

Rafaela Ribeiro Agostinho

Papel da acetilação N-terminal na fertilidade e no
envelhecimento



Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2019

Rafaela Ribeiro Agostinho

Papel da acetilação N-terminal na fertilidade e no envelhecimento

Mestrado em Oncobiologia - Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho efectuado sob a orientação de:

Prof. Doutor. Rui Gonçalo Martinho

Doutor. Rui Silva



Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2019

“Papel da acetilação N-terminal na fertilidade e no envelhecimento”

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Rafaela Agostinho

a50386@ualg.pt

© **Rafaela Agostinho, 2019**

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos

Agradecimentos

Porque nunca é demais agradecer e reconhecer aqueles que nos ajudam, ao finalizar este projeto, não podia deixar de congratular todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa fosse possível. E, por isso, aqui expresso os meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Rui Martinho, pela confiança que depositou em mim, ao acreditar que eu seria capaz de trabalhar neste projeto e por me dar a oportunidade de aprender e enriquecer os meus conhecimentos. Na mesma medida, agradeço também ao meu co-orientador, Doutor Rui Silva, pelo apoio e pela transmissão de conhecimentos.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório, pelo espírito de entreajuda, pela prontidão no esclarecimento de dúvidas e pela partilha de conhecimentos ao longo desta jornada.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, à minha irmã e ao Tiago, pela paciência, pelo apoio e toda compreensão ao longo destes meses.

Resumo

A acetilação do N-terminal das proteínas tem um papel crucial em diferentes eventos celulares e moleculares, sendo umas das modificações proteicas mais abundantes em células eucariotas. As acetiltransferases N-terminal (NATs) são constituídas por uma subunidade catalítica e em alguns casos por uma ou mais unidades reguladoras possuindo, portanto, características individuais e atuando num conjunto de substratos específicos. A acetilação do N-terminal pode influenciar a função e a localização proteicas de diferentes formas, podendo afetar o normal desenvolvimento de organismos e a progressão tumoral.

Este trabalho tem por objetivo caracterizar a função do complexo NatC (Naa30) em *Drosophila melanogaster*. Naa30 é necessário para a longevidade e a perda de motilidade com a idade de moscas adultas. Naa30 é também necessário para a fertilidade dos machos uma vez que é essencial à copulação. A perda da função de Naa30 está associado a um aumento de agregados de proteínas poli-ubiquitinadas nos músculos, o que sugere que os fenótipos observados estão associados a defeitos de proteostase. No entanto, como em moscas velhas, o grau de perda de motilidade não está associado a níveis mais elevados de agregados, esta acumulação não é provavelmente causal para os fenótipos observados. Apesar das mitocôndrias serem aparentemente morfologicamente normais foi igualmente observado uma redução dos níveis de ATP em mutantes de *Naa30*. Concluimos então que a redução de longevidade, fertilidade e motilidade em mutantes de *Naa30* estão potencialmente relacionados com defeitos de proteostase e uma redução dos níveis celulares de ATP.

Em linhas celulares humanas, NatF (*Naa60*) é importante para a modificação de proteínas transmembranares e para a integridade do Golgi. Uma vez que a função desta NAT em organismos multicelulares é pouco conhecida, um outro objetivo deste trabalho foi fazer uma caracterização fenotípica de um mutante do gene *Naa60*. Observou-se que em *Drosophila*, *Naa60* não é essencial para a viabilidade de moscas adultas, nem para a fertilidade dos machos. Apesar da deleção desta NAT estar associada a uma ligeira redução da fertilidade das fêmeas, não foram detetados fenótipos óbvios durante a oogénese e os estádios iniciais de desenvolvimento do embrião.

Palavras-Chave: fertilidade; envelhecimento; acetilação N-terminal; NATs; NatC; NatF

Abstract

N-terminal acetylation of proteins plays a crucial role in different cellular and molecular events, being one of the most abundant protein modifications in eukaryotic cells. N-terminal acetyltransferases (NATs) are made up of a catalytic subunit and in some cases one or more regulatory units having therefore individual characteristics and acting on a set of specific substrates. N-terminal acetylation may influence protein function and localization in different ways and may affect normal organism development and tumour progression.

One of the aims of this work was to characterize the function of NatC (Naa30) in *Drosophila melanogaster*. Naa30 is required for the longevity and age-dependent motility of adult flies. Naa30 is also required for male fertility as it is essential for copulation. The loss of Naa30 function is associated with an increase in polyubiquitinated protein like-aggregates in the muscles, suggesting that the observed phenotypes result due to proteostasis defects. However, as the degree of motility loss is not associated with higher levels of polyubiquitinated protein like-aggregates, their accumulation is probably not causal for the observed phenotypes. Although the mitochondria were morphological normal, a reduction in ATP levels was observed in *Naa30* mutants. We conclude that the reduction in longevity, fertility and motility in *Naa30* mutants are potentially related to proteostasis defects and a reduction in cellular ATP levels.

NatF (*Naa60*) has been previously described in human cell lines as being important for transmembrane protein modification and Golgi integrity. Since the role of this NAT during the development of multicellular organisms is poorly described, another aim of this work was to make a phenotypic characterization of a *Naa60* deletion mutant. It was observed that in *Drosophila*, *Naa60* is not essential for the viability of adult flies, nor for male fertility. Although deletion of this NAT is associated with a slight reduction in female fertility, no obvious phenotypes were detected during oogenesis and early stages of embryo development.

Keywords: fertility; aging; N-terminal acetylation; NATs; NatC; NatF

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de Conteúdos	iv
Índice de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Acetilação N-terminal.....	2
1.1.1 Acetiltransferases N-terminal (NAT's)	2
a. Acetiltransferase N-terminal A.....	4
b. Acetiltransferase N-terminal B.....	5
c. Acetiltransferase N-terminal C.....	6
d. Acetiltransferase N-terminal D.....	8
e. Acetiltransferase N-terminal E.....	9
f. Acetiltransferase N-terminal F.....	10
g. Acetiltransferase N-terminal G.....	12
h. Acetiltransferase N-terminal H.....	12
1.1.2 Função da acetilação N-terminal.....	14
a) Papel na estabilidade de proteínas	15
b) Papel na formação de complexos proteicos.....	15
c) Papel na localização subcelular de proteínas.....	15
d) Papel no tráfego intracelular	16
e) Papel em <i>fold</i> ing e agregação de proteínas	16
f) Papel no desenvolvimento	17
g) Papel no cancro.....	18
2. Objetivos Principais	21

3. Materiais e Métodos	22
3.1 Ciclo de vida de <i>Drosophila Melanogaster</i>	22
3.2 Manutenção de <i>Drosophila</i>	23
3.2.1 Stocks e Cruzamentos	23
3.2.2 Dormência das moscas	23
3.3 Genética de mosca	23
3.3.1 Mutantes <i>Naa60</i>	23
3.3.2 Mutantes <i>Naa30</i>	24
3.4 Produção de <i>constructs</i> e moscas transgênicas	25
3.5 Transformação química	26
3.6 Fertilidade de Machos	27
3.7 Fertilidade de Fêmeas	27
3.8 Dissecção e marcação de ovários	28
3.9 Fixação e marcação de embriões	28
3.10 Co-imunoprecipitação	29
3.11 Espectrometria de Massa	30
3.12 Ensaio de Longevidade	31
3.13 Ensaio de Locomoção	31
3.14 Ensaio de voo	31
3.15 Avaliação dos níveis de ATP	32
3.16 Ensaio de copulação	32
3.17 Microscopia com contraste diferencial de interferência (DIC) de testículos vivos	32
3.18 Imunodeteção de proteínas mono- e poli-ubiquitinadas em músculos de <i>Drosophila</i> ...	33
3.19 Extratos proteicos	33
3.20 Imunodeteção de proteínas por <i>western blot</i>	34
3.20.1 SDS-PAGE	34
3.20.2 <i>Enhanced chemiluminescence Detection (ECL)</i>	34
4. Contribuições	35

5. Capítulo NatC (Naa30).....	36
5.1 Resultados	36
a. O gene CG11412 é a subunidade catalítica do complexo NatC, em <i>Drosophila melanogaster</i>	36
b. <i>dNaa30</i> é necessário para a longevidade de <i>Drosophila</i>	38
c. <i>dNaa30</i> é necessário para motilidade de <i>Drosophila</i>	38
d. <i>dNaa30</i> é necessário para manter os níveis normais de ATP, mas a sua deleção não está associada a alterações na rede muscular mitocondrial	40
e. <i>dNaa30</i> é necessário para evitar a acumulação de agregados proteicos nos músculos ..	41
f. Em indivíduos velhos, a acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas não se correlacionam com a perda da capacidade de locomoção	43
g. <i>dNaa30</i> é necessário para a fertilidade dos machos	44
h. <i>dNaa30</i> é necessário para a copulação.	45
i. Análise da função de Naa30B (CG32319) na espermatogénese.....	47
5.2 Discussão	49
6. Capítulo NatF (Naa60).....	52
6.1 Resultados	52
a. <i>dNaa60</i> não é um gene essencial ao desenvolvimento de <i>Drosophila</i>	52
b. <i>dNaa60</i> não é necessário para a fertilidade de machos.....	53
c. <i>dNaa60</i> é necessário para a fertilidade das fêmeas	55
d. <i>dNaa60</i> não é essencial para os estádios iniciais de desenvolvimento embrionário de <i>Drosophila</i>	57
e. <i>dNaa60</i> não é essencial para a oogénese	58
6.2 Discussão	60
7. Conclusões e perspectivas futuras.....	61
8. Bibliografia	62

Índice de Figuras

Figura 1 – Reação catalisada pelas acetiltransferases N-terminal.....	2
Figura 2 – Depleção de NAA60 afeta a fragmentação do Golgi e a correta segregação dos cromossomas.....	11
Figura 3 – Efeito da acetilação do N-terminal na regulação do destino proteico.....	14
Figura 4 – O gene CG11412 é a subunidade catalítica de <i>Drosophila</i> NatC.....	37
Figura 5 – <i>dNaa30</i> é necessário para a longevidade e para a normal motilidade de <i>Drosophila</i>	39
Figura 6 – <i>dNaa30</i> é necessário para manter os níveis normais de ATP, mas sua deleção não está associada a alterações óbvias na rede muscular mitocondrial	40
Figura 7 – <i>dNaa30</i> de <i>Drosophila</i> preserva a proteostase durante o envelhecimento	42
Figura 8 – A acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitadas não se correlacionam com a perda da capacidade de locomoção com a idade	44
Figura 9 – <i>dNaa30</i> de <i>Drosophila</i> é necessário para a fertilidade de machos, para a copulação e para a ocorrência de divisões nucleares sinciais, mas não é necessário para a espermatogénese.....	46
Figura 10 – Produção de um RNAi para o parálogo Naa30B (CG32319).....	48
Figura 11 – Proposta de modelo das funções de NatC (Naa30) em <i>Drosophila melanogaster</i>	51
Figura 12 – Linha mutante com deleção do CG18177 (Naa60).....	52
Figura 13 – <i>dNaa60</i> não é essencial para a fertilidade dos machos.....	54
Figura 14 – O gene <i>dNaa60</i> é essencial para a fertilidade das fêmeas	56
Figura 15 – <i>dNaa60</i> não é necessário para as divisões mitóticas embrionárias e para a formação da blastoderme.....	58
Figura 16 – <i>dNaa60</i> não é necessário durante o desenvolvimento do oócito.	59

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo da composição, localização, especificidade e função de cada complexo NAT, em células humanas.....	13
--	----

Lista de Abreviaturas

5-FU	5-Fluorouracil
Ac	Grupo acetil
Ac-CoA	Acetil-coenzima A
ARFRP1	<i>ADP-ribosylation factor-related protein 1</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
cDNA	DNA complementar
C-terminal	Terminal carboxilo
DIC	Contraste diferencial de interferência
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent</i>
ER	retículo endoplasmático
F-actina	Actina filamentosa
G-actina	Actina globular
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GNAT	<i>GCN5-related N-acetyltransferase</i>
hMDM20	<i>human mitochondrial distribution and morphology 20</i>
Htt	Huntingtina
HYPK	proteína chaperona que interage com a Huntingtina
iMet	Metionina iniciadora
KATs	Acetiltransferases de lisina
KDACs	Deacetilases de lisina
LC-MS-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
MeoH	Metanol

MetAps	Aminopeptidases de metionina
miR-1	Micro-RNA-1
MLC	<i>myosin light chain</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Nat	Acetiltransferase N-terminal
N-terminal	Terminal amina
OR	Oregon R
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
peroxidase HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
PI(4)P	Fosfatidilinositol 4-fosfato
pV22	pVallium22
RNAi	RNA interferência
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SRP	Partícula de reconhecimento do sinal
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
Ub	ubiquitina
UPS	Sistema ubiquitina-proteosoma
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEGFR-2	Recetor VEGF-2
zTOR	<i>zebrafish target of rapamycin</i>

1. Introdução

As proteínas são importantes macromoléculas biológicas, presentes em todos os organismos vivos, compostas por aminoácidos ligados entre si covalentemente, através da ligação peptídica entre o grupo carboxilo de um aminoácido e o grupo amina de outro aminoácido. Cada proteína tem uma sequência específica e, dependendo da informação codificada pelos genes, pode ter variadas funções (Alberts et al., 2015).

A síntese proteica não origina por si só macromoléculas funcionais e estruturalmente completas. As proteínas sofrem vários tipos de modificações que podem ocorrer à medida que a cadeia é sintetizada (modificação co-transducional) ou após a sua síntese (modificação pós-transducional).

Uma das modificações proteicas mais comuns são as modificações químicas que introduzem novos grupos funcionais nas proteínas e podem ocorrer co- ou pós-transducionalmente. As modificações químicas mais comuns são a acetilação, fosforilação, metilação, glicosilação, sumoilação e ubiquitinação. Em alguns casos, essas modificações são reversíveis e podem não só alterar a vida útil da proteína, como a sua atividade e localização celular (Lodish et al., 2000). Os resíduos internos da cadeia polipeptídica sofrem maioritariamente fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina, contudo a metilação, a carboxilação e a hidroxilação, também constituem importantes modificações nos resíduos internos da proteína (Lodish et al., 2000). As proteínas eucarióticas podem também ser modificadas a nível do C-terminal e/ou do N-terminal, por uma ou mais enzimas. Estas modificações ocorrem maioritariamente após a síntese da cadeia polipeptídica e são essenciais para a regulação de proteínas. São modificações que têm um contributo importante na multiplicidade e complexidade proteómica podendo, por sua vez, ter um impacto na sinalização celular. No caso do N-terminal, uma vez que o grupo amina é carregado positivamente e tem um pH neutro, ocorrem reações como a acetilação, metilação, propionilação, palmioilação, miristoilação e ubiquitinação. Cada uma dessas modificações é catalisada por complexos enzimáticos específicos e, conseqüentemente, a desregulação dessas enzimas pode estar implicada em doenças humanas (revisado em Varland et al., 2015).

1.1 Acetilação N-terminal

Uma das modificações proteicas mais abundantes é a acetilação N-terminal. Esta reação é mediada pelas acetiltransferases do N-terminal (NATs), que fazem a transferência de um grupo acetil (COCH_3), proveniente de uma acetil-coenzima A (ac-CoA), para um grupo α -amina livre (NH_3^+), no N-terminal de um polipéptido (revisto em Varland et al., 2015) (Figura 1). A acetilação N-terminal, contrariamente à generalidade das modificações proteicas, ocorre na maioria dos casos co-transducionalmente, ou seja, durante a tradução da proteína quando a cadeia de aminoácidos emerge do ribossoma e é catalisada pelas proteínas não ribossomais acima referidas (revisto em Aksnes et al., 2016). A acetilação pode também ocorrer na cadeia interna dos polipéptidos no grupo ϵ -amina das lisinas presentes na cadeia polipeptídica, contudo, esta modificação é catalisada por um grupo diferente de enzimas, as acetiltransferases de lisina (KATs) (Choudhary et al., 2014). A acetilação de lisinas é reversível, sendo a reação de deacetilação catalisada pelas deacetilases de lisina (KDACS). Contrariamente, ao descrito para a acetilação de lisinas, a deacetilação do N-terminal ainda não está descrita pelo que é considerada uma reação irreversível (Figura 1).

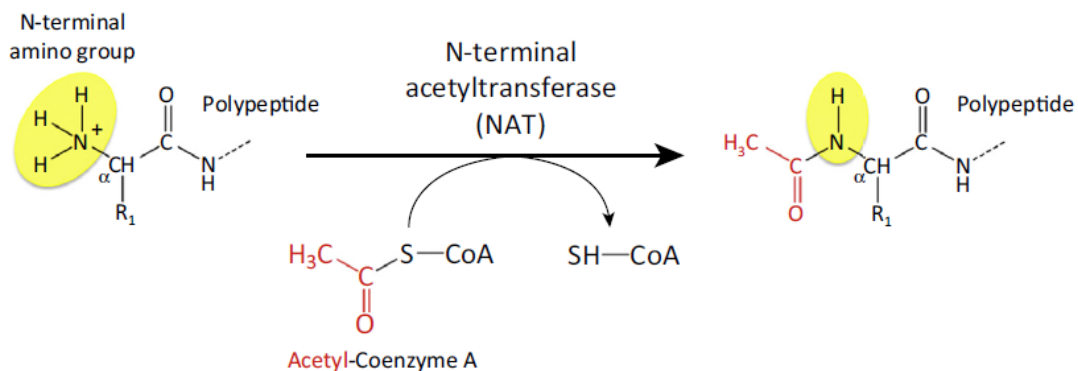


Figura 1 - Reação catalisada pelas acetiltransferases N-terminal. Transferência de um grupo acetil (COCH_3 , vermelho), proveniente de uma acetil-coenzima A, para um grupo α -amina livre (NH_3^+ , amarelo), no N-terminal de um polipéptido. Retirado de (Aksnes et al., 2016)

1.1.1 Acetiltransferases N-terminal (NAT's)

Até ao momento, estão descritas oito acetiltransferases N-terminal (NatA, NatB, NatC, NatD, NatE, NatF, NatG e NatH). Em organismos eucarióticos, a maioria das NATs (NatA-NatE) é conservada e está localizada no citosol, associada a ribossomas, onde executam a

acetilação co-trasducional do N-terminal (Aksnes et al., 2016). Contudo, algumas NATs têm capacidade de acetilar após o evento de tradução da cadeia polipeptídica, como é o caso da NatF (Aksnes et al., 2015) e NatH (Drazic et al., 2018) (Tabela 1).

Apesar de, a maioria das NATs ser conservada, algumas delas estão apenas descritas em organismos multicelulares, como é o caso da NatH (Drazic et al., 2018) e NatG (Dinh et al., 2015), estando esta última apenas descrita em plantas, sem nenhum ortólogo humano. Um facto interessante, que demonstra que estes complexos enzimáticos são filogeneticamente antigos é que, embora o número de complexos NAT seja superior em células eucarióticas comparativamente a organismos procariontes, foi observado que a maioria dos complexos presentes em humanos (NatA-NatF) se diversificaram antes da evolução dos organismos eucariotes, uma vez que todos eles já estavam presentes no último ancestral comum eucariota (Rathore et al., 2016b).

A atividade das NATs requer um complexo NAT constituído por uma subunidade catalítica que pode estar associada a uma, ou mais, subunidades auxiliares (Gautschi et al., 2003; Liszczak et al., 2013; Polevoda et al., 2008). As subunidades catalíticas detêm atividade transferase e, juntamente com algumas das acetiltransferases de lisina (KATs), pertencem à superfamília *GCN5-related N-acetyltransferase* (GNAT) (Vetting et al., 2005; Neuwald and Landsman, 1997). O domínio GNAT é composto por um motivo de ligação à acetil coenzima A, que catalisa a transferência do grupo acetil, e é uma característica evolutivamente conservada das NATs, uma vez que todas as enzimas compartilham deste domínio estrutural (revisto em Aksnes et al., 2016). As subunidades auxiliares podem mediar a ancoragem ao ribossoma e, em alguns casos, contribuem para a especificidade do substrato (Gautschi et al., 2003; Liszczak et al., 2013; Polevoda et al., 2008), no entanto, alguns complexos NAT ainda não têm subunidades auxiliares identificadas (Tabela 1).

A ocorrência de acetilação não depende somente do complexo NAT mas, também, da identidade dos dois primeiros aminoácidos do N-terminal do polipéptido, ou seja, conforme os aminoácidos presentes no N-terminal do polipéptido, há uma propensão para o grupo amina ser acetilado por uma NAT específica (revisto em Starheim et al., 2012). Todas as proteínas passíveis de sofrer acetilação do N-terminal tornam-se substratos das NATs e, constituem o Nt-Acetiloma (revisto em Aksnes et al., 2016; Aksnes et al., 2019). Estima-se que, a acetilação do N-terminal possa ocorrer em 50-70% das proteínas da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), em 70-80% das proteínas de *Drosophila melanogaster* e em 80–

90% do proteoma humano (Brown and Roberts, 1976; Arnesen et al., 2009; Bienvenut et al., 2012; Goetze et al., 2009; Damme et al., 2011).

A NatA é um dos maiores complexos NATs sendo responsável por quase 40% da acetilação do Nt-acetiloma humano (revisto em Aksnes et al., 2016; Aksnes et al., 2019). Este complexo tem especificidade para acetilar aminoácidos relativamente pequenos como a Alanina, Serina, Treonina, Valina, Cisteína e por vezes Glicina, mas apenas depois da remoção da metionina iniciadora (iMet) via aminopeptidases de metionina (MetAPs) (Mullen et al., 1989; Arnesen et al., 2009; Frottin et al., 2006). NatD atua igualmente após a remoção da iMet do polipéptido, contudo, tem uma acção mais seletiva ao acetilar apenas a região N-terminal das histonas H2A e H4 (SGG) (Polevoda et al., 2009; Hole et al., 2011). Outras NATs, como é o caso da NatC, NatE e NatF acetilam preferencialmente a iMet seguidas por um aminoácido hidrofóbico/anfipático (ML, MI, MF, MY e MK) (Polevoda and Sherman, 2001; Starheim et al., 2009a; Evjenth et al., 2009; Damme et al., 2011). A NatB acetila preferencialmente iMet seguidas de um aminoácido ácido, tal como o Aspartato, Glutamato e Glutamina (MD, ME e MQ) (Polevoda et al., 1999; Damme et al., 2012). A NatG, identificada apenas em plantas (Dinh et al., 2015), tem preferência para acetilar Metionina, Alanina, Serina e Treonina (Tabela 1). Como muitas NATs partilham especificidade pelo mesmo tipo de aminoácidos, há uma redundância parcial entre NATs, como é o caso da NatC e NatF (Osberg et al., 2016).

a. Acetiltransferase N-terminal A

A acetiltransferase N-terminal A foi o primeiro complexo NAT a ser descoberto, sendo conservado em organismos eucariontes, não só na composição das subunidades como na especificidade pelos substratos. Dado que acetila preferencialmente aminoácidos pequenos, após a remoção da metionina iniciadora, pela aminopeptidase de metionina, faz com que seja um dos complexos mais prevalentes no Nt-acetiloma humano uma vez que estes aminoácidos estão altamente representados na segunda posição das cadeias polipeptídicas de eucariotas (Rathore et al., 2016b).

