent isocitrate dehydrogenase, α-ketoglutarate dehydrogenase complex, and NADH:ubiquinone oxidoreductase. J. Biol. Chem. 262, 95Ø9-9514.

Ragan, C.I. (1976). NADH-ubiquinone oxidoreductase. Biochim. Biophys. Acta 456, 249-290.

Ragan, C.I. (1987). Structure of NADH-ubiquinone reductase (complex I). Curr. Top. Bioenerg. 15, 1-36.

Ragan, C.I., Galante, Y.M. & Hatefi, Y. (1982a). Purification of three iron-sulfur proteins from the iron-protein fragment of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. Biochemistry 21, 2518-2524.

Ragan, C.I., Galante, Y.M., Hatefi, Y. & Ohnishi, T. (1982b). Resolution of mitochondrial NADH dehydrogenase and isolation of two iron-sulfur proteins. Biochemistry 21, 590-594.

Ragan, C.I. & Heron, C. (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoicheiometric association. Biochem. J. 174, 783-790.

Reid, G.A. & Schatz, G. (1982a). Import of proteins into mitochondria. Yeast cells grown in the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone accumulate massive amounts of some mitochondrial precursor polypeptides. J. Biol. Chem. 257, 13056-13061.

Reid, G.A. & Schatz, G. (1982b). Import of proteins into mitochondria. Extramitochondrial pools and post-translational import of mitochondrial protein precursors in vivo. J. Biol. Chem. 257, 13062-13067.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol. 113*, 237-251.

Robson, B. & Garnier, J. (1986). *Introduction to Proteins and Protein Engineering*, Elsevier, Amsterdam.

Roise, D. & Schatz, G. (1988). Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem. 263*, 45Ø9-4511.

Sakakibara, R., Tominaga, N., Sakai, A. & Ishiguro, M. (1987). Electrophoretic separation of proteins on agarose gel. Application for direct immunization with a gel piece containing an antigen. *Anal. Biochem. 162*, 15Ø-155.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA 74*, 5463-5467.

Schulte, U., Arretz, M., Schneider, H., Tropschug, M., Wachter, E., Neupert, W. & Weiss, H. (1989). A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis. *Nature 339*, 147-149.

Schwab, A.J., Sebald, W. & Weiss, H. (1972). Different pool sizes of the precursor polypeptides of cytochrome oxidase from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem. 3Ø*, 511-516.

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. & Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J. 5, 2043-2049.

Sidhu, A. & Beattie, D.S. (1983). Kinetics of assembly of complex III into the yeast mitochondrial membrane; evidence for a precursor to the iron-sulfur protein. J. Biol. Chem. 258, 10649-10656.

Smith, S. & Ragan, C.I. (1980). The organization of NADH dehydrogenase polypeptides in the inner mitochondrial membrane. Biochem. J. 185, 315-326.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Steinmueller, K., Ley, A.C., Steinmetz, A.A., Sayre, R.T. & Bogorad, L. (1989). Characterization of the ndhC-psbG-ORF157/159 operon of maize plastid DNA and of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. Mol. Gen. Genet. 216, 60-69.

Stuart, R.A., Neupert, W. & Tropschug, M. (1987). Deficiency in mRNA splicing in a cytochrome c mutant of Neurospora crassa: importance of carboxy terminus for import of apocytochrome c into mitochondria. EMBO J. 6, 2131-2137.

Sumegi, B. & Srere, P.A. (1984). Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. J. Biol. Chem. 259, 15040-15045.

Sutcliffe, J.G. (1978). pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. Nucl. Acids Res. 5, 2721-2728.

Suzuki, H. & Ozawa, T. (1986). An ubiquinone-binding protein in mitochondrial NADH-ubiquinone reductase (complex I). Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1237-1242.

Tabor, S. & Richardson, C.C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl Acad. Sci. USA 84, 4767-4771.

Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H. & Neupert, W. (1982). Biogenesis of mitochondrial ubiquinol:cytochrome c reductase (cytochrome bc1 complex). J. Biol. Chem. 257, 10364-10371.

Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

Tropschug, M., Nicholson, D.W., Hartl, F.-U., Koehler, H., Pfanner, N., Wachter, E. & Neupert, W. (1988). Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of Neurospora crassa; One gene codes for both the cytosolic and mitochondrial forms. J. Biol. Chem. 263, 14433-14440.

Tropschug, M. & Neupert, W. (1989). Biogenesis of mitochondrial proteins. Em: Anion Carriers of Mitochondrial membranes (Azzi, A., Nalecz, K.A., Nalecz, M.J. & Wojtczak, L., eds) pp. 295-306, Springer-Verlag, Berlin.

Tzagoloff, A. & Myers, A.M. (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. Annu. Rev. Biochem. 55, 249-285.