NatA é composta pela subunidade catalítica Naa10 e pela subunidade auxiliar Naa15 (Arnesen et al., 2005; Mullen et al., 1989) e uma vez que se associam aos ribossomas, tal suporta a hipótese que a acetilação acontece co-traducionalmente, quando a cadeia

polipeptídica nascente emerge do ribossoma (Gautschi et al., 2003). A subunidade Naa15 é essencial, não só porque medeia a ancoragem com complexo NatA com o ribossoma, como também contribui e modula a especificidade de Naa10 para os substratos (Gautschi et al., 2003; Magin et al., 2017; Varland and Arnesen, 2018; Liszczak et al., 2013). A proteína chaperona que interage com a Huntingtina (HYPK) (Raychaudhuri et al., 2008) também faz parte deste complexo e é essencial para a sua estabilidade e regulação da acetilação de algumas proteínas (Arnesen et al., 2010). Em humanos, as subunidades do complexo NatA também estão presentes em frações independentes do ribossoma, o que sugere que elas possuem outras funções a nível celular, para além da acetilação co-traducional do domínio N-terminal de proteínas (Hua et al., 2011).

Em levedura, a deleção das subunidades Naa10 ou Naa15 afeta o seu crescimento e viabilidade (Polevoda and Sherman, 2003). Curiosamente, em linhas celulares humanas a depleção de hNaa10 e hNaa15 promove tanto o aumento, como a diminuição, do crescimento celular e possui um efeito pró- ou anti-apoptótico, dependendo do tipo de célula ou estímulo celular (Yi et al., 2011; Gromyko et al., 2010).

b. Acetiltransferase N-terminal B

O complexo hNatB é composto pela subunidade catalítica Naa20 e pela subunidade auxiliar Naa25 ou hMDM20 (*human mitochondrial distribution and morphology 20*) e ambas são essenciais para atividade enzimática (Polevoda et al., 2003; Starheim et al., 2008). A subunidade auxiliar é responsável por se associar os substratos específicos do complexo que são compostos maioritariamente por metioninas na primeira posição com um resíduo ácido na segunda posição do polipéptido (Hong et al., 2017).

NatB é essencial para a sobrevivência da levedura em diferentes ambientes de stress, pois regula a interação entre a tropomiosina e a actina, através da acetilação do N-terminal dessas proteínas (Polevoda et al., 2003). Em linhas celulares humanas, foi umas das primeiras NATs a estar relacionada com a normal progressão do ciclo celular, uma vez que a depleção das subunidades deste complexo afeta a progressão do ciclo celular e induz o crescimento de células tumorais (Starheim et al., 2008).

c. Acetiltransferase N-terminal C

O complexo NatC é também evolutivamente conservado em organismos eucarióticos, na composição das subunidades catalítica (Naa30/Mak3) e auxiliares (Naa35/Mak10 e Naa38/Mak31), localização, atividade enzimática e a especificidade para substratos (Polevoda and Sherman, 2001; Starheim et al., 2009a).

Em *S. cerevisiae*, o complexo NatC mostrou ser essencial para a localização subcelular da GTPase Arl3p e a sua associação com a membrana do aparelho de Golgi (Behnia et al., 2004) e para a associação da proteína Trm1p-II com a membrana nuclear interna (Murthi and Hopper, 2005). Contudo, apesar do efeito observado, NatC não é um determinante geral da localização celular de proteínas, uma vez que a grande maioria dos substratos analisados não sofreu qualquer alteração na sua localização subcelular em mutantes de NatC (Aksnes et al., 2013).

Foi também observado que em peixe-zebra o complexo NatC é essencial para a regulação do crescimento embrionário, em parte através da regulação da cinase TOR (*Target of Rapamycin*) (Wenzlau et al., 2006). A depleção de Naa30 levou a uma diminuição da proliferação celular, aumentou a apoptose e levou a um fraco desenvolvimento dos vasos sanguíneos (Wenzlau et al., 2006).

O complexo humano, hNatC, é composto pela subunidade catalítica Naa30 e pelas subunidades auxiliares Naa35 e Naa38, que se associam aos ribossomos (Polevoda and Sherman, 2001; Starheim et al., 2009a; Polevoda et al., 2008). Tal como observado em levedura, hNatC também parece controlar a localização de algumas GTPases como é o caso de Arl8b. Arl8b é uma enzima que se localiza nos lisossomos, sendo a sua sobreexpressão a causa da acumulação dos mesmos na periferia da célula (Hofmann and Munro, 2006; Starheim et al., 2009a).

Ao contrário de outras GTPases da família Arf, Arl8 não possui uma glicina na segunda posição do seu N-terminal o que invalida a ocorrência de miristoilação, modificação proteica característica desta família de GTPases e responsável pela sua associação às membranas (Gillingham and Munro, 2007; Donaldson and Jackson, 2012). Em Arl8, o segundo resíduo presente na cadeia de polipéptidos é uma leucina (L), tornando-a um potencial substrato de hNatC. Assim, dada a sua sequência polipeptídica (MLALI) foi estudado se hArl8b seria um substrato *in vivo* de hNaa30, uma vez que este complexo tem especificidade para catalisar sequências com metioninas seguidas de aminoácidos hidrofóbicos (Polevoda and Sherman,

2001; Starheim et al., 2009a). Através da depleção de hNaa30, foi possível observar uma alteração subcelular de Arl8b sugerindo que a acetilação mediada pelo complexo NatC é necessária para a sua localização lisossomal desta GTPase. Curiosamente, esta localização depende igualmente da sequência de aminoácidos presentes na sua porção N-terminal uma vez que sem a presença de qualquer aminoácido hidrofóbico, Arl8 perde a sua localização lisossomal (Starheim et al., 2009a).

Apesar do transporte lisossomal não estar totalmente compreendido, é sabido que os lisossomas têm capacidade de se mover bidireccionalmente ao longo dos microtúbulos, através de proteínas motoras, como a dineína e a cinesína (Jordens et al., 2001; Harada et al., 1998; Matteoni and Kreis, 1987). Neste estudo, foi também observado que a mobilidade através dos microtúbulos é essencial para manter a correta distribuição de lisossomas na zona perinuclear e na periferia da célula. Contudo, o direcionamento lisossomal não está sob a regulação do ciclo celular e a proteína não está envolvida no fuso mitótico. A depleção de hNatC resulta numa diminuição da taxa de síntese de DNA e em morte celular, por apoptose dependente de p53 (Starheim et al., 2009a).

Num outro estudo, observou-se que a depleção de hNaa30 reduz significativamente a expressão de proteínas na mitocôndria (Damme et al., 2016), com a perda do potencial de membrana mitocondrial e a fragmentação da mitocôndria, sugerindo que hNaa30 é necessário para a integridade e viabilidade das mesmas. Contudo, a depleção de hNaa30 não causa um distúrbio geral na homeostase organelar, não tendo sido observadas alterações globais na morfologia e distribuição de outros organelos como o retículo endoplasmático, os endossomas e peroxissomas, nem na arquitetura dos microtúbulos e o citoesqueleto de actina. Em conjunto, isto sugere que, a fragmentação mitocondrial observada, causada pela depleção de hNaa30, não é um resultado de uma disrupção geral de todos os organelos das células ou dos rearranjos do citoesqueleto, sendo hNaa30 essencial para a integridade, função e morfologia da mitocôndria (Damme et al., 2016). Ao contrário de estudos anteriores (Starheim et al., 2009a), recentemente mostrou-se que o processo de fragmentação mitocondrial é independente da apoptose induzida por p53 (Damme et al., 2016). hNaa30 é essencial para manter os níveis de proteína das subunidades auxiliares, Naa35 e Naa38, não sendo um determinante geral para a localização subcelular de proteínas mitocondriais (Damme et al., 2016).

A depleção de hNaa30 afeta igualmente a integridade do complexo Golgi e a normal distribuição da GTPase ARFRP1 (*ADP-ribosylation factor-related protein 1*), o ortólogo da proteína de levedura Arl3 e que regula o tráfego da membrana e possui importantes funções durante o desenvolvimento embrionário de ratinhos (Mueller et al., 2002).

A fragmentação do complexo de Golgi ocorre em diferentes processos celulares, tais como a mitose, durante o tráfego de organelos, ou a apoptose (Gonatas et al., 2006; Kreft et al., 2010). A fragmentação induzida pela depleção de hNaa30 mostrou-se independente da mitose ou apoptose, não sendo a localização aberrante de ARFRP1 no complexo de Golgi causada por perda de associação com a membrana. Curiosamente, a depleção de ARFRP1 não afeta a morfologia do complexo de Golgi, indicando que a fragmentação observada em células depletadas para hNaa30, não é causada por uma perda de função/localização de ARFRP1 (Starheim et al., 2017).

d. Acetiltransferase N-terminal D

O complexo NatD é apenas composto apenas pela subunidade catalítica Naa40, sendo a única NAT ribossomal sem nenhuma subunidade auxiliar (Song et al., 2003; Hole et al., 2011). NatD é altamente conservada em organismos eucarióticos acetilando específica e unicamente as histonas H2A e H4 (Song et al., 2003; Damme et al., 2011; Rathore et al., 2016b). Os substratos são primeiramente processados pelas MetAps, para excisar a metionina iniciadora, e seguidamente a serina (Met-Ser-Gly) é acetilada pela NatD (Naa40).

Em *S. cerevisiae*, a acetilação do N-terminal da histona H4 parece ter um papel importante a nível da modificação das histonas, mais concretamente na regulação da metilação de argininas e no silenciamento da cromatina (Schiza et al., 2013).

Em humanos, hNaa40, tem um papel importante na regulação do crescimento e sobrevivência de células cancerígenas (Pavlou and Kirmizis, 2016). Apesar de não ter qualquer efeito na viabilidade celular de fibroblastos embrionários de ratinho, foi observado que a depleção de Naa40 influencia negativamente a sobrevivência de células cancerígenas, através da indução da apoptose. Em células do cancro colorretal (HCT116 e HT-29), a depleção de hNaa40 parece promover a ativação da cascata apoptótica intrínseca, ou mitocondrial, dependente da caspase 9, contudo, o processo apoptótico parece independente do gene p53. Observou-se que células nulas para o gene ($p53^{-/-}$) (HCT116) mostram uma

igualmente perda da viabilidade celular, quando depletadas para Naa40, comparativamente a células na presença da proteína, sugerindo que p53 não é requerido para a apoptose induzida pela depleção de Naa40 (Pavlou and Kirmizis, 2016).

A comparação entre tecidos benignos e malignos, permitiu aferir que os níveis de mRNA e da proteína Naa40 estão mais elevados em tecidos primários malignos de cancro colorretal e que, a depleção de Naa40, não só inibe a proliferação e a sobrevivência das células cancerígenas, como aumenta a sensibilidade ao tratamento com 5-Fluorouracil (5-FU). Além disso, a ausência de Naa40 diminui expressivamente o crescimento de xenoinxertos de tumores humanos (Demetriadou et al., 2019).

Em conjunto, estas observações sugerem que Naa40 pode ser um importante mediador oncogénico, através da regulação de apoptose. Tendo em conta a especificidade para substratos H2A e H4 e ao seu efeito em células cancerígenas, Naa40 é portanto um bom alvo terapêutico para tratamento do cancro.

e. Acetiltransferase N-terminal E

NatE é composto pela subunidade Naa50 e pelas subunidades Naa10 e Naa15, as mesmas que compõem o complexo NatA (Gautschi et al., 2003; Arnesen et al., 2006). Apesar de NatE ser composto por Naa10, este complexo acetila um conjunto diferente de substratos, comparativamente a NatA, uma vez que acetila péptidos com metioninas seguidas de aminoácidos hidrofóbicos. Possui assim afinidade por substratos semelhante à dos complexos NatC e NatF, existido por isso alguma redundância entre estas NATs (Evjenth et al., 2009; Starheim et al., 2009b). Apesar de Naa50 ser igualmente encontrada na forma monomérica em ensaios de cromatografia, por separação de tamanho molecular (Hou et al., 2007; Rathore et al., 2016a), ainda não foi demonstrado que acetile substratos *in vivo*. Uma vez que Naa50 se associa às subunidades de NatA, surgiu a hipótese de que Naa50 poderia também regular o complexo NatA, no entanto a depleção de Naa50 não afectou os níveis de expressão das subunidades, catalítica (Naa10) e auxiliar (Naa15), do complexo NatA (Hou et al., 2007).

Em levedura não foi descrito nenhum fenótipo associado à deleção de Naa50 (Gautschi et al., 2003), no entanto, a sua depleção em linhas celulares humanas e de *Drosophila* origina fenótipos mitóticos. Observou-se que Naa50 é essencial para a correta segregação dos cromossomas durante a mitose, em células humanas e de *Drosophila*, sendo fundamental para

a correta coesão dos cromátídeos irmãos (Williams et al., 2003; Hou et al., 2007). Curiosamente, deleção de Naa50 não afetou a proliferação mitótica das células estaminais da linhagem germinativa feminina (Pimenta-Marques et al., 2008)), o que sugere que a função desta NAT varia na linhagem germinal. Resultados iniciais sugeriam que San é importante para coesão centromérica por um mecanismo independente da localização Sgo1, uma proteína importante para prevenir a dissociação precoce do complexo de coesina dos centrómeros. Igualmente, foi observado que aquando a depleção de San em células humanas, Sgo1 continua a localizar-se corretamente nos centrómeros, apesar de ocorrer uma perda de coesina (Hou et al., 2007).

Recentemente, observou-se que *Drosophila* NatE é um regulador geral de coesão e não apenas da coesão centromérica, uma vez que regula a actividade de uma das subunidades da coesina (o Scc1), sendo portanto essencial para a coesão (Ribeiro et al., 2016). Dada a sequência proteica N-terminal de Scc1 (MFY-) e o seu envolvimento na correta coesão dos cromátídeos irmãos, estudos mostraram que a acetilação de Scc1, dependente de Naa50, é potencialmente importante para a normal manutenção da coesão durante o ciclo celular. Naa50 mostrou também um papel fundamental na regulação da polimerização dos microtúbulos, através da regulando da acetilação de β -tubulina (Chu et al., 2011).

f. Acetiltransferase N-terminal F

O complexo NatF é composto por uma única subunidade catalítica, a Naa60 (Damme et al., 2011). Esta NAT é também altamente conservada em organismos eucarióticos, no entanto durante a evolução, foi perdida em fungos (Rathore et al., 2016b).

Ao contrário das NATs acima referidas, a NatF localiza-se no aparelho de Golgi, tendo sido a primeira NAT associada a organelos descrita em mamíferos (Damme et al., 2011; Aksnes et al., 2017). Esta localização, no lado citosólico do complexo de Golgi, depende da ancoragem da região C-terminal à membrana, mediada através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Aksnes et al., 2017). NatF acetila preferencialmente proteínas transmembranares, tendo preferência lipídica por fosfatidilinositol 4-fosfato (PI(4)P), um dos principais lípidos aniónicos presentes em vesículas e membranas do aparelho de Golgi (Aksnes et al., 2017).

Dada a sua localização no complexo de Golgi e a preferência para acetilar proteínas transmembranares, foi avaliada a importância de Naa60 na manutenção da estrutura e integridade do complexo de Golgi (Aksnes et al., 2015). Aksnes, et al. observaram que, células humanas com depleção de NAA60 têm complexos de Golgi com uma aparência mais fragmentada (Fig. 2), sendo esse fenótipo resgatado por expressão ectópica de Naa60, e não de qualquer outra NAT citosólica (Aksnes et al., 2015). Também se observou que Naa60 de *Drosophila*, (dNaa60) é essencial em células em cultura para a segregação dos cromossomas durante a anáfase (Fig. 2) (Damme et al., 2011).

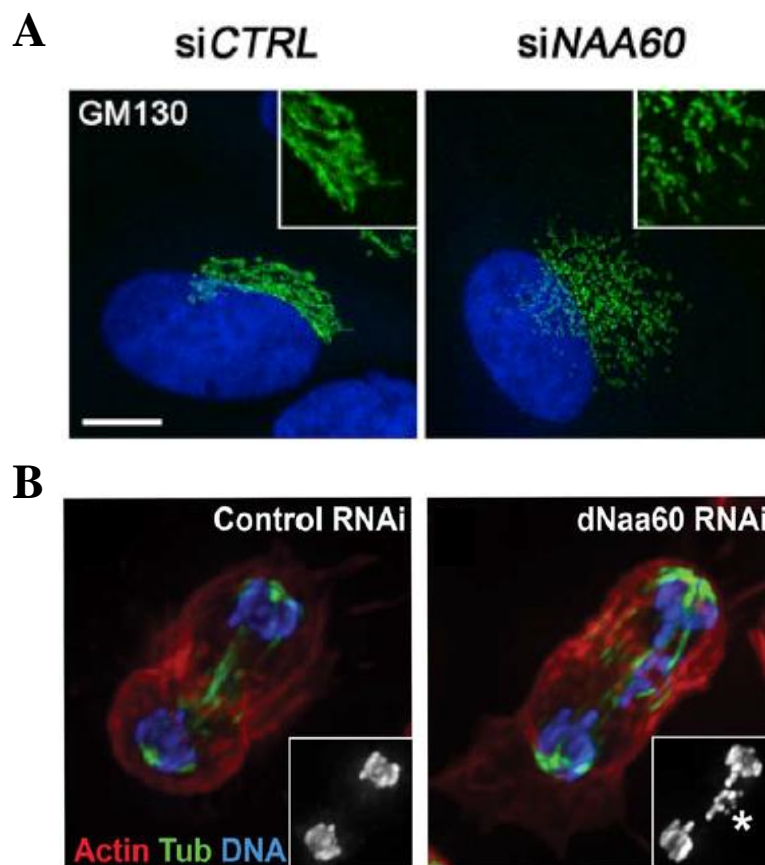


Figura 2 – Depleção de NAA60 afeta a fragmentação do Golgi e a correta segregação dos cromossomas. (A) A depleção o gene hNAA60 (siNAA60), origina defeitos na morfologia do complexo de Golgi, em células HELA. Adaptado de (Aksnes et al., 2015). (B) O silenciamento do gene *Naa60* (dNaa60 RNAi) em células de *Drosophila* promove irregularidades durante a mitose, através da desregulação da segregação cromossômica, durante a anáfase. Adaptado de (Damme et al., 2011). GM130 – Marcador Cis-Golgi; Actin (Actina); Tub (Tubulina).





g. Acetiltransferase N-terminal G

A NatG é específica do reino das plantas e até ao momento não é conhecido nenhum ortólogo humano. Contrariamente à maioria das enzimas, NatG localiza-se no lúmen do cloroplasto, é composto apenas pela subunidade catalítica Naa70 e não possui nenhuma subunidade auxiliar. Acetila pós-transducionalmente péptidos importados para os cloroplastos, e não péptidos traduzidos no cloroplasto, e tem preferência para substratos com M-, A-, S-, T (Dinh et al., 2015).

h. Acetiltransferase N-terminal H

A NatH (Naa80) é um complexo recentemente descrito e, contrariamente às outras NATs até agora descritas, não se associa com ribossomas ou com outros organelos, sendo que a sua atividade enzimática ocorre pós-transducionalmente, no citosol (Drazic et al., 2018). A reação de catalisação desta enzima é altamente seletiva atuando numa das proteínas mais abundantes do citosol, a actina. Foi demonstrado que detém preferência por N-terminais acídicos os quais são característicos da β -actina (MDDDI) e a γ -actina (MEEEEI) (Drazic et al., 2018). Os substratos são primeiramente processados pela NatB (Naa20) (Damme et al., 2012), um processo comum a todos os eucariotas e, seguidamente, a metionina é excisada pelas aminopeptidases (MetAPs). A acetilação N-terminal da actina, dependente de Naa80, é essencial para a normal organização do citoesqueleto, pois tem um impacto direto na transição entre actina globular (G-actina) e actina filamentosa (F-actina), afetando assim a morfologia do citoesqueleto e a motilidade celular (Drazic et al., 2018). Surpreendentemente, Naa80 não é aparentemente essencial em *Drosophila melanogaster* (Rui Gonçalo Martinho, resultados preliminares).

Tabela 1 - Resumo da composição, localização, especificidade e função de cada complexo NAT, em células humanas (revisto em Starheim et al., 2012; Silva and Martinho, 2015; Aksnes et al., 2016; Varland et al., 2015; Aksnes et al., 2019)

	NatA	NatB	NatC	NatD	NatE	NatF	NatG	NatH	
Subunidade Catalítica	Naa10	Naa20	Naa30	Naa40	Naa50	Naa60	Naa70	Naa80	
Subunidade Auxiliar	Naa15	Naa25	Naa35 e Naa38	-	Naa10	-	-	-	
Localização	Ribossoma					Golgi	Cloroplastos	Citoplasma	
Especificidade	A-, S-, T-, C-, V-, (G)-	MD, ME, MN, MQ,	ML, MI, MF, MW, MV, MM, MH, MK	S-G-G (histonas H2A e H4)	MK, MV, MA, MY, MF, ML, MS, MT	ML, MS, MV, MQ, MT, MI, MY e MK	Lúmen do cloroplasto; M-, A-, S-, T-	β -actina (DDDI) e γ -actina (EEEE)	
Remoção da metionina iniciadora	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	
Consequência da perda de função (células humanas)	Apoptose; Paragem do ciclo celular	Paragem do ciclo celular	Apoptose; Defeitos na Mitocôndria e no Golgi	Apoptose; Perda do fenótipo mesenquimal	Coesão e condensação dos cromossomas	Fragmentação do golgi	-	Perda da estrutura dinâmica do citosqueleto e motilidade das células	
Conservação									

1.1.2 Função da acetilação N-terminal

A adição de um grupo acetil ao N-terminal de uma proteína pode alterar o destino das mesmas de diferentes formas, nomeadamente: (a) regulação da sua estabilidade, através da regulação da degradação proteica (Hwang et al., 2010); (b) formação de complexos proteicos, o grupo acetil do N-terminal pode agir como mediador de interação entre proteínas regulando a interação entre diferentes péptidos (Scott et al., 2011); (c) localização subcelular, a acetilação do N-terminal é determinante na localização subcelular de algumas proteínas (Behnia et al., 2004; Setty et al., 2004); (d) regulação do tráfego intracelular, a acetilação do N-terminal impede o transporte para o interior do retículo endoplasmático (Forte et al., 2011); (e) *folding* e agregação de proteínas, a depleção de NATs está associada a agregação de proteínas sugerindo que a acetilação do N-terminal está envolvida no *folding* global de proteínas (Holmes et al., 2014) (Figura 3). A acetilação do N-terminal das proteínas pode, também, estar implicada no correto desenvolvimento de vários organismos (revisto em Aksnes et al., 2016) e na origem de algumas doenças humanas (f) (Myklebust et al., 2014) e também no desenvolvimento de tumores (g) (revisto em Aksnes et al., 2019).

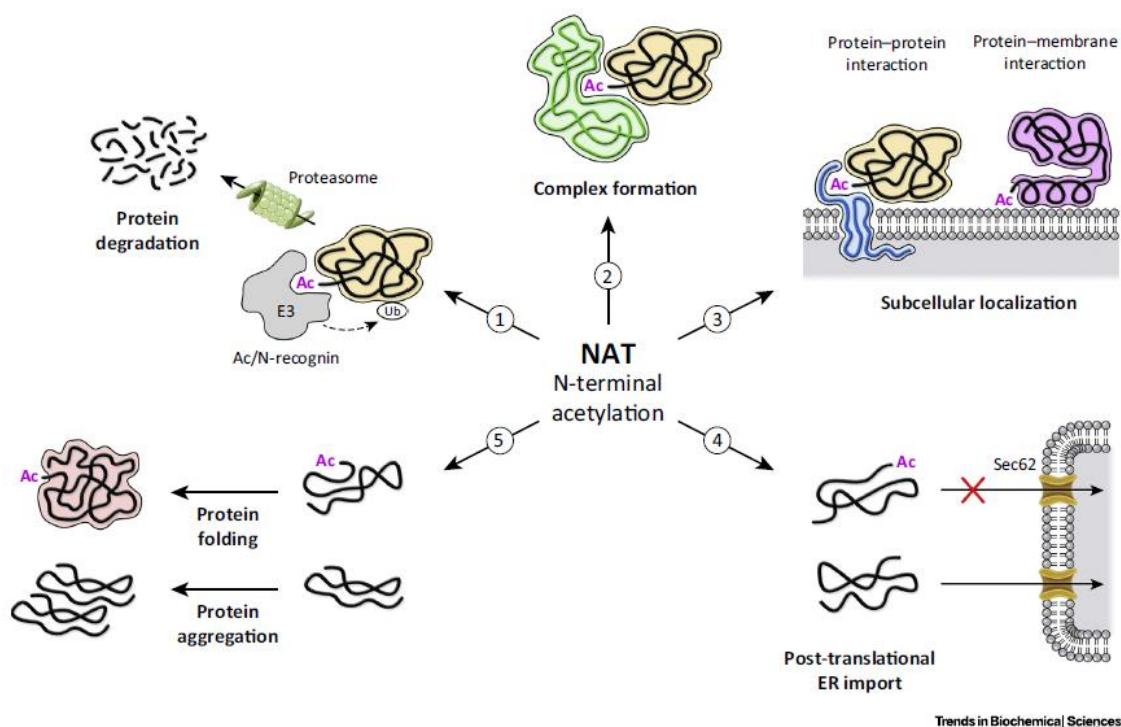


Figura 3 – Efeito da acetilação do N-terminal na regulação do destino proteico. A acetilação do N-terminal das proteínas pode regular a degradação das mesmas, através do reconhecimento do grupo acetil por uma ligase de ubiquitina (1); o grupo acetil, adicionado ao N-terminal das proteínas, pode funcionar como mediador da interação entre proteínas (2); a acetilação pode regular a correta localização de algumas proteínas (3) e o importe das mesmas para o retículo endoplasmático (4); a acetilação do N-terminal está, também, envolvida no *folding* de proteínas podendo provocar a agregação das mesmas (5). Abreviaturas: Ac (grupo acetil), ER (retículo endoplasmático), NAT (N-terminal acetiltransferase), Ub (ubiquitina). Retirado de Aksnes et al., 2016

a) Papel na estabilidade de proteínas

A acetilação N-terminal foi inicialmente descrita como sendo uma modificação que aumenta a estabilidade proteica, protegendo os péptidos da degradação pelo sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) (Hershko et al., 1984). De facto, a acetilação do N-terminal contribui para o aumento do tempo de meia vida das proteínas, como é o caso de Hyx, em *Drosophila* (Goetze et al., 2009), e de THOC7 em células humanas (Myklebust et al., 2014).

No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que o grupo acetil no N-terminal de uma proteína pode também funcionar como sinal específico para degradação proteica. Grupos acetil expostos no N-terminal podem ser facilmente reconhecidos por ligases de ubiquitina E3, como a Doa10 ou a Not4, que catalisam a ubiquitinação desses péptidos e consequentemente levam à degradação dessa proteína pela via proteossomal (Hwang et al., 2010).

b) Papel na formação de complexos proteicos

A acetilação N-terminal de proteínas é, em alguns casos, essencial para a formação de complexos proteicos, permitindo a interação entre diferentes péptidos que compõem um complexo. Por exemplo, a acetilação mediada por NatC da proteína UBC12, é importante para a sua interação com DCN1, pois aumenta a afinidade entre ambas (Scott et al., 2011). Outro exemplo de regulação de interação proteica por acetilação N-terminal, envolve a PDCL3 e o recetor VEGF 2 (VEGFR-2). A acetilação N-terminal de PDCL3, mediada por NatB permite a interação entre as duas proteínas, impedindo o *misfolding* e agregação de VEGFR-2 (Srinivasan et al., 2015). A acetilação N-terminal de Sir3 é também importante para a ligação da proteína ao nucleossoma uma vez que estabiliza a conformação de Sir3, ao permitir a exposição do *loop* de ligação de Sir3 ao nucleossoma (Arnaudo et al., 2013; Yang et al., 2013).

c) Papel na localização subcelular de proteínas

A acetilação N-terminal pode também regular a localização subcelular de proteínas. Um exemplo deste tipo de regulação é o caso da GTPase Arl3p em levedura. Arl3p altera a sua localização quando não é acetilado N-terminalmente, sugerindo que esta reação pode ser

essencial para a correta localização de algumas proteínas (Behnia et al., 2004). Contudo, embora a acetilação N-terminal seja importante para a localização de Arl3p, esta não determina a localização de outras proteínas, não sendo assim um regulador universal de localização (Aksnes et al., 2013).

A regulação da localização subcelular de proteínas, por acetilação N-terminal, pode também ter um impacto em doenças humanas. Verificou-se que a acetilação N-terminal regula a localização da α -sinucleína, uma proteína associada com a doença de Parkinson, pois a adição de um grupo acetil ao N-terminal da proteína aumenta a afinidade desta com membranas (Dikiy and Eliezer, 2014; Miotto et al., 2015).

d) Papel no tráfego intracelular

Tal como a localização subcelular, também o tráfego intracelular pode ser dependente da acetilação N-terminal (Forte et al., 2011).

Em levedura, as proteínas podem ser recrutadas para o retículo endoplasmático através de duas vias distintas: a via co-transducional e a via alternativa. A via co-transducional parece ser regulada pela acetilação N-terminal. Nesta via, à medida que a sequência de aminoácidos é traduzida pelo ribossoma e a sequência sinal emerge, esta é imediatamente reconhecida pela partícula de reconhecimento do sinal (SRP), que promove a ligação do péptido nascente a Sec61, e, conseqüentemente o importe para o retículo endoplasmático. No entanto, a adição de um grupo acetil ao péptido nascente, impede o reconhecimento do péptido sinal e conseqüente transporte para o retículo endoplasmático (Forte et al., 2011).

e) Papel em *fold*ing e agregação de proteínas

Algumas proteínas têm tendência para formar agregados proteicos, designados amiloides. Uma dessas proteínas é Sup35, substrato frequentemente acetilado N-terminalmente por NatA. Em levedura, a deleção de NatA mostrou diminuir a estabilidade do amiloide Sup35, sugerindo que a acetilação do N-terminal desta proteína potencia *misfold*ing da mesma (Holmes et al., 2014).

A actividade de NatA parece ter outras contribuições para a estabilidade de proteínas. Verificou-se que a deleção de NatA resulta no aumento dos níveis de chaperonas que auxiliam no *fold*ing das proteínas. Além disso, NatA, em conjunto com HYPK, parecem regular a agregação da Huntingtina (Htt). Isto porque, a depleção de HYPK ou das subunidades Naa10 e Naa15 de NatA, causa o aumento da agregação do mutante Htt polyQ, evento característico de pacientes com doença de Huntington (Arnesen et al., 2010).

f) Papel no desenvolvimento

A subunidade catalítica Naa10, altamente conservada entre organismos, demonstrou ter um papel essencial no correto desenvolvimento de vários organismos, vertebrados e invertebrados. Em peixe zebra, a depleção por morfolino de NAA10 resultou em anomalias durante o desenvolvimento, atrasos no crescimento e aumento da letalidade, sugerindo que a correta expressão de Naa10 é importante para os primeiros estadios de desenvolvimento e para a viabilidade de peixe zebra (Ree et al., 2015). Igualmente, a perda de Naa10 induziu letalidade em *Drosophila melanogaster* (Wang et al., 2010), *trypanosoma brucei* (Ingram et al., 2000) e *Caenorhabditis elegans* (Sönnichsen et al., 2005). Em levedura, a deleção de Naa10 resultou em vários defeitos no crescimento, com um aumento da sensibilidade à temperatura e a algumas drogas (Whiteway and Szostak, 1985).

A correta actividade das acetiltransferases N-terminal está também implicada em síndromes humanas associadas a defeitos do desenvolvimento. Uma das melhores estudadas é a síndrome de *Ogden*, uma deficiência genética humana letal, associada ao cromossoma X (Rope et al., 2011). Esta deficiência é causada por uma mutação no exão 2 do gene NAA10, que a serina da posição 37 é substituída por uma prolina (S37P). Apesar de, in vitro, a perda da subunidade catalítica apenas originar uma pequena redução da atividade enzimática, as consequências a nível clínico são mais severas, contribuindo para atrasos no desenvolvimento, anomalias craniofaciais, aparência envelhecida entre outras que levam à morte nos primeiros meses de vida (Rope et al., 2011).

g) Papel no cancro

Numerosos estudos descrevem algum tipo de correlação entre os complexos NAT e o desenvolvimento de tumores. Em particular, a subunidade Naa10, do complexo NatA, é uma das mais extensivamente estudadas. Naa10p é frequentemente descrita como tendo actividade oncogénica apresentando níveis elevados em diferentes tipos de tecidos e cancros, incluindo carcinoma hepatocelular (Midorikawa et al., 2002), cancro colorretal (Ren et al., 2008; Yu et al., 2014), cancro do pulmão, cancro da mama (Yu et al., 2014), entre outros, e a sua elevada expressão parece estar correlacionada com a agressividade de tumores e baixa sobrevivência (Ren et al., 2008). Contudo, Naa10 está também descrito como gene supressor de tumores. Apesar de Naa10 ser parte integrante do complexo NatA, e promover a acetilação N-terminal de uma elevada percentagem de péptidos, foi recentemente descrito que possui actividade catalítica e não catalítica na forma monomérica. Inclusive, Naa10 possui actividade de KAT, acetilando lisinas presentes nas cadeias polipeptídicas (Hua et al., 2011; Kuo et al., 2010; Lee et al., 2017; Qian et al., 2017; Shin et al., 2009). Este número elevado de funções poderá explicar os resultados aparentemente contraditórios sobre o seu papel na tumorigénese.

A actividade tumorigénica de Naa10 poderá estar, pelo menos em alguns casos, associada à sua actividade de KAT. Recentemente, foi descrito que Naa10 atua como KAT acetilando internamente SAMD1 e Aurora kinase A e promovendo a proliferação de células cancerígenas (Lee et al., 2017). Além disso, Naa10 parece controlar a autofagia, através da acetilação da lisina K388 da cinase PGK1 (Qian et al., 2017). Foi observado que, em células do glioblastoma em ambiente de hipoxia ou privação de glutamina, há inibição do complexo mTOR (*mammalian target of rapamycin*) deixando este de fosforilar e ativar Naa10. Assim, sem a ação reguladora de mTOR, Naa10 acetila internamente a cinase PGK1 impedindo-a de fosforilar a proteína beclina 1, o que contribui para a formação de autofagossomas. Esta formação de autofagossomas aumenta a tumorigenicidade de glioblastomas (Qian et al., 2017).

Naa10 também possui propriedades de supressor tumoral e de resposta anti-proliferativa associada à actividade de KAT ou NAT. Naa10 regula negativamente a motilidade das células através de dois mecanismos distintos. Na sua forma monomérica, Naa10 liga-se a proteínas PIX, proteínas envolvidas na regulação da migração celular (Hua et al., 2011). A ligação entre Naa10 e PIX inibe a formação do complexo GIT-PIX-paxilina, resultando numa diminuição da actividade de Rac1 e Cdc42 e por sua vez da migração celular

(Hua et al., 2011). Naa10 controla também a migração celular através da acetilação da lisina K608 da cinase MLC impedindo a fosforilação de MLC (*myosin light chain*), um importante regulador da contração e migração celular (Shin et al., 2009). Associada às outras subunidades de NatA, Naa10 inibe a proliferação celular através da regulação indireta da expressão do complexo mTOR (Kuo et al., 2010). Observou-se que, aquando em elevados níveis, hNaa10p atua diretamente em TSC2, através da acetilação do N-terminal da proteína, estabilizando a sua atividade. Assim, TSC2 deixa de suprimir a atividade de mTOR resultando num controlo da proliferação celular (Kuo et al., 2010).

Embora NatA e Naa10 estejam amplamente descritos, este complexo NAT não é o único fortemente associado ao desenvolvimento de tumores. Observou-se que as subunidades de NatB estão fortemente sobreexpressas em carcinomas hepatocelulares controlando a proliferação celular, em parte, através da acetilação N-terminal de tropomiosina e CDK2 (Neri et al., 2017; Polevoda et al., 2003). A inibição da acetilação N-terminal destas proteínas direciona-as para degradação impedindo assim a proliferação celular (Neri et al., 2017). Por sua vez, Naa30 parece ter um efeito protetor da tumorigénese, uma vez que a depleção deste, em glioblastomas, reduz os níveis de HIF1a e de phospho-MTOR (Ser2448) e aumenta os níveis de p53 (Mughal et al., 2015).

Recentemente, observou-se que a depleção de NatD em células do cancro do cólon promove apoptose independente de p53, através da ativação da caspase mitocondrial 9 da cascata apoptótica (Pavlou and Kirmizis, 2016). No entanto, em carcinomas hepatocelulares, a depleção de NatD protege as células cancerígenas da apoptose induzida por drogas, porém a sua sobreexpressão promove a apoptose das mesmas (Liu et al., 2009). Por sua vez, a depleção de NatE e NatF origina defeitos na coesão dos cromátídeos irmãos (Williams et al., 2003; Hou et al., 2007; Pimenta-Marques et al., 2008) e na segregação cromossómica (Damme et al., 2011), respetivamente, podendo originar instabilidade genómica e aneuploidias, características comuns de células cancerígenas. Por fim, a recentemente identificada, NatH parece controlar a motilidade celular e a morfologia do citosqueleto, através da acetilação de dois substratos específicos, a β -actina e a γ -actina, podendo assim desempenhar um papel em mecanismos de tumorigénese e invasão (Aksnes et al., 2018).

Em suma, os diferentes complexos NATs parecem deter uma importante contribuição em múltiplos processos relacionados com o desenvolvimento tumoral, incluindo a proliferação celular e regulação da apoptose e, em processos mais específicos como, a correta

segregação dos cromossomas. Assim, o seu estudo e correlação com processos tumorais pode ter um contributo importante para a compreensão de mecanismos relacionados com o desenvolvimento da célula tumoral.

2. Objetivos Principais

Nos últimos anos tem sido possível decifrar e atribuir vários mecanismos pelos quais a acetilação do N-terminal regula diferentes funções moleculares e celulares (ver secção anterior). No entanto, o papel destas enzimas no desenvolvimento e envelhecimento em organismos multicelulares é pouco conhecida.

Curiosamente, apesar das importantes funções da subunidade catalítica Naa30 na função mitocondrial ou da subunidade catalítica Naa60 na divisão celular, resultados preliminares do laboratório indicam que esta deleção não afecta a viabilidade em *Drosophila melanogaster*. No entanto, dado as funções moleculares destas enzimas, formulámos a hipótese que a sua deleção teria efeitos na longevidade e *fitness* em *Drosophila*.

Assim, este trabalho teve como principais objectivos estudar o papel de Naa30 e Naa60 de *Drosophila* na longevidade e diferentes marcadores de *fitness*, como a motilidade e a fertilidade e identificar mecanismos moleculares subjacentes.

3. Materiais e Métodos

O modelo experimental utilizado neste projeto foi o organismo *Drosophila Melanogaster*, comumente designada por mosca da fruta. *D. melanogaster* é um inseto holometábolo (metamorfose completa), ou seja, o seu processo de desenvolvimento inclui quatro estádios de vida diferentes: ovo, larva, pupa e adulto, fazendo dele um dos modelos invertebrados mais utilizados para o estudo da biologia do desenvolvimento. O facto de ter muitos genes ortólogos associados a doenças humanas também facilita a correlação entre organismos. Das vantagens já citadas, destaca-se também a facilidade e rapidez com que pode ser criada em laboratório, pois detém um ciclo de vida curto (9-10 dias a 25°C e 19-20 dias a 18°C) e origina elevada descendência. Além disso, o seu genoma é compacto, possui apenas quatro pares de cromossomas (X ou Y; 2; 3 e 4), o que possibilita a fácil manipulação genética.

3.1 Ciclo de vida de *Drosophila Melanogaster*

Como referido anteriormente, uma das maiores vantagens do uso de *D. melanogaster* como modelo animal é o facto de possuir um ciclo de vida particularmente curto e, ao mesmo tempo, ter a capacidade de originar um número elevado de descendentes, podendo a fêmea colocar, em média, 80 ovos por dia. Todo o processo de desenvolvimento, desde o ovo fertilizado até ao organismo adulto envolve, em média, 9-10 dias num ambiente húmido a 25°C, e detém várias fases de desenvolvimento. Após a fertilização do oócito, pelo esperma do macho, a embriogénese é completada em 24h, seguindo-se três estádios larvares. Em conjunto, os três estádios larvares ocorrem durante 4 dias e a grande maioria das células já se encontra funcional e diferenciada. Após o desenvolvimento larvar estar completo, inicia-se o processo de metamorfose para a formação da pupa. Neste período, são desenvolvidas novas estruturas a partir de células indiferenciadas, os discos imaginais. Estas células acabam por sofrer diferenciação, durante esta fase, originando, mais tarde, a maioria das estruturas do organismo adulto (antenas, olhos, asas, pernas). Após 4-5 dias, o organismo adulto eclode da pupa e adquire maturidade sexual em 8h-10h.

3.2 Manutenção de *Drosophila*

3.2.1 Stocks e Cruzamentos

Todo o trabalho de *Drosophila* foi realizado usando os procedimentos *standard*. A cada dois dias as moscas foram transferidas para tubos com comida fresca. As moscas da linha selvagem são Oregon R (OR).

Para os cruzamentos, as fêmeas virgens foram recolhidas ao início do dia, de tubos mantidos a 18°C e ao final do dia recolhidas de tubos mantidos a 25°C. A virgindade das fêmeas foi confirmada pela ausência de larvas no tubo após mantidas durante dois dias a 25°C.

3.2.2 Dormência das moscas

As moscas foram adormecidas com dióxido de carbono (CO₂). Após adormecidas no tubo, as moscas foram transferidas para uma placa com uma superfície porosa com libertação de CO₂ para facilitar o manuseamento das mesmas. Após o uso de CO₂, as moscas foram deixadas em recuperação por um período de 24h.

3.3 Genética de mosca

3.3.1 Mutantes *Naa60*

O mutante *Drosophila Naa60* (*dNaa60*^{A20}) foi gerado através da excisão imprecisa de um elemento P (PCG18177^{EP3301}), inserido no 5'UTR do gene *Naaa60* de *Drosophila* (CG18177). Resumidamente, a excisão de PCG18177^{EP3301} foi gerada através do cruzamento da linha do elemento P (w¹¹¹⁸::CG18177^{EP3301}/TM3,Sb) com uma linha a expressar uma transposase (w;;Δ(2:3)99B,Sb/TM6B). A descendência masculina com o genótipo w;;CG18177^{EP3301}/Δ(2:3)99B,Sb e com os olhos com cores irregulares foram cruzados com fêmeas virgens w;;MKRS/TM6B. Em cada cruzamento, os potenciais eventos de excisão foram identificados pela perda do marcador w⁺ e os machos de olhos brancos com o genótipo w; CG18177*/TM6B foram coletados para estabelecer um stock devidamente balanceado.

Foram cruzadas vinte linhas de excisão com a deficiência Df (3L) AC1, que exclui o gene CG18177. A descendência obtida de cada cruzamentos diferente com o genótipo

18CG12177*/Df(3L)AC1 foi testada através de uma reação de PCR genômico com os primers que cobriam o locus do gene CG18177. Identificamos uma linha na qual aproximadamente 1305nt foram deletados, denominada dNaa60^{Δ20}.

As fêmeas Naa60 transheterozigóticas (w¹¹¹⁸;Naa60^{Δ20}/Df (3L) BCL392) foram obtidas através do cruzamento de fêmeas w¹¹¹⁸;Df(3L)BCL392/TM6C,Sb,Cu (Stock Bloomington BL24416) com machos w¹¹¹⁸;Naa60^{Δ20}/TMB6. As fêmeas w¹¹¹⁸;Naa60^{Δ20}/+ foram obtidas através do cruzamento de fêmeas w¹¹¹⁸ com machos w¹¹¹⁸;Naa60^{Δ20}.

3.3.2 Mutantes *Naa30*

O mutante *Drosophila Naa30* foi gerado por excisão imprecisa de um elemento P, inserido no 5'UTR do gene *Naa30* de *Drosophila* (CG11412). Resumidamente, a linha y¹ P{EPgy2}Naa30A^{EY10202} w^{67c23} (BL16976) foi cruzada com a linha de transposase P{Δ2-3}99B, Sb/ TM3, Ser. Os macho F1 foram balanceados através do cruzamento com fêmeas virgens Df(1)pn³⁸/FM0. As fêmeas F1, resultantes deste segundo cruzamento, foram selecionadas como deleções candidatas (olho branco) e foram cruzadas fêmeas virgens com machos Df(1)pn³⁸/FM0 para balancear o stock. Os tamanhos das deleções foram determinados por PCR e sequenciação, usando um *primer forward* 1 kb *upstream* (CAAGGAAAGTGGAGGAAGTGC) e um *prime reverse* 1,5 kb *downstream* (GGTATGTATCCCTCGCCAATG) da extremidade 5' de CG11412. Foram testadas, aproximadamente, 100 linhas das quais foi selecionada a linha y, Naa30^{Δ74}, w. Para criar a linha y, Naa30^{Δ74}, a remoção do marcador recessivo w, foi realizada através da recombinação com o cromossoma X selvagem da linha Oregon R (OR).

No estudo de Naa30, todos os machos y¹, Naa30^{Δ74}/Y foram obtidos através do cruzamento de fêmeas y¹, Naa30^{Δ74}/FM0 com machos OR. Os machos y¹, Naa30^{Δ74}/Y;;gNaa30-myc/+ foram obtidos através do cruzamento de fêmeas y¹, Naa30^{Δ74}/FM0 com machos w;; gNaa30-myc. Todos os machos y¹ utilizados foram obtidos do cruzamento de fêmeas y¹ com machos OR.

De modo a obter machos y¹ e machos com a mutação Naa30^{Δ74}, mas fenotipicamente selvagens para a mutação *yellow*, fêmeas y¹ e fêmeas y¹, Naa30^{Δ74} foram cruzadas com machos que contêm uma duplicação de um fragmento do cromossoma X que contém o alelo *yellow* selvagem no cromossoma Y (FM0/ Dp(1;Y)y⁺).

Para obter mitocôndrias a expressar GFP, foram cruzadas fêmeas virgens controle (y^1/y^1) e fêmeas virgens $Naa30^{\Delta 74}$ (y^1 , $Naa30^{\Delta 74}/FM0$) com machos jovens com um *construct* para expressar GFP em mitocôndrias ($w;;Da-Gal4$, UAS-mito-GFP/TM6B).