Verner, K. & Schatz, G. (1987). Import of an incompletely folded precursor protein into isolated mitochondria requires an energized inner membrane, but no added ATP. EMBO J. 6, 2449-2456.

Verner, K. & Schatz, G. (1988). Protein translocation across membranes. Science 241, 13Ø7-1313.

Videira, A. (1986). Isolamento e caracterização preliminar de um mutante nuclear de Neurospora crassa deficiente em citocromo oxidase. Tese, Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica, parte II. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Videira, A., Teles Grilo, M.L., Werner, S. & Bertrand, H. (1988). Mitochondrial gene expression in a nuclear mutant of Neurospora deficient in large subunits of mitochondrial ribosomes. Genome 3Ø, 8Ø2-8Ø7.

von Bahr-Lindstroem, H., Galante, Y.M., Persson, M. & Joernvall, H. (1983). The primary structure of subunit II of NADH dehydrogenase from bovine-heart mitochondria. Eur. J. Biochem. 134, 145-15Ø.

Wachter, E. & Werhahn, R. (1979). Attachment of tryptophanyl peptides to 3-aminopropyl-glass suited for subsequent solid-phase Edman degradation. Anal. Biochem. 97, 56-64.

Wallace, D.C. (1989). Mitochondrial DNA mutations and neuromuscular disease. Trends Genet. 5, 9-13.

Wallace, D.C., Zheng, X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M. & Hopkins, L.C. (1988). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. Cell 55, 601-610.

Watmough, N.J., Birch-Machin, M.A., Bindoff, L.A., Aynsley-Green, A., Simpson, K., Ragan, C.I., Sherratt, H.S.A. & Turnbull, D.M. (1989). Tissue specific defect of complex I of the mitochondrial respiratory chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 160, 623-627.

Weiss, H., von Jagow, G., Klingenberg, M. & Bücher, T. (1970). Characterization of Neurospora crassa mitochondria prepared with a grind-mill. Eur. J. Biochem. 14, 75-82.

Werner, S. (1974). Isolation and characterization of a mitochondrially synthesized precursor protein of cytochrome oxidase. Eur. J. Biochem. 43, 39-48.

Werner, S. (1977). Preparation of polypeptide subunits of cytochrome oxidase from Neurospora crassa. Eur. J. Biochem. 79, 103-110.

Werner, S. (1989). Photoaffinity labelling of mitochondrial NADH:ubiquinone reductase with pethidine analogues. Biochem. Pharmacol. 38, 1807-1818.

Werner, S. & Sebald, W. (1981). Immunological techniques for studies on the biogenesis of mitochondrial membrane proteins. Methods Biochem. Anal. 27, 109-170.

Wielburski, A., Kuzela, S. & Nelson, B.D. (1982). Studies on the assembly of cytochrome oxidase in isolated rat hepatocytes. Biochem. J. 204, 239-245.

Wielburski, A. & Nelson, B.D. (1984). Heme a induces assembly of rat liver cytochrome c oxidase subunits I-III in isolated mitochondria. FEBS Lett. 177, 291-294.

Wikstroem, M. (1984). Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transfered between NADH and ubiquinone. FEBS Lett. 169, 300-304.

Yagi, T. (1986). Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from Paracoccus denitrificans. Arch. Biochem. Biophys 250, 302-311.

Yagi, T. (1987). Inhibition of NADH-ubiquinone reductase activity by N,N´-dicyclohexylcarbodiimide and correlation of this inhibition with the ocurrence of energy-coupling site 1 in various organisms. Biochemistry 26, 2822-2828.

Yagi, T. & Hatefi, Y. (1988). Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-binding subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). J. Biol. Chem. 263, 16150-16155.

Yagi, T., Hon-nami, K. & Ohnishi, T. (1988). Purification and characterization of two types of NADH-quinone reductase from Thermus thermophilus HB-8. Biochemistry 27, 2008-2013.

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983a). Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 80, 1194-1198.

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983b). Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. Science 222, 778-782.

Zauner, R., Christner, J., Jung, G., Borchart, U., Machleidt, W., Videira, A. & Werner, S. (1985). Identification of the polypeptide encoded by the URF-1 gene of Neurospora crassa mtDNA. Eur. J. Biochem. 150, 447-454.

Zhu, Q.-s. & Beattie, D.S. (1988). Direct interaction between yeast NADH-ubiquinone oxidoreductase, succinate-ubiquinone oxidoreductase, and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in the reduction of exogenous quinones. J. Biol. Chem. 263, 193-199.

Zimmermann, R. & Neupert, W. (1980). Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria in vitro. Eur. J. Biochem. 109, 217-229.

959TD

ERRATA

	Onde se lê:	Deve ler-se:
pag. i, lin. 22	Especialidade de Biologia Molecular	Especialidade de Genética