3.4 Produção de *constructs* e moscas transgênicas

Para gerar linhas de *Drosophila* que expressam o c-terminal de *Naa30* fundido com uma tag myc, a *open-reading frame* (ORF) de *Naa30* foi clonada no pDONR221 pela integração mediada pela clonase BP (Gateway® BP Clonase® II Invitrogen). O *Naa30* de *Drosophila* resultante de pDONR221-*Naa30* foi então subclonado em pPWM por integração mediada por LR clonase (Gateway® LR Clonase® II Invitrogen) para construir o pPWM-*Naa30*. A microinjeção de Ppwm-*Naa30* e a seleção das linhas transgênicas foram realizadas pela BestGene (Chino Hills, CA, USA).

Para gerar linhas de *Drosophila* com o fragmento genômico com o gene *Naa30*, o fragmento que continha a sequência genômica de *Naa30* e 1kb da sequência a *upstream* do 5'UTR de *Naa30* e 1kb da sequência *downstream* do 3'UTR de *Naa30* foi sintetizado pela Genescript (Piscataway, NJ, USA). Este fragmento foi então clonado no pCaSpeR2 nos locais de restrição *PstI* e *EcoRI* para criar o pCaSpeR2-g*Naa30*. A microinjeção de pCaSpeR2-g*Naa30* e a seleção de linhas transfectadas foram realizadas pela BestGene (Chino Hills, CA, EUA).

Para produzir um stock de *Drosophila* com um RNAi para *Naa30B*, utilizamos a sequência do exão 1 e aplicamos o algoritmo disponível em <http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html>, para obter as sequências de 21 nucleótidos mais eficazes. De seguida, foi feito o *blast* (<https://flybase.org/>) das sequências possíveis, e foram removidas as sequências que tinham correspondência com outras regiões do genoma em 16 pares de bases ou mais. Seleccionamos duas sequências não sobrepostas e, de seguida, tendo em conta a sequência do micro-RNA-1 (miR-1), desenhamos o oligo da cadeia superior e inferior. As sequências de RNAi obtidas foram:

Naa30B (2), cadeia superior:

ctagcagtCAGGGTGATCAAACCGATCGAtagttatattcaagcataTCGATCGGTTTGATCACCC
TGgcg

Naa30B (2), cadeia inferior:

aattcgcCAGGGTGATCAAACCGATCGAtatgcttgaatataactaTCGATCGGTTTGATCACCCCT
Gactg

Para renaturação da cadeia superior e inferior, 10µL do oligo da cadeia superior (10-20 µM) e 10µL do oligo da cadeia inferior (10-20 µM) foram adicionados a 80µL de tampão de *annealing* (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1M NaCl, 1mM EDTA) e incubados a 95 °C, durante 5 minutos, no termociclador. Esta mistura foi depois arrefecida a 1°C/min até aos 25°C de modo a obter um fragmento de DNA com as extremidades compatíveis com os locais de corte das enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI*. De seguida, foi feita a ligação do fragmento de DNA ao plasmídeo pValium22, previamente linearizado pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI* (ThermoFisher). Para a reação de ligação do DNA, foi preparada uma reação com 7µl do produto de ligação, 5µl de solução de ligação (4x), 1µl T4 *speedy* DNA ligase (NZYtech) e 1µl de 40ng/µL de plasmídeo digerido. O volume final de 20µl foi feito com ddH₂O, e a reação foi incubada a 16°C, durante 1h. De seguida, todo o volume da reação foi transformado em células *XLI-blue*, conforme o método de transformação química e todas as colónias que cresceram no meio condicionado (ampicilina) foram selecionadas para posterior confirmação. A confirmação da ligação entre o RNAi e o plasmídeo pValium22 foi feita por PCR com os *primers* pV22_F: GGTGATAGAGCCTGAACCAG e pV22_R: TAATCGTGTGTGATGCCTACC e através de sequenciação. Para a produção do stock com moscas transgênicas, o plasmídeo isolado foi mandado para injeção (BestGene Chino Hills, CA, EUA).

3.5 Transformação química

Foram descongeladas, em gelo, células competentes e adicionado DNA (1-20uL) a uma alíquota de 200uL de células, tendo sido mantidas em gelo por 30 minutos. De seguida, os

tubos foram transferidos para um banho de água de 42°C, num *termoblock*, por exatamente 30 segundos e depois colocados novamente em gelo, de modo a provocar um choque térmico e a originar a entrada do plasmídeo nas bactérias. Recorrendo à técnica asséptica adicionou-se 0,8 ml de meio de cultura SOC líquido (2% Triptona Peptona, 0,5% extrato de levedura, 2,5mM KCL, 10mM NaCl, 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂, 20mM glucose) a cada tubo. De seguida, incubaram-se os tubos a 37°C, durante 1 hora com agitação vigorosa, de modo a permitir a multiplicação de *E. coli* transformadas. Para o cultivo em meio sólido (1% Triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 2% Agar, 0,1mg/mL Ampicilina) recorreu-se novamente à técnica asséptica. Em duas das placas, foram pipetados os volumes de 75µl e 150µl de cultivo líquido no centro de cada placa, espalhando esse líquido com o auxílio de um espalhador até que fosse absorvido. Numa terceira placa, foi pipetado um *pellet*, que foi obtido através da centrifugação do cultivo líquido, durante alguns segundos, a 14.000g. O *pellet* foi ressuspendido em apenas 100µl do sobrenadante e este foi pipetado para o centro da placa de *petri* e espalhado pelo mesmo processo já detalhado anteriormente. Finalmente, incubaram-se todas as placas a 37°C, até ao dia seguinte, com a tampa para baixo. No dia seguinte, após o aparecimento de colónias, estas foram selecionadas e incubadas em *falcons* com 5 ml de LB líquido (1% Triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) e 5 µl de Ampicilina (0,1mg/mL), de modo a obter crescimento em meio líquido.

3.6 Fertilidade de Machos

Para analisar a fertilidade dos machos foi avaliada a presença ou ausência de larvas. Neste ensaio, tubos com um macho w¹¹¹⁸ (controlo) ou um machos w^{1118;;Naa60^{Δ20}}, com 3 dias, foram incubados com cinco fêmeas virgens da linha selvagem com 3-7 dias, durante 3 a 5 dias, a 25°C. Foram realizadas três réplicas biológicas, em que em duas das réplicas os tubos com os cruzamentos foram flipados 2 vezes. Na réplica 1 foram testados 10 machos controlo e 10 machos Naa60^{Δ20}. Na réplica 2, foram testados 23 machos controlo e 20 machos Naa60^{Δ20}. Na réplica 3, foram testados 11 controlo e 11 machos Naa60^{Δ20}.

3.7 Fertilidade de Fêmeas

A fertilidade das fêmeas foi avaliada com base na contagem de embriões eclodidos 48 horas após deposição em placas de agar com sumo de maçã. Fêmeas w¹¹¹⁸, fêmeas w^{1118;;}

Naa60^{Δ20/+}, fêmeas w¹¹¹⁸; Naa60^{Δ20/Df} (3L) BCL392 e fêmeas w¹¹¹⁸; Naa60^{Δ20} com 2-5 dias foram cruzadas com machos da linha selvagem com 1-3 dias. O número de embriões eclodidos foi contado dois dias após a produção dos ovos. Na réplica 1, foram cruzadas 30 fêmeas com 20 machos, na réplica 2, foram cruzadas 59 fêmeas com 46 machos e na réplica 3, foram cruzadas, 40 fêmeas com 40 machos. Na réplica 4, foram cruzadas 40 fêmeas com 40 machos e na réplica 5 foram cruzadas 30 fêmeas com 30 machos.

3.8 Dissecção e marcação de ovários

Para dissecção de ovários, fêmeas adultas controlo (w¹¹¹⁸) e mutantes (w¹¹¹⁸; Naa60^{Δ20}) foram mantidas durante 48 horas em comida suplementada com levedura. De seguida, foram adormecidas através do frio, durante 5 minutos a -20°C, e os ovários foram dissecados em PBS 1x (pH=7,4). Depois da dissecção, os ovários foram fixos em 200μL de solução de fixação (20μL PBS 10x, 10μL NP-40 10%, 50μL formaldeído, 120μL H₂O dd) e 200μL heptano, durante 20 minutos em rotação, à temperatura ambiente. Após a fixação, foram feitas sucessivas lavagens em PBST (PBS 1x, 0,2% Tween-20) e procedeu-se gentilmente à ruptura dos ovariolos, através da técnica de *tease apart*.

De seguida, para observar a marcação do DNA, foi feita a marcação com DAPI. As amostras foram incubadas numa solução de 1:10000 (1μL de DAPI (1mg/ml:10 000μl de PBT), durante 15 minutos, com proteção da luz. Após o tempo de incubação, os ovários foram lavados em PBT e PBS 1x, e montados com meio de montagem (Dako, California, USA) numa lâmina.

3.9 Fixação e marcação de embriões

Pelo menos 48 horas após a cruzamento com machos da linha selvagem, os embriões depositados em placas de agar com sumo de maçã, foram recolhidos para cestos de metal, lavados durante 2 min numa solução de 0,1% de Tween 20, descarbonados numa lavagem de 5 min numa solução de 50% de lixívia comercial e submetidos a 3 lavagens sucessivas em H₂O, para remover a lixívia residual. Após as lavagens, os embriões foram transferidos para um frasco de cintilação contendo a solução de fixação (4ml de Heptano, 875μL PBS 1x, 125μL Formaldeído 37%) e agitados durante 40 minutos, com uma velocidade de pelo menos

100rpm. Após agitação, foi descartada a fase aquosa (PBS e formaldeído) e adicionados 4mL de metanol. Logo de imediato, foi feita uma agitação manual vigorosa, durante um minuto, para remover a membrana vitelina dos embriões. Os embriões sem a membrana, presentes no metanol, foram transferidos para um tubo *ependorf*, foram feitas sucessivas lavagens com metanol (MeOH), e os embriões foram armazenados a -20°C.

Para marcação com DAPI, os embriões foram re-hidratados através de sucessivas lavagens, sempre em rotação, à temperatura ambiente, em soluções de metanol e PBT (PBS com 0,1% Tween 20) contendo crescentes proporções de PBT (MeOH:PBT (7:3); MeOH:PBT (1:1); MeOH:PBT (3:7); PBT 100%). De seguida, os embriões foram incubados numa solução com DAPI (1µl DAPI (1mg/ml) em 5ml PBT), durante 15 minutos e com proteção de luz. Após o tempo de incubação com DAPI, foram feitas lavagens em PBT e PBS 1x. De seguida, a solução foi substituída por meio de montagem (Dako, California, USA) e os embriões foram colocados numa lâmina.

3.10 Co-imunoprecipitação

Para obter extratos proteicos, embriões com 0-4 horas a expressar CG11412/dNaa30-Myc foram descornados numa solução de 50% de lixívia comercial. A extração de proteínas foi realizada através da homogeneização dos embriões numa solução de lise (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 10 mM NaF, e uma mistura de inibidores de proteases livre de EDTA (Roche, Germany), e foram centrifugados a 20000 x g durante 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado duas vezes. A concentração total de proteína foi determinada usando o ensaio de proteína Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA, USA) que é baseada no método de Bradford.

Para a co-imunoprecipitação, os extratos proteicos (1.5mg) de embriões a expressar CG11412/dNaa30-Myc foram incubados com 1µg de anticorpo c-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), durante 1h a 4°C. Subsequentemente, 0,9mg de *Dynabeads Protein G* (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) foram adicionadas e incubadas durante 1h a 4°C. Após a lavagens das *beads*, três vezes numa solução de lise, a eluição da proteína foi realizada com 100µl de 100mM de glicina pH 3.0 durante 1 min e parada com 10µl de 1M Tris Base pH 10.8. A proteína da eluição foi precipitada com 5 volumes de acetona a -20°C.

3.11 Espectrometria de Massa

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Biochemistry and Biophysics, Poland. Resumidamente, a mistura de péptidos foi analisada por LC-MS-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem) usando um sistema de cromatografia líquida Nano-Acquity (Waters, Milford, MA, USA) e um espectrômetro de massa Orbitrap Velos (Thermo Electron Corp., San Jose, CA, USA). Anteriormente à análise, as proteínas foram sujeitas ao procedimento de digestão standart *in-solution*, durante o qual as proteínas foram reduzidas com 100 mM DTT (durante 30 min a 56°C), alcalinizadas com 0,5M iodoacetamida (45 min numa sala escura à temperatura ambiente), e digeridas durante uma noite com tripsina (sequencing Grade Modified Trypsin-Promega V5111). A mistura peptídica foi aplicada a uma pré-coluna RP-18 (nanoACQUITY Symmetry C18-Waters 186003514) usando água contendo 0,1% de TFA como fase móvel, depois transferida para a coluna nano-HPLC RP-18 (nanoACQUITY BEH C18-Waters 186003545) usando um gradiente de acetonitrilo (0% -35% de AcN em 180 min) na presença de 0,05% de ácido fórmico com uma taxa de fluxo de 250 nl/min. A saída da coluna foi acoplada diretamente à fonte de iões do espectrofotômetro, através do regime de comutação MS para MS/MS dependente de dados. Foi também corrido um branco, para garantir que não havia contaminação cruzada de amostras anteriores, precedente de cada análise.

Os dados não tratados foram processados por Mascot Distiller seguido de Mascot Search (Matrix Science, London, UK, on-site license) contra a data base da FlyBase. Os parâmetros de pesquisa para tolerância de massa de precursores e produtos de iões foram 15ppm e 0,4 Da, respectivamente, especificidade da enzima: tripsina, locais de clivagem perdidos permitidos: 0, modificação fixa da cisteína por carbamidometilação e modificação variável da oxidação da metionina. Os peptídeos com Mascot Score que excedem o valor limite correspondente a <5% da Taxa de Falsos Positivos, calculados pelo procedimento de Mascot, e com o Mascot score acima de 30 foram considerados identificados positivamente.

Os ortólogos humanos foram determinados usando a plataforma DSRC Integrative Ortholog Prediction Tool (DIOPT) (http://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC_orthologs.pl). Só os scores acima de dois foram considerados tal como as melhores correspondências quando houve mais do que uma correspondência por *input*.

3.12 Ensaio de Longevidade

Neste ensaio, foram usados um total de, pelo menos, 50 machos por genótipo. Os machos foram mantidos a uma densidade de 6 a 8 moscas por tubo, distribuídos por 8 tubos, mantidos numa incubadora a 25°C. As moscas foram transferidas para tubos novos a cada 2 dias e a viabilidade foi anotada no momento da mudança de tubo.

3.13 Ensaio de Locomoção

Para cada genótipo, 10 grupos de 10 machos com 1-4 dias, 4-7 dias e 7-10 dias foram escolhidos e separados. As moscas foram mantidas em recuperação da anestesia pelo menos 12 horas antes de serem transferidas para um tubo com 22mm de diâmetro. Quando no novo tubo, as moscas foram aclimatizadas pelo menos durante um minuto e então foram batidas gentilmente para o fundo do tubo. De seguida, foi contabilizado o número de moscas que escalaram 8cm em 10 segundos e 30 segundos. Para cada grupo de 10 moscas, o ensaio foi repetido 10 vezes, com pelo menos um minuto de descanso entre cada repetição do ensaio. O número de moscas de cada grupo que escalou 8cm foi representado como a percentagem do total de moscas.

3.14 Ensaio de voo

A capacidade de voo de machos controlo (*y1/Y*), machos mutantes *Naa30* (*y1, Naa30^{Δ74}/Y*) e machos mutantes *Naa30* com uma construção genómica de *Naa30* (*y1, Naa30^{Δ74}/Y;; gNaa30-myc/+*), com 2 dias ou 20 dias de idade, foi avaliada através de um ensaio de voo. O ensaio de voo consistiu em colocar um grupo de moscas num tubo cilíndrico de 1L, com uma folha transparente revestida com uma substância viscosa, e um funil na parte superior. As moscas foram batidas gentilmente para o fundo do tubo e de seguida caso voassem pousavam perto do topo do tubo, caso contrário caíam para o fundo do tubo. O número de moscas de cada grupo foi representado como a percentagem do total de moscas.

3.15 Avaliação dos níveis de ATP

A avaliação do nível de ATP foi realizada através do Kit Luminescente CellTiter-Glo da Promega. Esta experiência consiste numa reação de luminescência baseada no ATP, em que o sinal luminescente é uma proporção direta da quantidade de ATP presente na amostra. Em cada ensaio, dois grupos de 5 machos foram lisados e a luminescência calculada como uma média de três repetições técnicas. O sinal médio de luminescência é expresso em relação aos níveis de proteína da amostra (quantificados usando o ensaio BCA). A média dos resultados das duas amostras biológicas e o nível de luminescência foi expresso como uma percentagem do controlo (w^{1118}).

3.16 Ensaio de copulação

Para calcular o sucesso de copulação, um macho selvagem (OR), um macho controlo ($y^1/Dp(1;Y)y^+$) e um macho mutante *Naa30* ($y^1, naa30^{\Delta 74}/Dp(1;Y)y^+$), com idades ente 1 e 4 dias e sem exposição a CO₂ durante pelo menos 24 horas, foram transferidos para tubos contendo uma fêmea virgem selvagem (OR) com 5-7 dias de idade. O sucesso de copulação foi calculado medindo a percentagem de machos OR, machos controlo e machos mutantes, após, 10, 15, 20 e 30 min.

3.17 Microscopia com contraste diferencial de interferência (DIC) de testículos vivos

Foi feita a dissecação de testículos de machos $yNaa30^{\Delta 74}w/Y$ e $yNaa30^{\Delta 1}w/Y$, recentemente eclodidos, num tampão TB1 fresco (fosfato de potássio 15mM (dibásico e monobásico equimolar) pH 6,7, KCl 80 mM, NaCl 16 mM, NaCl 16 mM, MgCl₂ 5 mM e polietileno glicol 1% (PEG) 6000). Após a transferência para uma gota de tampão TB1, os testículos e as vesículas seminais foram abertos através do corte com agulhas ou pinças de tungsténio. Foi colocada uma lamela limpa sobre os testículos.

3.18 Imunodeteção de proteínas mono- e poli-ubiquitinadas em músculos de *Drosophila*

Tóraxes de machos controlo (y^1), mutantes *Naa30* (y^1 , $Naa30^{\Delta 74/Y}$) e mutantes *Naa30* com o *construct* genómico (y^1 , $Naa30^{\Delta 74/Y}; gNaa30\text{-myc/+}$) obtidos de moscas jovens (1-4 dias) e moscas velhas (4 semanas) foram pré-fixos durante 5 minutos numa solução de fixação (4% formaldeído e 0,2% Triton X-100 em PBS) para facilitar a dissecação. Após a dissecação, os músculos foram incubados numa solução de fixação durante 30 min, lavados com solução de lavagem (PBS com 0,2% Triton X-100) e bloqueados com 5% BSA. Após o bloqueio, as amostras foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo anti proteínas mono- e poli-ubiquitinadas diluído 1:250 em solução de lavagem (clone FK2 Enzo Life Sciences). De seguida, as amostras foram lavadas 4x20min em solução de lavagem e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-ratinho conjugado com Alexa488, diluído 1:1000 em solução de lavagem. Após incubação com anticorpo secundário as amostras foram incubadas com Phalloidina-TRITC diluída 1:200 em solução de lavagem durante 20 minutos. Após 4 lavagens de 20min as amostras foram montadas em *vectashield*.

3.19 Extratos proteicos

A extração proteica foi feita a partir de tóraxes de *Drosophila* previamente dissecados e mantidos a -80°C. Os toráxes foram adicionados a uma solução de lise fresca (150 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 2mM EDTA, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 10mM NaF e uma mistura de inibidores de protéases livre de EDTA (Roche, Germany)). Sempre em gelo, as amostras foram manualmente homogeneizadas, até à degradação completa dos tecidos, com recurso a um *petzel*, durante 30 segundos. De seguida, foram centrifugadas com rotação 14 000 rpm a 4°C, durante 5 minutos, e foi retirado o líquido sobrenadante para um novo *ependorf* estéril.

A concentração total de proteína foi determinada pelo método de *Bradford*. Após quantificação, as amostras foram diluídas com uma concentração final de 1µg/µl, para um volume final de 100µl. Foi adicionado *sample buffer* (1:1), para as amostras serem corridas num gel de SDS.

3.20 Imunodeteção de proteínas por *western blot*

3.20.1 SDS-PAGE

As amostras proteicas foram corridas em géis SDS-PAGE (6% Acrilamida) numa solução de corrida (3,03g Tris-base, 14,4g Glicina, 1g SDS, H₂O). Os poços vazios foram carregados com *sample buffer*, com mesmo volume final das amostras. A corrida das amostras foi iniciada com uma voltagem de 60 volts (v) e após a passagem das amostras pelo gel separador, a voltagem foi aumentada para 90v. Após a corrida das amostras, fez-se a transferência para uma membrana de nitrocelulose durante 60 minutos, a 100v, numa solução de transferência (11,63g Tris-base, 5,86g Glicina, H₂O) com 20% de metanol. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em PBT (PBS + 0,1% *Tween-20*) com 5% de leite magro, durante uma hora, com rotação a 55rpm. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (P4D1 Cell Signaling Technology 1:1000) ou (anti-tubulina 1:5000 Dm1A e Sigma), em PBT com 5% leite magro, segundo a diluição recomendada, em *falcons* de 50mL, durante a noite, a 4°C e em rotação. No dia seguinte, a membrana foi lavada em PBT e bloqueada em PBT com 5% de leite magro, durante 15 min. Foi incubada com o anticorpo secundário anti-ratinho (1:4000 Jackson immunoresearch), em PBT com 5% leite magro, durante duas horas. Após incubação, a membrana foi lavada 3x10min em PBT e PBS.

3.20.2 *Enhanced chemiluminescence Detection* (ECL)

A deteção de sinal luminescente da membrana foi processada através do método de deteção por ECL (*Enhanced chemiluminescent Detection*). A deteção por ECL (1,25mM luminol, 0,198mM Ácido p-cumárico, 100mM Tris, 0,036% peróxido de hidrogénio, H₂O) é baseada na reação de catalisação entre a peroxidase HRP (*horseradish peroxidase*), que se encontra conjugada ao anticorpo secundário, e o luminol presente na solução do ECL. Após a incubação durante 5 minutos, a membrana foi guardada numa cassette e revelada numa sala escura, com recurso a filmes de revelação, para diferentes tempos de exposição.

4. Contribuições

Os resultados das Figuras 6B, 7C, 9D, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 foram obtidos por Rafaela Agostinho.

As Figuras 4A, 4B, 9C e 9C foram obtidas por Alexandra Faustino, a Figura 4C foi obtida por Thomas Arnesen, as Figuras 5A, 5B, 6B, 7A, 7B, 8A e 8B foram obtidas por Rui Silva, as Figuras 5C e 6A foram obtidas por Alex Whitworth e a Figura 9B foi obtida por Paulo Navarro-Costa.

5. Capítulo NatC (Naa30)

5.1 Resultados

a. O gene CG11412 é a subunidade catalítica do complexo NatC, em *Drosophila melanogaster*

Identificámos por Blast bidireccional (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o gene CG11412 de *Drosophila* como sendo o ortólogo da subunidade catalítica do complexo NatC em humanos (NAA30). Este gene possui um domínio GNAT com uma identidade de 72,7% e 52,3% comparativamente à subunidade Naa30 de humano e à subunidade Mak3 de levedura, respectivamente (Figura 4A).

De seguida, fomos investigar se o gene CG11412 codifica um ortólogo cuja função é conservada em NAA30 e Mak3. Através de extratos proteicos de embriões provenientes de fêmeas a expressar UAS-CG11412-myc, sob o controlo do driver nanos-Gal4, foi possível fazer a imunoprecipitação da proteína (Fig. 4B painel superior). De seguida, através de um ensaio de espectrometria de massa, fez-se a identificação das proteínas co-imunoprecipitadas com CG11412-myc (Fig. 4B painel inferior). Verificámos que CG11412 interage com proteínas de *Drosophila* que são ortólogas das subunidades de NatC humano e levedura, indicando que esta proteína forma complexos semelhantes a NatC humano e de levedura. De seguida, fomos investigar se CG11412 complementa a função de Mak3 de levedura, uma vez que trabalhos anteriores mostraram que Mak3 é essencial para a correta localização de Arl3 (Behnia et al., 2004) (Fig. 4C painel esquerda e meio). A expressão ectópica de CG11412 resgata a localização de Arl3-GFP em células de levedura com deleção de Mak3 (Fig. 4C painel direita), indicando que CG11412 complementa a função de Mak3 de levedura.

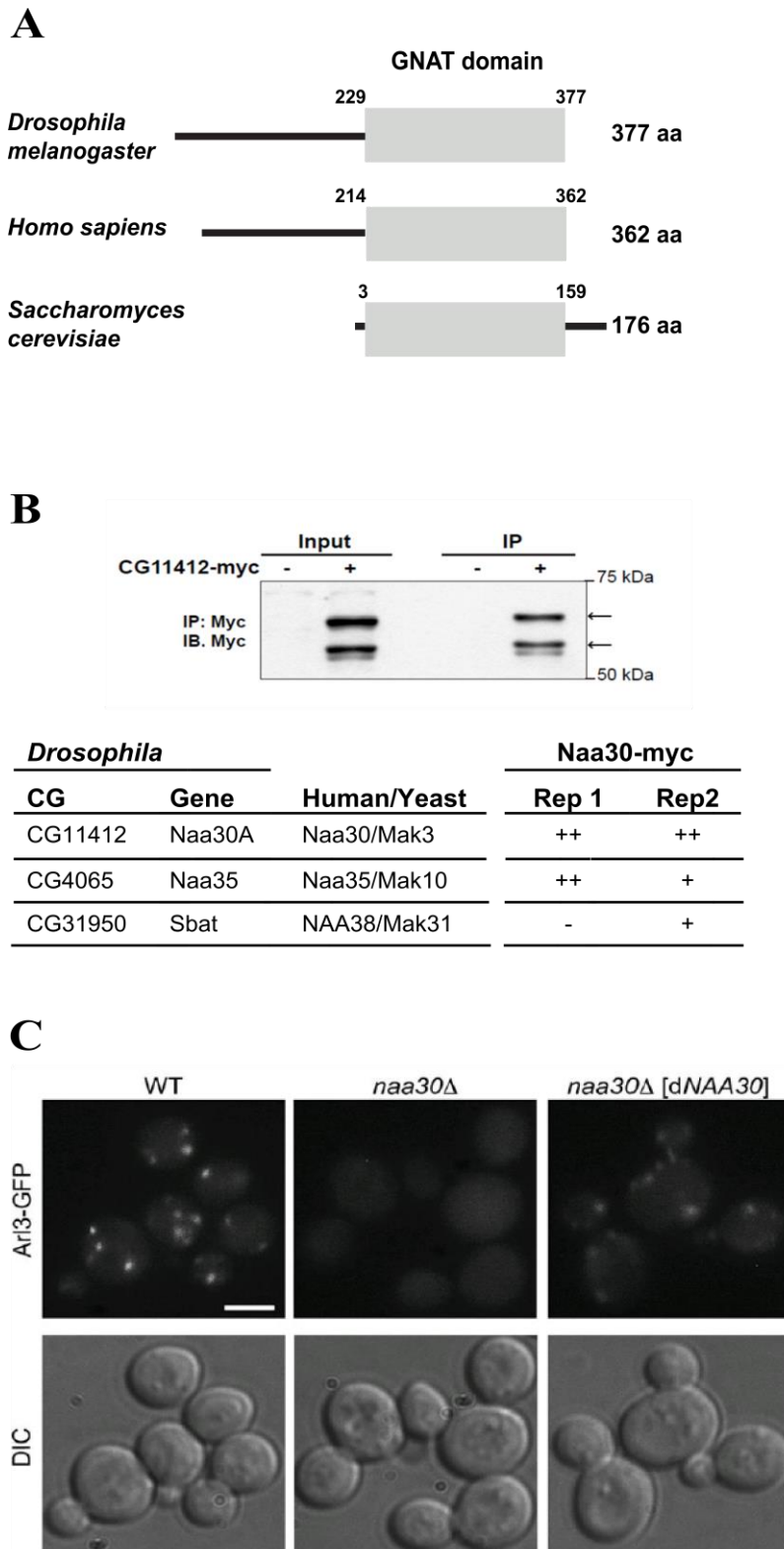


Figura 4 - O gene CG11412 é a subunidade catalítica de *Drosophila* NatC. (A) Representação esquemática de CG11412 de *Drosophila melanogaster* e dos homólogos de *H. Sapiens* e *S. Cerevisiae* Naa30 e Mak3, respectivamente. O CG11412 possui um domínio GNAT com uma identidade de 72,7% e 52,3% quando comparado com Naa30 humano e Mak3 de levedura, respectivamente. (B) Imunoprecipitação de CG11412-MYC proveniente de extratos proteicos de embriões de *Drosophila*. Foram colecionados embriões com 0-4h de fêmeas a expressar UAS-Naa30-myc sob o controle do driver nanos-Gal4. Os embriões controle foram colecionados de fêmeas selvagens (OR). As duas diferentes proteínas detetadas correspondem a CG11412-MYC (setas) (painel superior). Identificação por análise LC-MS dos ortólogos da subunidade auxiliar de NatC

de *Drosophila* na atração de proteínas co-imunoprecipitadas de embriões com CG11412-myc. (-), (+) e (++) correspondem a 0, 1–9 e > 10 peptídeos não repetidos, respectivamente (painel inferior). (C) Localização de Arl3-GFP de levedura em células de levedura selvagem, células de levedura *naa30Δ* e células de levedura *naa30Δ* que expressam o cDNA de CG11412 de *Drosophila*.

b. *dNaa30* é necessário para a longevidade de *Drosophila*

Para investigar a função de Naa30 no desenvolvimento de *Drosophila*, previamente ao início deste projeto de mestrado, o laboratório estabeleceu uma linha de perda de função de Naa30. Ao contrário do que seria esperado, devido ao papel de NAA30 na regulação de crescimento embrionário (Wenzlau et al., 2006), na expressão e regulação de proteínas (Behnia et al., 2004; Hofmann and Munro, 2006; Starheim et al., 2009a; Damme et al., 2016) e na manutenção da morfologia do complexo de Golgi (Mueller et al., 2002; Starheim et al., 2017), em *Drosophila* os mutantes zigóticos de Naa30 eram viáveis e sem fenótipo morfológico aparente.

Uma vez que Naa30 tem importantes funções celulares noutros organismos, decidimos investigar se mutantes de *Naa30* possuem outros fenótipos. Assim, começámos por avaliar se a deleção de Naa30 afeta a longevidade. Inicialmente, fomos investigar a longevidade de machos mutantes para *Naa30*. Observámos que a deleção de *Naa30* (*y/Y*; *Naa30^{Δ74}/FMO*) reduz a longevidade de *Drosophila* em comparação com indivíduos controlo (*y/Y*) (Fig. 5A). A expressão de um *construct* genómico de Naa30, em mutantes de *Naa30* (*y/Y*; *Naa30^{Δ74}/FMO*+g*Naa30-myc*) resgata este efeito na longevidade (Fig. 5A). Isto sugere que Naa30 é necessário para a longevidade em *Drosophila*.

c. *dNaa30* é necessário para motilidade de *Drosophila*

De seguida, fomos avaliar o efeito da deleção de *Naa30* na motilidade de *Drosophila*. Avaliámos a resposta geotaxia negativa de *Drosophila* jovens (1-4 dias) e mais velhas (4-7 dias ou 7-10 dias) controlo (*y/Y*), mutantes de *Naa30* (*y/Y*; *Naa30^{Δ74}/FMO*) e mutantes de *Naa30* com um *construct* genómico de Naa30 (*y/Y*; *Naa30^{Δ74}/FMO*+g*Naa30-myc*). Verificámos que, a deleção do gene origina defeitos na locomoção, defeitos esses agravados em machos mais velhos (Fig 5B). Avaliámos também a capacidade de voo de *Drosophila* jovens (2 dias) e *Drosophila* mais velhas (20 dias) controlo (*y/Y*), mutantes de *Naa30* (*y/Y*; *Naa30^{Δ74}/FMO*) e mutantes de *Naa30* com um *construct* genómico de Naa30 (*y/Y*;

$Naa30^{\Delta74}/FMO+gNaa30-myc$). Verificamos que, a deleção do gene origina defeito na capacidade de voo, defeitos esses agravados em machos mais velhos (Fig 5C). Resumidamente, $dNaa30$ é necessário para longevidade e proteção contra a perda de motilidade com a idade.

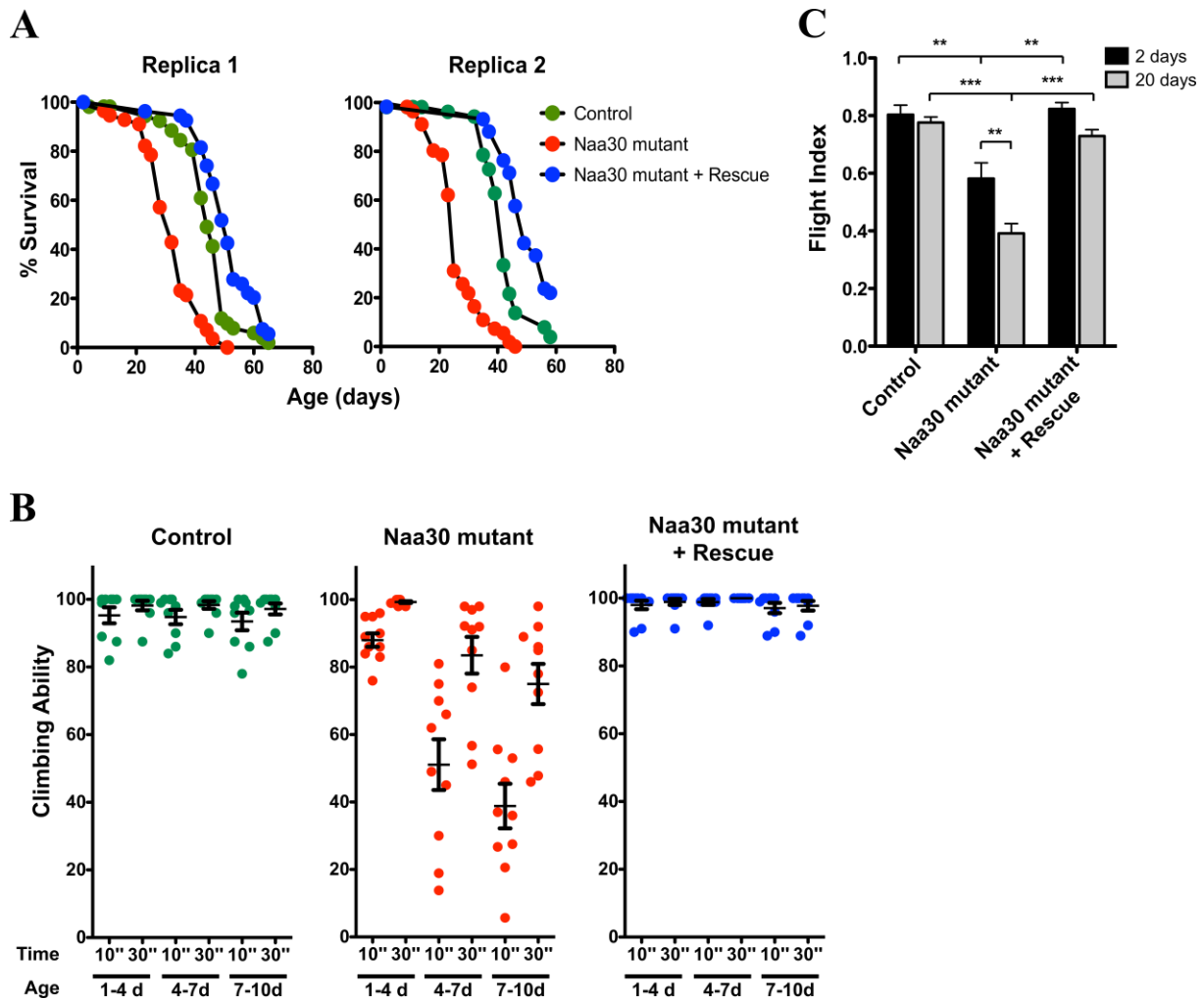


Figura 5 - $dNaa30$ é necessário para a longevidade e para a normal motilidade de *Drosophila*. (A) Curvas de sobrevivência de machos controle ($y1/Y$), machos mutantes $Naa30$ ($y1, Naa30^{\Delta74}/Y$) e machos mutantes $Naa30$ com uma construção genômica de $Naa30$ ($y1, naa30^{\Delta74}/Y; gNaa30-myc/+$). A sobrevivência dos mutantes $Naa30$ é significativamente diferente do controle nas duas réplicas biológicas ($p < 0,0001$, teste Log-rank (Mantel-Cox), $n > 50$). (B) Capacidade de locomoção como uma medida da mobilidade de machos controle ($y1/Y$), machos mutantes $Naa30$ ($y1, Naa30^{\Delta74}/Y$) e machos mutantes $Naa30$ com uma construção genômica $Naa30$ ($y1, Naa30^{\Delta74}/Y; gNaa30-myc/+$) com idades de 1-4 dias, 4-7 dias e 7-10 dias. A habilidade de locomoção representa a percentagem de machos que foram capazes de se movimentar até 8 cm, após 10 e 30 segundos. Os resultados foram obtidos com machos recolhidos de dois cruzamentos independentes e cada ponto representa a capacidade média de locomoção de um grupo de 10 machos avaliados com 10 repetições. (C) Capacidade de voo de machos controle ($y1/Y$), machos mutantes $Naa30$ ($y1, Naa30^{\Delta74}/Y$) e machos mutantes $Naa30$ com uma construção genômica de $Naa30$ ($y1, Naa30^{\Delta74}/Y; gNaa30-myc/+$) com 2 dias ou 20 dias de idade. Os resultados são a média \pm SEM de pelo menos 41 machos (** $p < 0,001$, ** $p < 0,001$; ANOVA unidirecional com teste de comparação múltipla de Bonferroni).

d. *dNaa30* é necessário para manter os níveis normais de ATP, mas a sua deleção não está associada a alterações na rede muscular mitocondrial

Uma vez que mutantes de Naa30 mostram uma redução na sua motilidade e previamente foi descrito que NAA30 é necessário para a integridade das mitocôndrias em células humanas (Damme et al., 2016), fomos investigar se *dNaa30* é necessário para os níveis normais de ATP. Observou-se que em *Drosophila* Naa30 é necessário para manutenção dos níveis totais de ATP em machos jovens (2 dias) e em machos envelhecidos (10 dias) (Fig. 6A). Contudo não foi possível observar uma alteração óbvia da morfologia da rede muscular mitocondrial. A marcação específica da rede mitocondrial com um repórter GFP não demonstrou evidências de fragmentação mitocondrial nos músculos indiretos de voo de *Drosophila melanogaster* adultos (Fig. 6B).

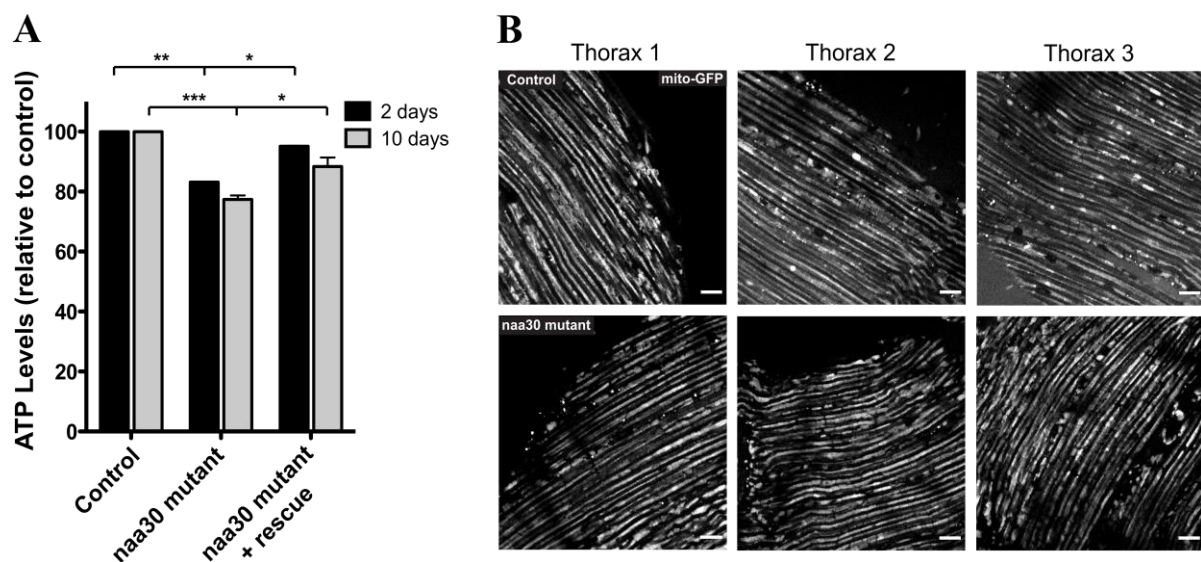


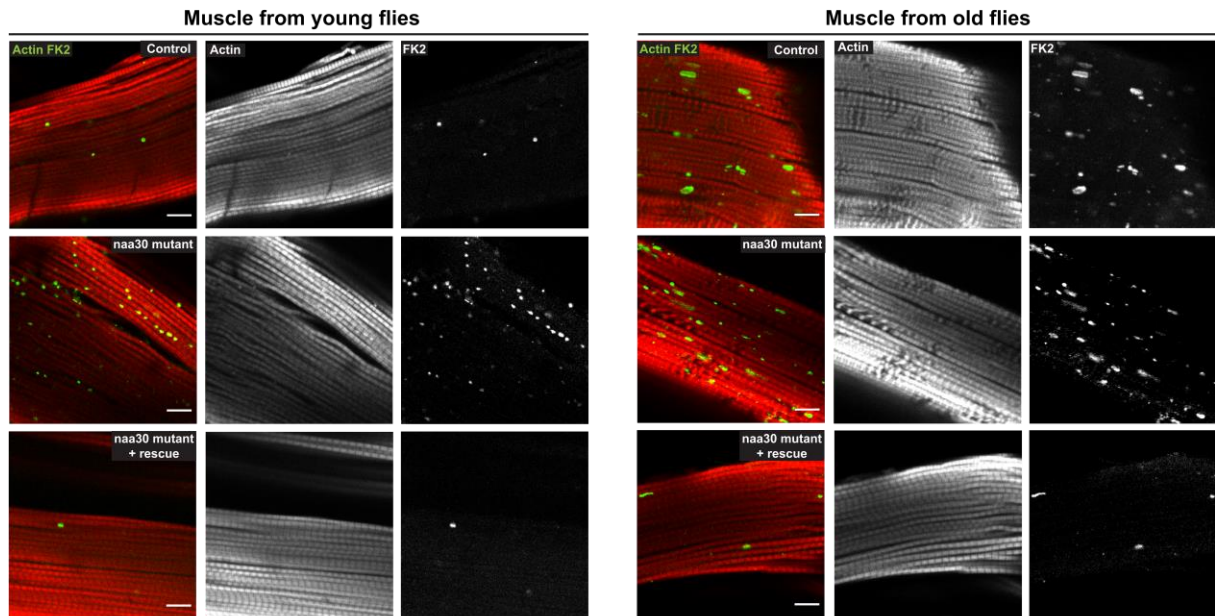
Figure 6 - *dNaa30* é necessário para manter os níveis normais de ATP, mas sua deleção não está associada a alterações óbvias na rede muscular mitocondrial. (A) Níveis totais de ATP em machos jovens (2 dias) e envelhecidos (10 dias) controle (y1 / Y), mutantes *naa30* (y1, *Naa30*^{Δ74}/Y) e mutantes *Naa30* com construção genômica *Naa30* (y1, *Naa30*^{Δ74}/Y;; g*Naa30*-myc/+). Os resultados são a média ± SEM de dois (2 dias de idade) ou três (10 dias de idade) experiências independentes (***p <0,0001, (** p <0,001, * p <0,01; ANOVA unidirecional com o teste de comparação múltipla de Dunnett) (B) Rede mitocondrial nos músculos indiretos de voo de machos jovens controle (1-1 dias) (y1/Y) ou machos jovens mutantes *Naa30* (y1, *Naa30*^{Δ74}/Y) marcados com UAS-mito-GFP expressos sob controle do driver Da-GAL4. Os resultados são mostrados para os músculos indiretos de voo de três tórax diferentes. A barra de escala é de 5 μm.

e. *dNaa30* é necessário para evitar a acumulação de agregados proteicos nos músculos

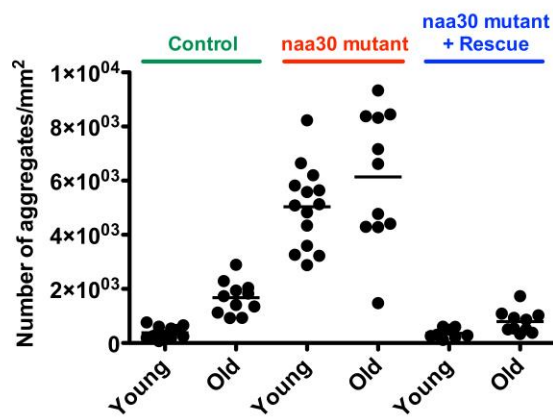
Tendo em conta os defeitos observados em torno da mobilidade e capacidade de voo de machos jovens (1-3 dias) com a deleção de *Naa30*, foram avaliados possíveis defeitos a nível dos músculos indiretos do voo, mais concretamente no tórax do organismo adulto. Tal como esperado (Demontis and Perrimon, 2010), os machos controlo (y/Y) mostraram um aumento da acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas nos músculos com a idade (Fig. 7A-B). Machos mutantes para *Naa30* (y/Y; *Naa30*^{Δ74}/FMO) apresentam um forte aumento na acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas, sendo este aumento semelhante em indivíduos novos (1-4 dias) e indivíduos envelhecidos (4 semanas) (Fig. 7A-B). Apesar do aumento quantitativo do número de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas nos músculos, estas eram, no entanto, morfológicamente semelhantes nos machos controlo e nos machos mutantes para *Naa30*. Estes resultados sugerem que *dNaa30* está envolvido na manutenção da homeostase proteica, possivelmente através da regulação da acumulação de proteínas poli-ubiquitinadas. Uma vez que a quantificação do número de agregados proteicos por mm² não mostra valores muito discrepantes entre as moscas mutantes jovens e envelhecidas, isto sugere que os defeitos de proteostase não aumentam ao longo do envelhecimento (Fig. 7B).

Para validar e confirmar os resultados obtidos no ensaio de imunohistoquímica, recorreu-se à técnica de imunodeteção de proteínas por *westernblot*. Primeiramente, através da utilização do anticorpo FK2, o mesmo utilizado no ensaio de imunohistoquímica, não foi possível detetar qualquer sinal de proteínas poli-ubiquitinadas (dados não mostrados). Contudo, com recurso ao anticorpo P4D1, foi possível observar que aparentemente há uma maior proporção de proteínas mono- e poli-ubiquitinadas no mutante em relação ao controlo, reforçando a hipótese de que *dNaa30* está envolvido na regulação da proteostase (Fig 7C; resultados preliminares).

A



B



C

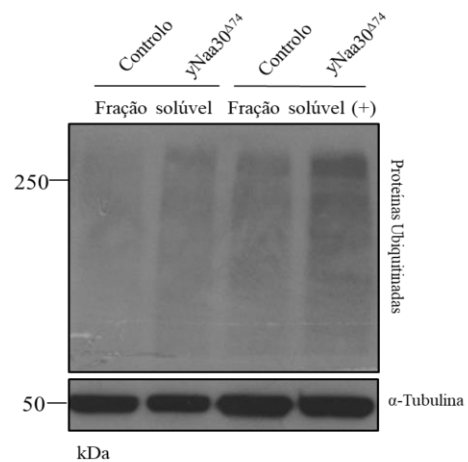


Figura 7 - *dNaa30* de *Drosophila* preserva a proteostase durante o envelhecimento. (A) Imunodeteção dos músculos indiretos de vôo de machos jovens (1-4 dias) e envelhecidos (28-31 dias) (*y1/Y*), machos mutantes *Naa30* (*y1*, *Naa30^{Δ74}/Y*) e machos mutantes *Naa30* com uma construção genômica de *Naa30* (*y1*, *Naa30^{Δ74}/Y*; *gNaa30-myc/+*), apresentam estruturas proteicas poli-ubiquitinadas semelhantes a agregados. A vermelho está representada a actina dos músculos corada com phalloidina-TRITC; A verde está representada a marcação anti-poli-ubiquitina (FK2). Barra de escala a 10 μ m. (B) Quantificação das estruturas proteicas poli-ubiquitinadas semelhantes a agregados (agregado/mm²) como mostrado em (A). Os resultados foram obtidos com machos recolhidos de dois cruzamentos independentes e cada ponto representa a densidade de agregação numa fibra muscular de um macho diferente. (C) Níveis de proteínas mono- e poli-ubiquitinadas detetadas num gel 6% acrilamida com o anticorpo P4D1 (Cell Signaling Technology). Estão representadas a fração solúvel com concentração de 1 μ g/ μ l e a fração solúvel com uma concentração superior a 1 μ g/ μ l (Fração solúvel (+)), dos extratos proteicos de tóraxes. O anticorpo α -Tubulina foi usado como controlo positivo e *loading* controlo.

f. Em indivíduos velhos, a acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas não se correlacionam com a perda da capacidade de locomoção

O aumento de estruturas poli-ubiquitinadas nos mutantes de *Naa30* sugere causalidade em termos de perda da motilidade de indivíduos adultos com a idade. No entanto é igualmente possível que apesar deste aumento estar relacionado com defeitos de proteostase, tal pode não estar directamente relacionado com o aumento dos defeitos de locomoção com a idade. Tal facto poderia facilmente explicar porque o declínio na locomoção em indivíduos velhos, não é acompanhado por um aumento significativo do número destas estruturas poli-ubiquitinadas nos músculos.

De modo a esclarecer esta questão, fomos investigar se o número de estruturas poli-ubiquitinadas consegue discriminar entre indivíduos com mais ou menos motilidade. Apesar de ter sido observada uma maior acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas em machos mutantes para *Naa30*, não existe nenhuma correlação em termos do número de estruturas, com a perda da capacidade de locomoção dos mesmos (Fig. 8). De um grupo de 200 machos mutantes para *Naa30* (7 a 10 dias pós-eclosão das pupas) foram seleccionados indivíduos com a melhor e a pior capacidade de locomoção (n=9 e n=11, respectivamente) (Fig. 8A). Apesar de haver uma diferença significativa na capacidade de locomoção entre os machos seleccionados (Fig. 8A), uma análise da acumulação de estruturas poli-ubiquitinadas nos músculos não mostrou diferenças significativas entre ambos (Fig. 8B). Isto sugere que os defeitos observados a nível da perda de capacidade de locomoção com a idade não estão directamente correlacionados com a acumulação de proteínas poli-ubiquitinadas.

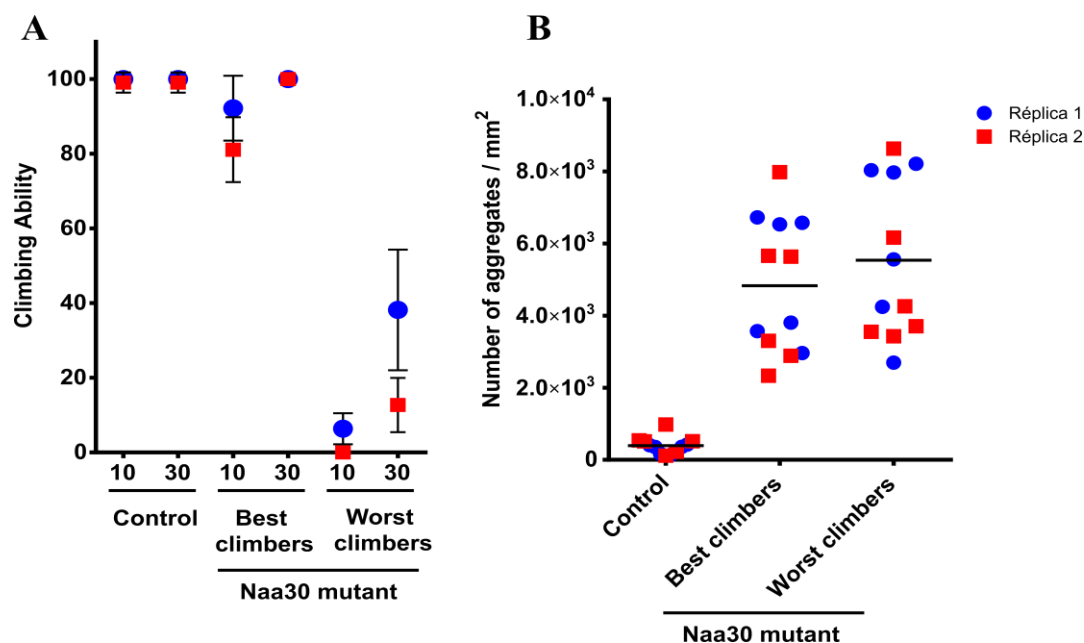


Figura 8 - A acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitadas não se correlacionam com a perda da capacidade de locomoção com a idade. (A) Capacidade de locomoção de 11 machos controlo seleccionados aleatoriamente (y^1/Y), de 9 machos mutantes *Naa30* (y^1 , $Naa30^{\Delta 74}/Y$) com boa capacidade de locomoção (*best climbers*) e de 11 machos mutantes *Naa30* com baixa capacidade de locomoção (*worst climbers*). A habilidade de locomoção representa a percentagem de machos que foram capazes de subir 8 cm após 10 e 30 segundos. Os resultados são a média \pm DP da capacidade média de locomoção dos grupos de machos avaliados com 10 repetições. **(B)** Quantificação das estruturas proteicas poli-ubiquitadas (agregado/mm²) presentes nos músculos indiretos de vôo de machos controlo (y^1/Y), de machos mutantes *Naa30* (*best climbers*) e de machos mutantes *Naa30* (*worst climbers*) utilizados previamente no ensaio de locomoção. A idade de todos os machos foi de 7 a 10 dias. Os resultados são de 2 réplicas biológicas diferentes.

g. *dNaa30* é necessário para a fertilidade dos machos

Paralelamente, avaliámos também o efeito da deleção de *Naa30* na fertilidade. Assim, cruzámos machos controlo (y/Y) e machos mutantes para *Naa30* (y/Y ; $Naa30^{\Delta 74}/FMO$) com 1-4 dias de idade, com fêmeas virgens selvagens com 5-7 dias de idade e avaliámos a fertilidade dos machos pela presença de descendência (crescimento de larvas no tubo). De modo a estimar individualmente a fertilidade dos machos, cada cruzamento foi feito com apenas 1 macho e 5 fêmeas virgens. Observámos que os machos mutantes para *Naa30* têm uma taxa de fertilidade extremamente baixa, quando comparados com o controlo (Fig. 9A).

Uma vez observados defeitos a nível da fertilidade de machos com deleção *Naa30*, fomos investigar o impacto da deleção deste gene na espermatogénese. Verificámos que, o gene *Naa30* não é essencial para a normal morfologia dos testículos (Fig. 9B) nem para a correta mobilidade do esperma (dados não mostrados). Assim, é pouco provável que a

redução de fertilidade dos machos *Naa30* seja devido a problemas na espermatogênese. Curiosamente, o genoma de *Drosophila* contém o gene *Naa30B* (CG32319), que codifica um parálogo de *Naa30* que é expresso especificamente nos testículos (modENCODE Tissue Expression Data; flybase.org), podendo, portanto, potencialmente compensar a ausência de *Naa30* na linhagem germinal masculina.

h. *dNaa30* é necessário para a copulação.

Os machos mutantes para *Naa30* não possuem problemas óbvios na espermatogênese que expliquem a redução de fertilidade, no entanto a redução de fertilidade poderá dever-se à incapacidade de machos *Naa30* copularem, uma vez que observamos uma forte redução de mobilidade. Assim, cruzámos machos selvagens, machos controlo (y/Y) e machos *Naa30* (y/Y; *Naa30*^{Δ74}/FMO) com 1-4 dias de idade com fêmeas virgens selvagens com 5-7 dias de idade e quantificámos a percentagem de casais que iniciaram cópula após 10, 15, 20 e 30 min. Observámos que os machos mutantes *Naa30*, embora tentem iniciar cópula e manifestem comportamentos característicos de *mating behaviour* (dados não mostrados), têm uma taxa de copulação extremamente baixa (Fig. 9C). Pelo contrário, machos selvagens e machos controlo têm uma taxa de copulação normal (Fig. 9C).

Além disso, analisámos a presença ou ausência de divisões nucleares sinciciais em embriões, uma vez que a presença destas divisões sugere a existência de fertilização. Os embriões resultantes de cruzamentos de machos controlo ou machos mutantes *Naa30* com 1-4 dias de idade com fêmeas virgens selvagens com 5-7 dias de idade foram analisados. A percentagem média das três réplicas biológicas, indica que 84% dos embriões resultantes do cruzamento de fêmeas virgens selvagens com machos mutantes *Naa30* (n=479) não apresentam divisões nucleares (Fig. 9D), ao contrário dos machos controlo onde a grande maioria dos embriões mostram divisões mitóticas (n=668) (Fig. 9D), corroborando deste modo os resultados obtidos no ensaio de copulação (Fig. 9C).

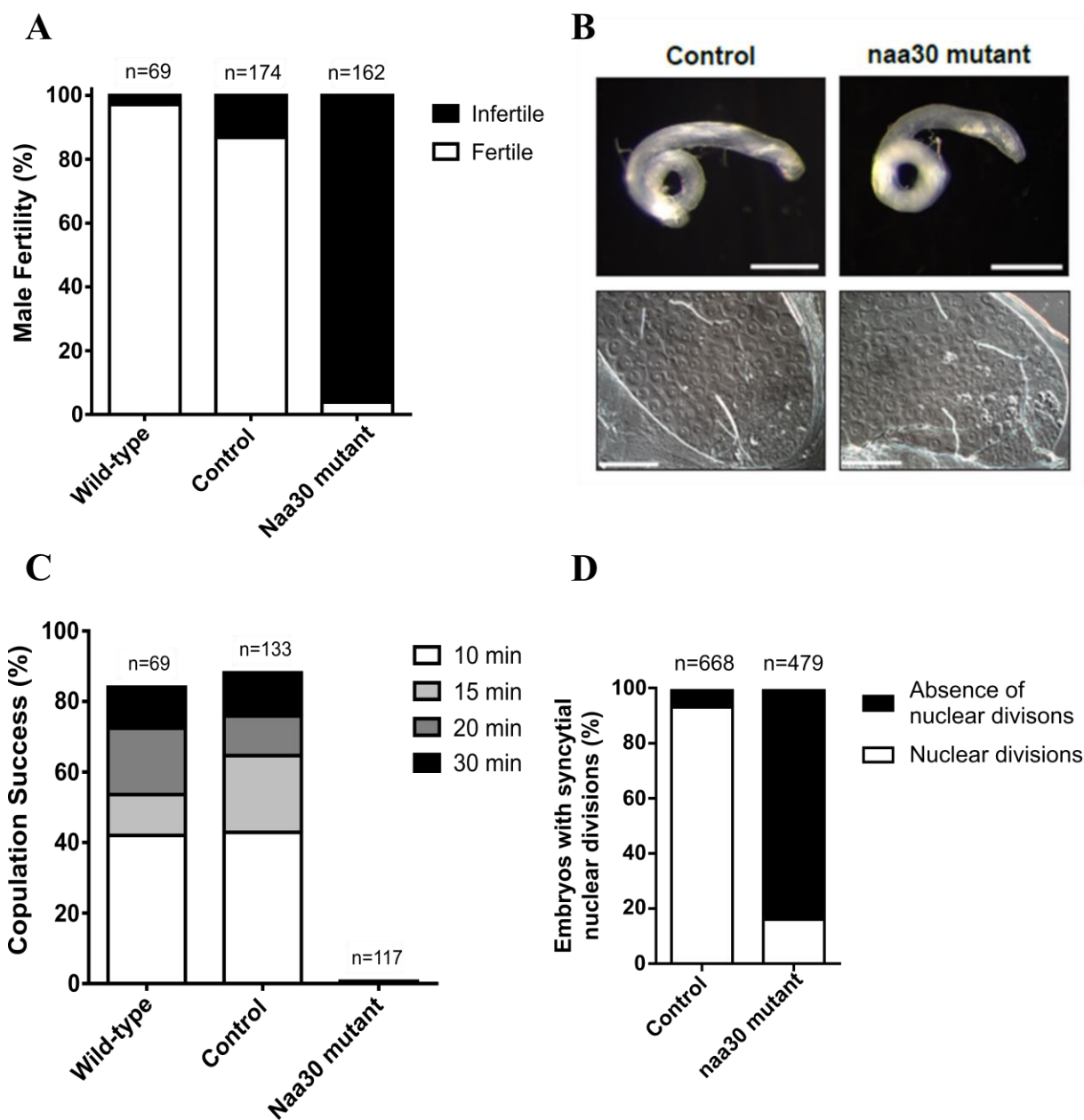


Figura 9 – *dNaa30* de *Drosophila* é necessário para a fertilidade de machos, para a copulação e para a ocorrência de divisões nucleares sinciais, mas não é necessário para a espermatogênese. (A) Fertilidade masculina medida cruzando individualmente machos de 1-4 dias selvagens (OR), machos controle ($y^1/Dp(1;Y)y^+$) e machos mutantes *Naa30* ($y^1, Naa30^{\Delta74}/Dp(1;Y)y^+$) com 5 virgens selvagens (OR). A fração de machos férteis foi avaliada pela presença de larvas no tubo. Os resultados obtidos resultam de machos recolhidos de 2 a 4 cruzamentos independentes; n representa o número total de machos testados. (B) Painel superior: Imagem de todo o testículo de machos mutantes *Naa30* ($yNaa30^{\Delta74} w/Y$) e controle ($yNaa30^{\Delta1} w/Y$); Barra de escala: 500 μm . Painel Inferior: Imagens com contraste de interferência diferencial (DIC) da ponta apical de testículos levemente esmagados de machos mutantes ($yNaa30^{\Delta74} w/Y$) e controle ($yNaa30^{\Delta1} w/Y$). Barra de escala: 20 μm . (C) Sucesso de copulação medido através da porcentagem de machos selvagens (OR) de 1-4 dias de idade, de machos controle ($y^1/Dp(1;Y)y^+$) e de machos mutantes *Naa30* ($y^1, Naa30^{\Delta74}/Dp(1;Y)y^+$) que foram capazes de iniciar a cópula com uma virgem fêmea selvagem (OR) com 5-7 dias de idade após 10, 15, 20 ou 30 minutos. Os resultados foram obtidos com machos recolhidos de 2 cruzamentos independentes; n representa o número total de machos testados. (E) Porcentagem de embriões com divisões nucleares sinciais dispostas por fêmeas selvagens (OR) cruzadas com machos controle com 1-4 dias de idade ($y^1/Dp(1;Y)y^+$) ou machos mutantes *Naa30* ($y^1, Naa30^{\Delta74}/Dp(1;Y)y^+$). A ausência de divisões nucleares sinciais sugere que a infertilidade masculina mutante *Naa30* não é um fenótipo zigótico. Os resultados são a soma de três experiências independentes; n representa o número total embriões observados.

i. Análise da função de Naa30B (CG32319) na espermatogénese

Uma vez que em *Drosophila melanogaster* existe um parólogo de *Naa30*, o *Naa30B* (CG32319), o qual é altamente expresso nos testículos (modENCODE Tissue Expression Data), é possível que tal explique a ausência de defeitos na espermatogénese após a depleção de *Naa30*.

Com o objetivo de testar o efeito de *Naa30B* na espermatogénese adaptamos a estratégia descrita em “Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*.” (Ni et al., 2008) para depletar *in vivo* *Naa30B* por RNA de interferência. Assim, começámos por desenhar dois oligonucleóticos para cada um dos *hairpins* para *Naa30B* seguindo as instruções em <https://fgr.hms.harvard.edu/cloning-and-sequencing>.

Após o desenho dos oligonucleóticos, foi feito o *annealing* para a gerar um fragmento de cadeia dupla, para a ligação ao plasmídeo Valium22. Primeiramente, foi feita a digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição (EcoR1 e NHEI) e o corte foi confirmado num gel (Fig. 10A). Posteriormente, após a reação de ligação entre cada um dos *hairpins* (*hairpin 1* e *hairpin 2*) e o plasmídeo, as amostras foram transformadas em bactérias. Após o aparecimento de colónias, foram selecionadas três colónias referentes ao *hairpin 1*, quatro colónias do *hairpin 2* e também foram selecionadas quatro colónias que cresceram no controlo negativo. De seguida, após extração do DNA, os produtos foram confirmados por PCR (Fig. 10B). Apesar do controlo negativo, da técnica de PCR apresentar uma banda, talvez pela presença de alguma contaminação, as amostras foram enviadas para sequenciação, uma vez que apresentaram o tamanho expectável equivalente à incorporação do fragmento (404pb). Através dos resultados de sequenciação verificou-se que apenas o fragmento do *hairpin 2*, foi incorporado no plasmídeo, tendo sido este plasmídeo enviado para injeção e produção de moscas transgénicas. O objetivo é utilizar estas moscas para fazer uma depleção da expressão de *Naa30B* especificamente na linhagem germinal masculina e testar a função desta enzima na espermatogénese.

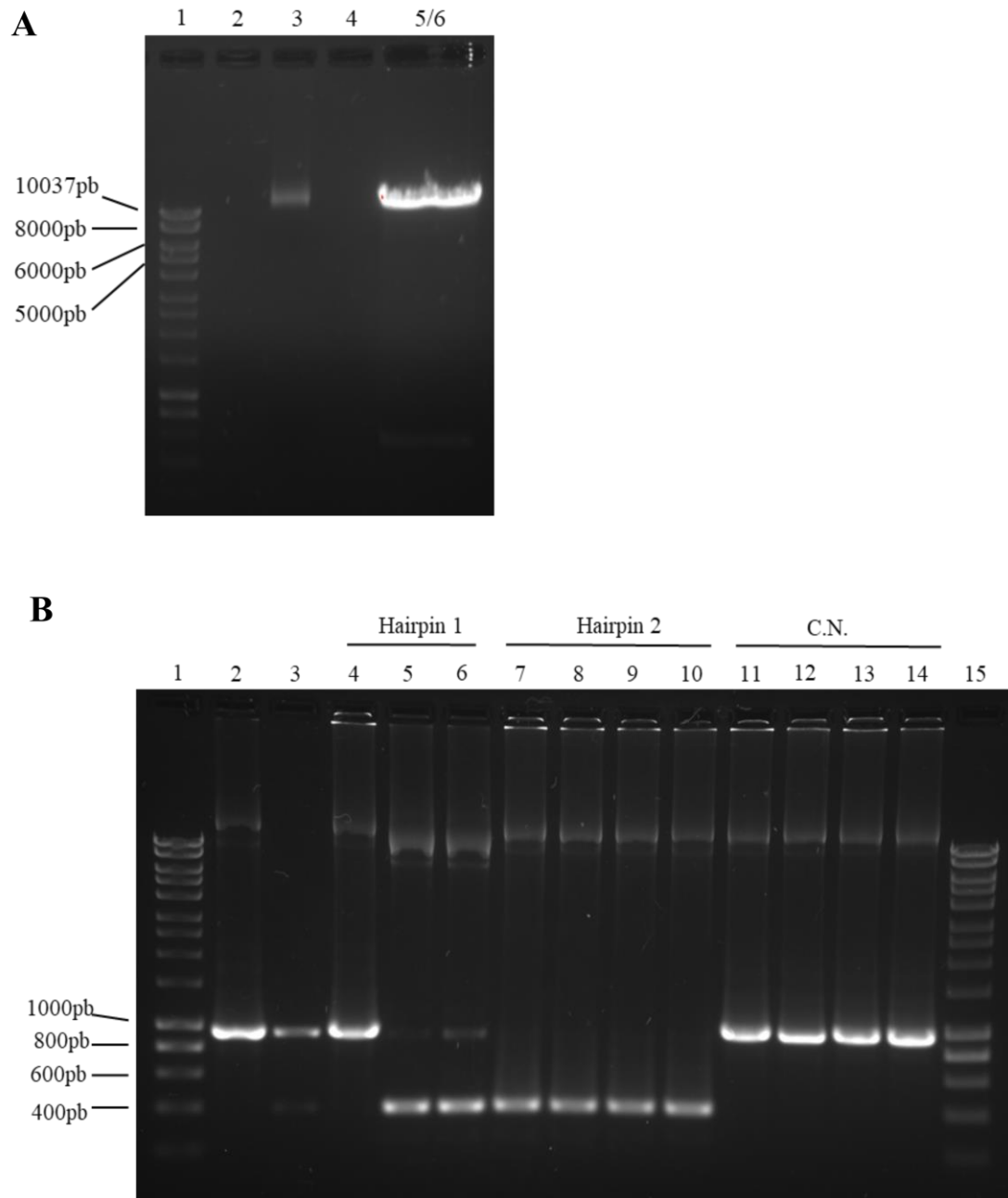


Figure 10 – Produção de um RNAi para o parálogo Naa30B (CG32319). (A) Confirmação da dupla digestão do plasmídeo com as enzimas EcoR1 e NHEI; 1- Marcador; 2 – Poço vazio; 3- Controlo positivo (plasmídeo não digerido); 4-Poço vazio; 5 e 6 - dupla digestão com as enzimas de restrição (EcoR1 e NHEI); (C) Confirmação da incorporação dos fragmentos no plasmídeo, num gel de agarose de 1%. 1-Marcador, 2 - Controlo Positivo (plasmídeo não digerido); 3 – Controlo negativo da técnica de PCR; 4,5 e 6 – amostras do hairpin 1; 7,8,9 e 10 – amostras do hairpin 2; 11,12,13 e 14 – amostras do controlo negativo da transformação de bactérias; 15 – Marcador.

5.2 Discussão

Uma vez que Naa30 tem importantes funções celulares noutros organismos, mas a função desta enzima durante o desenvolvimento ainda é pouco conhecida, um dos objetivos deste trabalho foi investigar a funções de Naa30 durante o desenvolvimento de *Drosophila*.

Os resultados indicam que *dNaa30* é necessário para a longevidade, fertilidade e mobilidade de *Drosophila*, sendo a sua função importante para a manutenção dos níveis normais de ATP e da homeostase proteica, evitando a acumulação de agregados proteicos.

No entanto, e contrariamente à nossa hipótese inicial, os resultados mostraram que a perda da mobilidade em indivíduos velhos não está diretamente correlacionada com a acumulação de estruturas proteicas poli-ubiquitinadas. Tal é consistente com o facto da mobilidade piorar drasticamente com a idade, em moscas mutantes para *Naa30*, mas o número de agregados, apesar de aumentado, não sofrer alterações significativas com a idade.

Deste modo a perda de mobilidade e a redução de longevidade em resultado da deleção de *dNaa30* provavelmente não deriva da acumulação de agregados proteicos, mas antes está possivelmente relacionado com a redução dos níveis celulares de ATP e eventualmente defeitos de proteostase.

dNaa30 mostrou ser necessário para manter os níveis de ATP, sugerindo que a depleção do gene compromete a função mitocondrial através da perda do potencial da membrana, tal como observado em células humanas (Damme et al., 2016). Contudo, não foram observadas alterações na rede muscular mitocondrial, o que sugere que ao contrário das células humanas (Damme et al., 2016), em *Drosophila Naa30* não é necessário para a manutenção da morfologia das mitocôndrias.

Arl8b é uma pequena GTPases da família Arf, e localizam-se nos lisossomas de células de mamíferos e de células de *Drosophila* (Hofmann and Munro, 2006). A acetilação de Arl8b pelo complexo NatC é necessária para a sua localização lisossomal e para a normal distribuição dos lisossomas dentro da célula. Complementarmente, a distribuição equilibrada de lisossomas na periferia e na zona perinuclear das células é dependente da motilidade dos lisossomas através dos microtúbulos. Assim sugerimos que, tal como em células humanas, a perda de *Naa30* pode eventualmente alterar a localização de Arl8b, afetando diretamente a distribuição dos lisossomas, comprometendo o processo autofágico e consequentemente desregulando a homeostase proteica. Assim seria útil determinar se Arl8b de *Drosophila*

depende e é acetilado N-terminalmente pelo complexo NatC e avaliar se os níveis de acetilação de Arl8b estão afetados em mutantes de *Drosophila* para *Naa30*. Na mesma medida, seria importante avaliar a localização de Arl8b em *Drosophila* e possíveis alterações na sua localização em mutantes *Naa30*.

Estudos anteriores sugerem que TOR é um alvo direto de *Naa30*, em peixe-zebra e estudos recentes revelam que Ar8b (MLALI) e mTOR (MLGTG) são substratos diretos de NatC, em células humanas (Starheim et al., 2009a). Assim, sugerimos que TOR é um alvo direto de NatC, em *Drosophila*, e que controla a longevidade e inibe o processo de envelhecimento, semelhantemente a estudos que correlacionaram a inibição de TOR com a extensão da vida útil de *Drosophila* (Kapahi et al., 2004). Ou seja, na presença de NatC há inibição do complexo TOR, permitindo a longevidade dos organismos. Sugerimos igualmente que, uma vez que TOR é um forte regulador da autofagia (Jung et al., 2010), aquando a depleção do complexo NatC, o processo autofágico fica comprometido e origina uma desregulação da proteostase e conseqüentemente a acumulação de estruturas proteicas.

Apesar de resultados preliminares confirmarem através da técnica de *westernblot*, que há uma maior proporção de proteínas mono- e poli-ubiquitinadas em mutantes, em relação ao controlo foram encontradas algumas dificuldades na realização e otimização da técnica. Primeiramente, através da utilização do mesmo anticorpo utilizado na técnica de imunohistoquímica (FK2), não foi possível detetar qualquer banda específica (dados não mostrados), sugerindo que o anticorpo parece não ser compatível com a técnica de *westernblot* ou requererá algum tipo de otimização. Face às dificuldades, a técnica foi otimizada conforme o protocolo descrito por (Demontis et al., 2010) e utilizou-se o anticorpo P4D1 (Cell Signaling Technology). Após a obtenção de resultados consistentes, um dos objetivos futuros é recorrer à técnica de imunoprecipitação com o intuito de identificar possíveis proteínas que sejam especificamente poli-ubiquitinadas no mutante.

Observou-se, paralelamente, que *dNaa30* é necessário para a fertilidade de machos, possivelmente devido à incapacidade destes copularem, fator que pode estar associado à fraca mobilidade. Dado que não foram observados defeitos a nível da espermatogénese associados a este gene sugerimos que o parálogo de *Naa30* (*Naa30B*), altamente expresso nos testículos, pode estar a compensar a ausência de defeitos na espermatogénese. O nosso objetivo é analisar o efeito depleção da expressão de *Naa30B* especificamente na linhagem germinal masculina e testar a função desta enzima na espermatogénese.

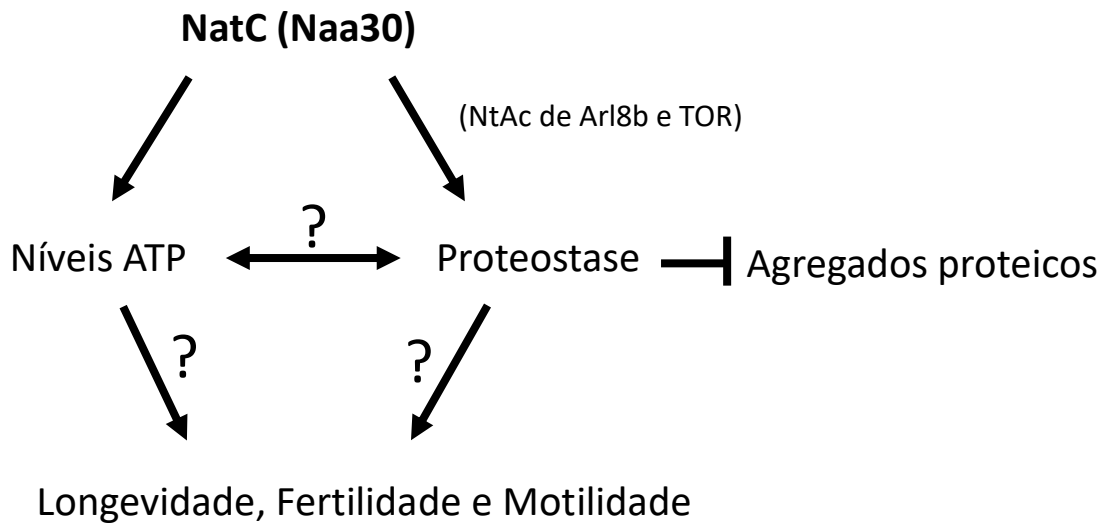


Figura 11 - Proposta de modelo das funções de NatC (Naa30) em *Drosophila melanogaster*. O complexo NatC é necessário para a motilidade, fertilidade e longevidade de indivíduos adultos de *Drosophila melanogaster* porque regula positivamente os níveis celulares de ATP e a proteostase. Esta função está potencialmente associada ao facto de NatC acetilar N-terminalmente os substratos Arl8b e TOR.

6. Capítulo NatF (Naa60)

6.1 Resultados

a. *dNaa60* não é um gene essencial ao desenvolvimento de *Drosophila*

Uma vez que a depleção de *dNaa60* em cultura de células de *Drosophila melanogaster* induz defeitos na divisão celular (Damme et al., 2011), o laboratório formulou a hipótese que Naa60 seria essencial para o desenvolvimento de *Drosophila*. De modo a testar esta hipótese foi gerado um mutante de *dNaa60* por excisão imprecisa de um transposão (elemento P). Utilizando esta técnica foi gerada uma deleção de 1305nt deste gene, tendo este mutante sido denominado como *dNaa60*^{Δ20} (Fig. 12). Surpreendentemente e apesar de *dNaa60*^{Δ20} ser provavelmente um alelo mutante de perda de função, verificou-se que a deleção deste gene não é essencial ao desenvolvimento de *Drosophila*, sendo os indivíduos adultos mutantes morfologicamente normais e férteis (Ana Rita-Marques e Rui Gonçalo Martinho, resultados não publicados).

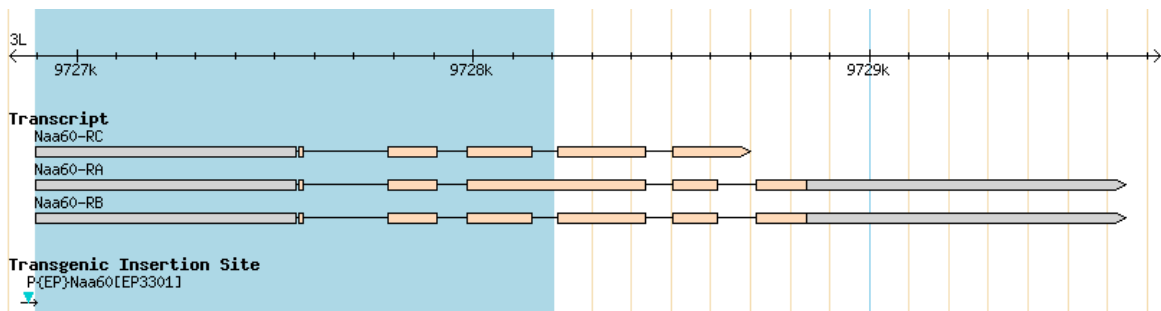


Figure 12 – Linha mutante com deleção do CG18177 (Naa60). As zonas cinzentas representam o 5' e o 3' UTR dos vários transcritos do gene Naa60. As zonas laranjas representam os exões dos genes. A sombra azul representa a região do genoma que foi deletada na linha *dNaa60*^{Δ20}. O triângulo azul representa o elemento P usado para criar a linha do mutante (<https://flybase.org>).

No entanto, e apesar de *dNaa60* não ser essencial em *Drosophila*, verificou-se que ao final de várias gerações as culturas de *Drosophila* mantinham uma elevada percentagem de indivíduos heterozigóticos para *dNaa60* (deleção *dNaa60*^{Δ20}/balanceador). Ora como a manutenção de um cromossoma balanceador sugere que os indivíduos heterozigóticos para *dNaa60*^{Δ20} têm alguma vantagem adaptativa quando comparados com os indivíduos homozigóticos para *dNaa60*^{Δ20}, decidimos investigar se a perda de função de *dNaa60* está associada a uma redução da fertilidade, capaz de compensar a redução de *fitness* associada à

presença de um cromossoma balanceador (o qual é letal em homozigotia e contém a mutação dominante).

b. *dNaa60* não é necessário para a fertilidade de machos

Primeiramente, começámos por caracterizar a fertilidade dos machos deletados para *dNaa60*. A fertilidade de machos homozigóticos para *dNaa60* ($w^{1118}; dNaa60^{A20}$) foi avaliada observando o aparecimento de larvas, após cruzamentos individuais de machos mutantes para *Naa60*, com fêmeas virgens selvagens (OR) com idades entre 3 e 8 dias. Apesar da réplica 1 demonstrar que apenas 60% dos machos com deleção (n=10) são férteis (Fig. 13A), os resultados obtidos nas réplicas 2 e 3 demonstram que 90% (n=20) e 100% (n=11) (Fig. 13B e 13C) dos machos são férteis, respetivamente, sugerindo que o gene *Naa60* não é necessário para a fertilidade dos machos. Com base no conjunto das três réplicas, foi calculada a fertilidade média dos machos, que demonstra que 85% dos machos mutantes foram férteis enquanto que 97% dos machos do grupo controlo (*white; w^{1118}*) foram férteis (Fig. 13D).

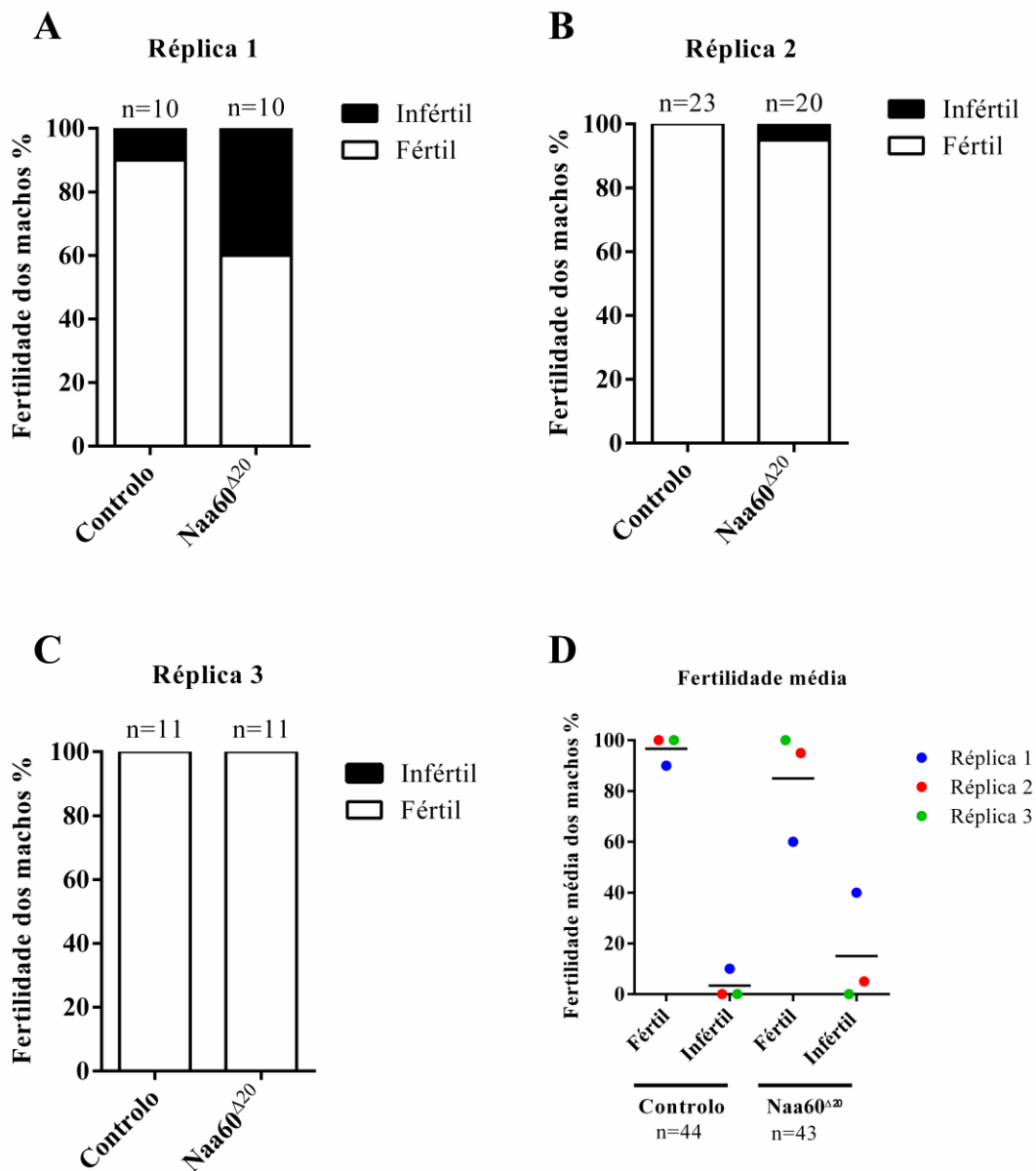


Figura 13 – *dNaa60* não é essencial para a fertilidade dos machos. A fertilidade masculina foi medida através do cruzamento individual de machos de 1-4 dias controlo (w^{1118}) e mutantes *Naa60* ($Naa60^{\Delta 20}$) com 5 virgens selvagens (OR), em 3 réplicas biológicas distintas. A fração de machos férteis foi avaliada pela presença de larvas no tubo. **(A)** Na réplica 1, o grupo controlo (n=10) apresentou 90% de fertilidade e o grupo experimental (n=10) 60% de fertilidade. **(B)** Na réplica 2, o grupo controlo (n=23) demonstrou 100% de fertilidade enquanto o grupo experimental (n=20) mostrou 95% de fertilidade. **(C)** Na réplica 3, ambos os grupos tiveram uma frequência de fertilidade de 100% (n=11). **(D)** A frequência média de fertilidade, das 3 réplicas, foi de 95% para o grupo controlo (n=33), e para o grupo experimental foi de 78% (n= 30).

c. *dNaa60* é necessário para a fertilidade das fêmeas

De seguida, avaliámos também a fertilidade das fêmeas. A fertilidade das fêmeas foi apreciada com base na frequência de eclosão dos embriões depositados por fêmeas deletadas para *Naa60* (homozigóticas para $w^{1118};; dNaa60^{\Delta 20}$) após o cruzamento com machos selvagens (OR). Os resultados obtidos mostram, em cada uma das réplicas, uma redução da frequência de eclosão de embriões depositados por fêmeas deletadas para *Naa60*, relativamente ao grupo controlo (w^{1118}) (Fig. 14A, B e C).

Para verificar se a redução da frequência de eclosão dos embriões, acontece devido à deleção de *Naa60*, e não devido a outra mutação no mesmo cromossoma, foram criadas fêmeas trans-heterozigóticas ($w^{1118};; Naa60^{\Delta 20}/Df(3L) BCL 392$), ou seja, indivíduos onde a função de *dNaa60* foi deletada usando dois mutantes diferentes: um alelo de perda de função e uma deleção que deleta vários genes, incluindo *dNaa60*. Neste caso, cruzámos fêmeas com uma deleção de parte do cromossoma 3 que inclui toda a zona do *Naa60* ($w^{1118};; Df(3L) BCL 392/TM6C, Sb, Cu$) com machos com o alelo *Naa60*^{Δ20} e avaliou-se a fertilidade das fêmeas trans-heterozigóticas resultantes desse cruzamento.

Uma vez que a fertilidade das fêmeas controlo (w^{1118}) era baixa, provavelmente devido a alguma mutação recessiva acumulada neste *stock*, optou-se por usar como controlo a frequência de eclosão de embriões provenientes de fêmeas heterozigóticas para a deleção de *Naa60* ($w^{1118};; Naa60^{\Delta 20}/+$). Com base nos resultados obtidos, em ambas as réplicas biológicas (Fig. 14D, E), foi possível confirmar uma redução de fertilidade no grupo de fêmeas mutantes para *dNaa60*, relativamente ao grupo de fêmeas heterozigóticas para *dNaa60*. No total a frequência de eclosão de embriões depositados por fêmeas heterozigóticas ($w^{1118};; Naa60^{\Delta 20}/+$, homozigóticas ($w^{1118};; Naa60^{\Delta 20}$) e trans-heterozigóticas para *dNaa60* ($w^{1118};; Naa60^{\Delta 20}/Df(3L) BCL 392$) foi, respectivamente, de 98%, 42% e 70% (Fig. 14F). Tal sugere que a perda de função de *dNaa60* está associado a uma redução de fertilidade em fêmeas adultas.

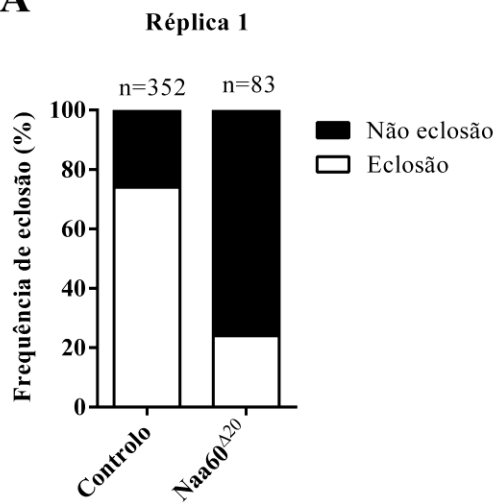
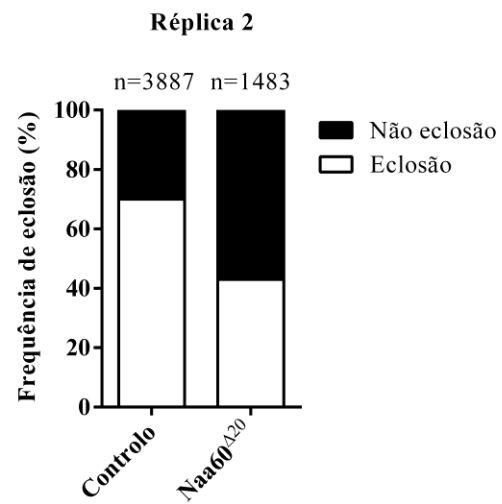
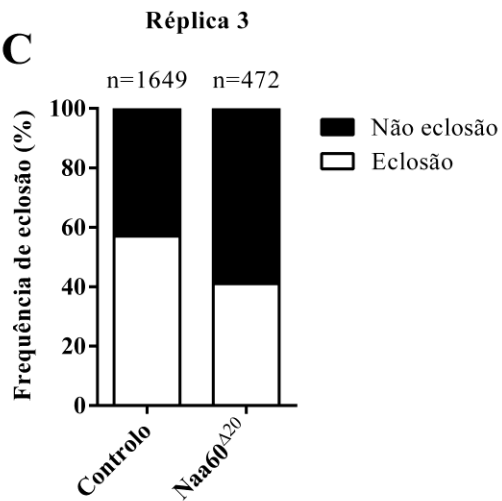
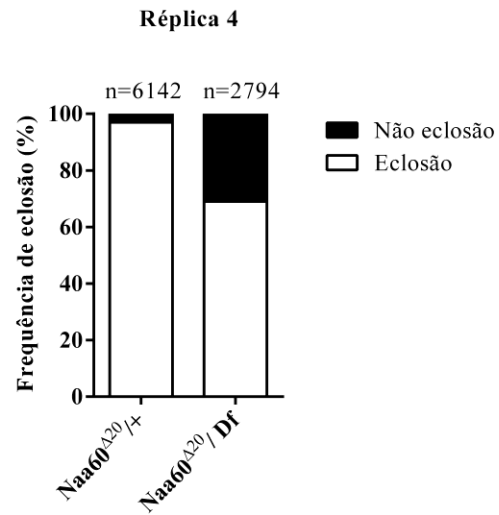
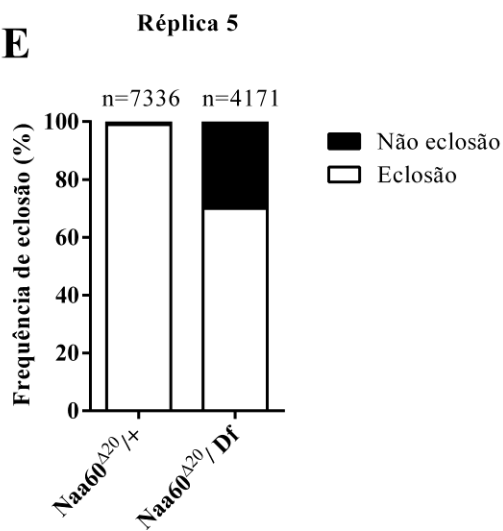
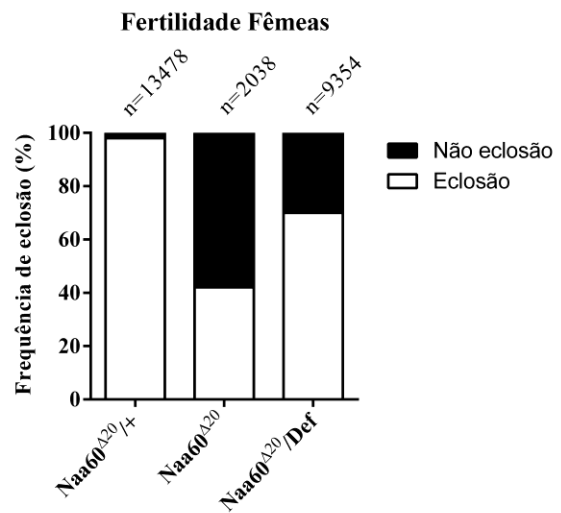
A**B****C****D****E****F**

Figure 14 – O gene *dNaa60* é essencial para a fertilidade das fêmeas. A fertilidade das fêmeas foi avaliada com base na frequência de eclosão dos embriões, resultantes do cruzamento de fêmeas controle (w^{1118}), fêmeas mutantes *Naa60* ($Naa60^{\Delta 20}$), fêmeas com um alelo da deleção *Naa60* ($Naa60^{\Delta 20/+}$) e fêmeas trans-heterozigóticas ($Naa60^{\Delta 20}/Df(3L)BCL\ 392$), com 1-5 dias, com machos selvagens (OR), em 2-3 réplicas biológicas distintas. **(A)** Na réplica 1, o grupo controle ($n=352$) apresentou 74% de frequência de eclosão e o grupo experimental apresentou 24% de frequência de eclosão ($n= 83$); **(B)** A réplica 2, mostrou que 73% dos embriões eclodiram no grupo controle ($n=3887$) enquanto que apenas 43% eclodiram no grupo mutante ($n=1483$); **(C)** Na réplica 3, houve 53% e 41% de eclosão, para o grupo controle ($n=1649$) e para o grupo com a mutação ($n=472$), respectivamente; **(D)** Na réplica 4, houve uma frequência de eclosão de 97% para o grupo de fêmeas com uma alelo da deleção ($n=6142$) e 69% para o grupo de fêmeas trans-heterozigóticas ($n=2794$); **(E)** Na réplica 5, obteve-se 99% e 70% de frequência de eclosão para o grupo de fêmeas com um alelo da deleção ($n=7336$) e trans-heterozigóticas ($n=4171$), respectivamente; **(F)** Frequência média de eclosão calculada através da soma do conjunto das réplicas. O grupo com apenas um alelo da deleção apresentou 98% de eclosão (conjunto de 2 réplicas biológicas), as fêmeas homozigóticas para o gene *Naa60* apresentaram 42% de frequência de eclosão (conjunto de 3 réplicas biológicas) e as fêmeas trans-heterozigóticas apresentaram 70% de eclosão (conjunto de 2 réplicas biológicas).

d. *dNaa60* não é essencial para os estádios iniciais de desenvolvimento embrionário de *Drosophila*

Uma vez que observámos uma redução de eclosão em mutantes maternas para *dNaa60*, fomos investigar o papel desse gene nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário de *Drosophila*. Assim, recolhemos embriões com 0-3h, provenientes de fêmeas mutantes para *dNaa60* ($w^{1118};;Naa60^{\Delta 20}$), previamente cruzadas com machos selvagens, e marcámos o DNA com DAPI de forma a avaliar defeitos nas divisões mitóticas ou durante a celularização. Através da análise das marcações foi possível verificar a inexistência de defeitos nas divisões mitóticas defeitos na celularização dos embriões (Fig. 14). Este resultado indica que *dNaa60* não é essencial para os primeiros estádios do desenvolvimento embrionário de *Drosophila*.

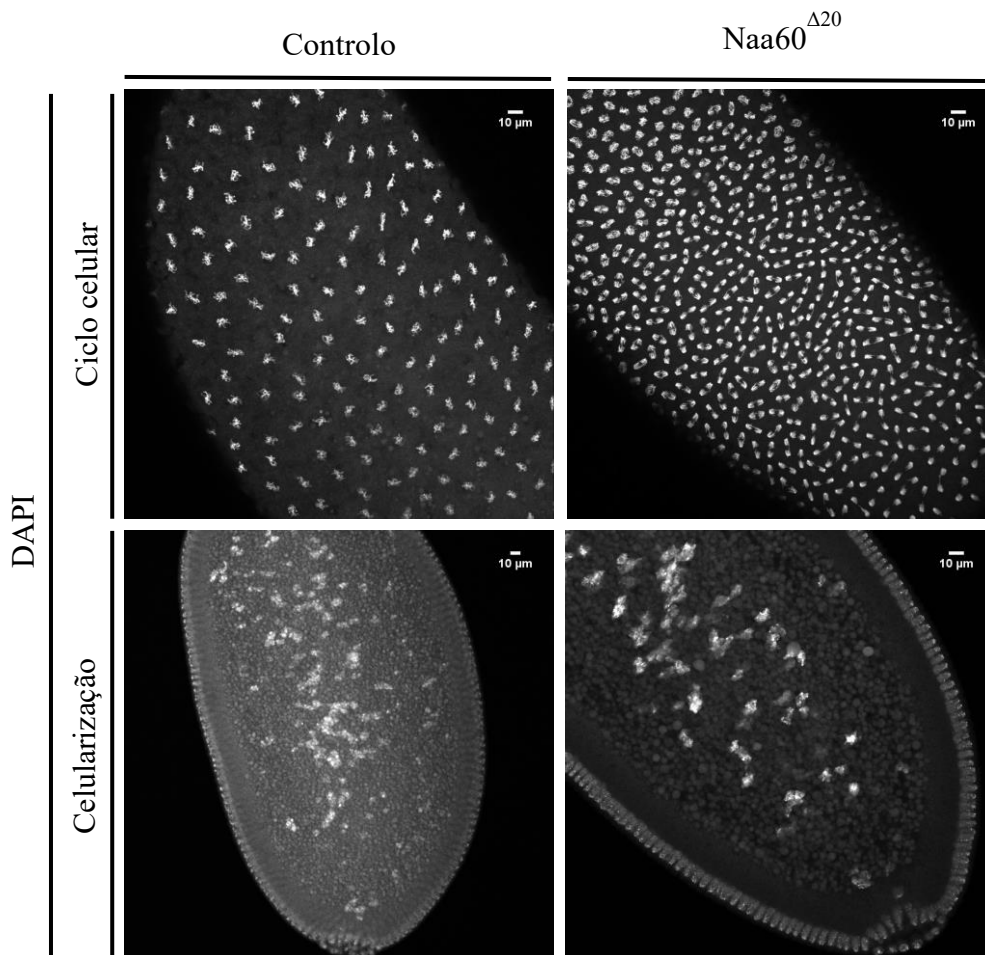


Figure 15 - *dNaa60* não é necessário para as divisões mitóticas embrionárias e para a formação da blastoderme. Os embriões têm um ciclo celular regulado e uma correta celularização da primeira camada de células. Os embriões foram montados em meio de montagem aquoso (Dako, Califórnia, EUA) e visualizados usando o microscópio Zeiss LSM710 Confocal. Marcação com DAPI; Barra de escala a 10μm.

e. *dNaa60* não é essencial para a oogénese

A redução da fertilidade de fêmeas mutantes *Naa60* não parece ser causada por defeitos de desenvolvimento dos embriões. No entanto, existe a possibilidade de que existam problemas durante a oogénese capazes de explicar a redução de fertilidade. Assim, para testar essa hipótese, analisámos os ovários de *Drosophila* controlo (*w*¹¹¹⁸) e mutantes *dNaa60* (*w*¹¹¹⁸;;*Naa60*^{Δ20}). Verificámos que não há defeitos significativos durante a oogénese em fêmeas mutantes para *dNaa60*. Isto sugere que, o gene *dNaa60* não é essencial durante a oogénese.

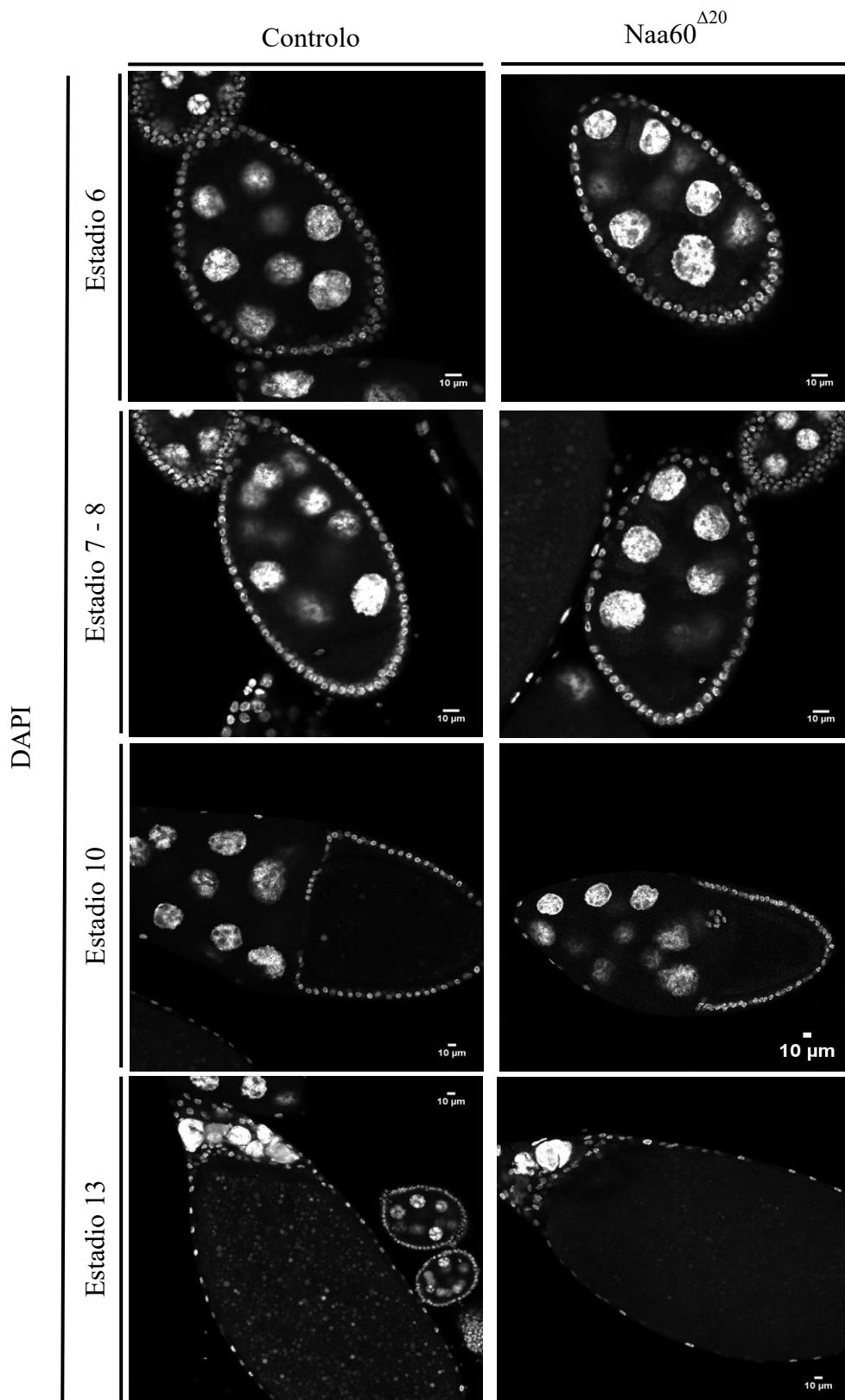


Figure 16 - *dNaa60* não é necessário durante o desenvolvimento do oócito. Morfologia do desenvolvimento dos ovários, durante o processo da oogénese (estadio 6,7,8,10 e 13). Os ovários foram montados em meio de montagem aquoso (Dako, Califórnia, EUA) e visualizados usando um microscópio Zeiss LSM710 Confocal. Marcação com DAPI; Barra de escala a 10μm

6.2 Discussão

Um dos objetivos deste projeto, foi caracterizar o papel de *dNaa60* durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*, uma vez a depleção deste gene em cultura de células de *Drosophila* (células S2) induz defeitos de segregação dos cromossomas durante a mitose (Damme et al., 2011).

Surpreendentemente, resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que a deleção de *dNaa60* não é essencial ao desenvolvimento de *Drosophila*, sendo os indivíduos adultos mutantes morfologicamente normais (Ana Rita-Marques e Rui Gonçalo Martinho, resultados não publicados). Tal sugere que os resultados previamente obtidos em cultura de células (Damme et al., 2011), não são reproduzidos no organismo.

Os resultados agora obtidos sugerem, no entanto que *dNaa60* é necessário para que a fertilidade de fêmeas seja normal, uma vez que a deleção deste gene resulta numa redução ligeira de fertilidade. Tendo em conta os resultados obtidos, mais estudos precisam de ser feitos para confirmar o efeito de *dNaa60* a nível da fertilidade das fêmeas e de que modo está a ser gerado esse efeito, uma vez que não foram encontrados defeitos durante a oogénese, nem durante os estádios iniciais de desenvolvimento embrionário.

O complexo NatF foi o primeiro complexo NAT identificado em mamíferos com associação a um organelo, estabelecendo uma associação com a membrana do complexo de Golgi (Damme et al., 2011; Aksnes et al., 2017) e foi observado que a depleção de *Naa60*, em células humanas, origina defeitos na aparência do complexo de Golgi (Aksnes et al., 2015). Assim, seria interessante averiguar o efeito de *dNaa60* no complexo de Golgi, em *Drosophila melanogaster*.

O facto dos fenótipos observados após a deleção de *dNaa60* serem fracos ou inexistentes pode ser explicada por uma elevada redundância entre NATs, tendo em conta que os complexos NatC, NatE e NatF têm potencialmente especificidade para o mesmo tipo de substratos.

Na mesma medida, seria relevante investigar se *dNaa60* é necessário para fertilidade de fêmeas e machos mutantes envelhecidos, com o intuito de avaliar o efeito da deleção de *dNaa60* durante o envelhecimento. Resultados preliminares não detetaram nenhum efeito da deleção deste gene na longevidade de indivíduos adultos (Rui Gonçalo Martinho, resultados não publicados).

7. Conclusões e perspectivas futuras

As N-terminal acetiltransferases estão extensivamente presentes em células eucariotas, e acetilam cerca de 80-90% do proteoma humano e 70-80% das proteínas de *Drosophila melanogaster*.

Através da realização deste trabalho foi possível decifrar alguns das funções desempenhados pelo complexo NatC e NatF em *Drosophila melanogaster*.

A caracterização fenotípica exaustiva de *Naa30* permitiu identificar a sua importância na longevidade, motilidade, fertilidade e manutenção dos níveis normais de ATP e proteostase. Apesar da identificação destes fenótipos, são precisos mais estudos para determinar as suas causas e como se relacionam. Por exemplo, propõe-se a análise das proteínas Ar81b e mTOR, em *Drosophila*. Com o intuito de explicar a ausência de defeitos na espermatogénese em mutantes *Naa30*, será feita uma análise da fertilidade e da espermatogénese em mutantes para *Naa30B*, um parálogo de *Naa30* expresso especificamente nos testículos.

Do mesmo modo, foi igualmente identificadas algumas funções de *Naa60* em *Drosophila*. Observou-se que *Naa60* é necessário para a fertilidade das fêmeas, embora não tenha sido detectado nenhum fenótipo durante o processo de oogénese e nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário.

No entanto, e tendo em conta o elevado número de substratos destas enzimas, os fenótipos observados em mutantes de *dNaa30* e *dNaa60* foram surpreendentemente fracos. Um elevado grau de redundância entre as diferentes NATs é uma possível explicação para tal facto, mas futuros estudos deverão ser feitos para clarificar esta questão.

Futuramente, e tal como já foi descrito em células humanas (Aksnes et al., 2015; Starheim et al., 2017), seria igualmente interessante avaliar o envolvimento de ambas as NATs a nível do complexo de Golgi de *Drosophila melanogaster*.

Conclui-se assim, através da realização deste projeto, que os complexos NATs podem exercer múltiplas funções reguladoras, implicadas no *fitness* do organismo o que incentiva cada vez mais ao estudo das mesmas.

8. Bibliografia

- Aksnes, H., P. Van Damme, M. Goris, K.K. Starheim, M. Marie, S.I. Støve, C. Hoel, T.V. Kalvik, K. Hole, N. Glomnes, C. Furnes, S. Ljostveit, M. Ziegler, M. Niere, K. Gevaert, and T. Arnesen. 2015. An Organellar N α -Acetyltransferase, Naa60, Acetylates Cytosolic N Termini of Transmembrane Proteins and Maintains Golgi Integrity. *Cell Rep.* 10:1362–1374. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.053.
- Aksnes, H., A. Drazic, M. Marie, and T. Arnesen. 2016. First Things First: Vital Protein Marks by N-terminal Acetyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 41:746–760. doi:10.1016/j.tibs.2016.07.005.
- Aksnes, H., M. Goris, Ø. Strømmland, A. Drazic, Q. Waheed, N. Reuter, and T. Arnesen. 2017. Molecular determinants of the N-Terminal acetyltransferase Naa60 anchoring to the Golgi membrane. *J. Biol. Chem.* 292:6821–6837. doi:10.1074/jbc.M116.770362.
- Aksnes, H., M. Marie, T. Arnesen, and A. Drazic. 2018. Actin polymerization and cell motility are affected by NAA80-mediated posttranslational N-terminal acetylation of actin. *Commun. Integr. Biol.* 11:1–5. doi:10.1080/19420889.2018.1526572.
- Aksnes, H., C. Osberg, and T. Arnesen. 2013. N-Terminal Acetylation by NatC Is Not a General Determinant for Substrate Subcellular Localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 8:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0061012.
- Aksnes, H., R. Ree, and T. Arnesen. 2019. Co-translational, Post-translational, and Non-catalytic Roles of N-Terminal Acetyltransferases. *Mol. Cell.* 73:1–18. doi:10.1016/j.molcel.2019.02.007.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2015. *Molecular Biology of The Cell*. Sixth Edit. 1465 pp.
- Arnaudo, N., I.S. Fernández, S.H. McLaughlin, S.Y. Peak-chew, D. Rhodes, and F. Martino. 2013. The N-terminal acetylation of Sir3 stabilizes its binding to the nucleosome core particle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:1–8. doi:10.1038/nsmb.2641.The.
- Arnesen, T., D. Anderson, C. Baldersheim, M. Lanotte, J.E. Varhaug, and J.R. Lillehaug. 2005. Identification and characterization of the human ARD1-NATH protein acetyltransferase complex. *Biochem. J.* 386:433–443.
- Arnesen, T., D. Anderson, J. Torsvik, H.B. Halseth, J. Erik, and J.R. Lillehaug. 2006. Cloning and characterization of hNAT5/hSAN: An evolutionarily conserved component of the NatA protein N- α -acetyltransferase complex. *Gene.* 371:291–295. doi:10.1016/j.gene.2005.12.008.
- Arnesen, T., P. Van Damme, B. Polevoda, K. Helsens, R. Evjenth, N. Colaert, J.E. Varhaug, J. Vandekerckhove, J.R. Lillehaug, F. Sherman, and K. Gevaert. 2009. Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:8157–8162.
- Arnesen, T., K.K. Starheim, P. Van Damme, R. Evjenth, H. Dinh, M.J. Betts, A. Rynningen, K. Gevaert, and D. Anderson. 2010. The Chaperone-Like Protein HYPK Acts Together with NatA in Cotranslational N-Terminal Acetylation and Prevention of Huntingtin Aggregation. *Mol. Cell. Biol.* 30:1898–1909. doi:10.1128/MCB.01199-09.

- Behnia, R., B. Panic, J.R.C. Whyte, and S. Munro. 2004. Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. *Nat. Cell Biol.* 6:405–413. doi:10.1038/ncb1120.
- Bienvenut, W. V, D. Sumpton, A. Martinez, S. Lilla, C. Espagne, T. Meinel, and C. Giglione. 2012. Comparative Large Scale Characterization of Plant versus Mammal Proteins Reveals Similar and Idiosyncratic N- α -Acetylation Features. *Mol. Cell. Proteomics.* 11:1–14. doi:10.1074/mcp.M111.015131.
- Brown, J.L., and W.K. Roberts. 1976. Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from Ehrlich ascites cells are N α acetylated. *J. Biol. Chem.* 251:1009–1014.
- Choudhary, C., B.T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, and M. Mann. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:536–550. doi:10.1038/nrm3841.
- Chu, C., F. Hou, J. Zhang, L. Phu, A. V Loktev, D.S. Kirkpatrick, P.K. Jackson, Y. Zhao, and H. Zou. 2011. A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol. Biol. Cell.* 22:448–456. doi:10.1091/mbc.E10-03-0203.
- Damme, P. Van, K. Hole, A. Pimenta-Marques, K. Helsens, J. Vandekerckhove, R.G. Martinho, K. Gevaert, and T. Arnesen. 2011. NatF contributes to an Evolutionary Shift in Protein N-Terminal Acetylation and Is Important for Normal Chromosome Segregation. *PLoS Genet.* 7:1–19. doi:10.1371/journal.pgen.1002169.
- Damme, P. Van, T. V Kalvik, K.K. Starheim, V. Jonckheere, L.M. Myklebust, G. Menschaert, J.E. Varhaug, K. Gevaert, and T. Arnesen. 2016. A Role for Human N-alpha acetyltransferase 30 (Naa30) in Maintaining Mitochondrial Integrity. *Mol. Cell. Proteomics.* 15:3361–3372. doi:10.1074/mcp.M116.061010.
- Damme, P. Van, M. Lasa, B. Polevoda, C. Gazquez, A. Elosegui-Artola, D.S. Kim, E. De Juan-Pardo, K. Demeyer, K. Hole, E. Larrea, E. Timmerman, J. Prieto, T. Arnesen, F. Sherman, K. Gevaert, and R. Aldabe. 2012. N-terminal acetylome analyses and functional insights of the N-terminal acetyltransferase NatB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:12449–12454. doi:10.1073/pnas.1210303109.
- Demetriadou, C., D. Pavlou, F. Mpekris, C. Achilleos, T. Stylianopoulos, A. Zaravinos, P. Papageorgis, and A. Kirmizis. 2019. NAA40 contributes to colorectal cancer growth by controlling PRMT5 expression. *Cell Death Dis.* 10. doi:10.1038/s41419-019-1487-3.
- Demontis, F., and N. Perrimon. 2010. FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell.* 143:813–825. doi:10.1016/j.cell.2010.10.007.
- Dikiy, I., and D. Eliezer. 2014. N-terminal Acetylation stabilizes N-terminal Helicity in Lipid- and Micelle-bound α -Synuclein and increases its affinity for Physiological Membranes. *J. Biol. Chem.* 289:3652–3665. doi:10.1074/jbc.M113.512459.
- Dinh, T. V, W. V Bienvenut, E. Linster, A. Feldman-Salit, V.A. Jung, T. Meinel, R. Hell, C. Giglione, and M. Wirtz. 2015. Molecular identification and functional characterization of the first N α -acetyltransferase in plastids by global acetylome profiling. *Proteomics.* 15:2426–2435. doi:10.1002/pmic.201500025.

- Donaldson, J.G., and C.L. Jackson. 2012. Arf Family G Proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:362–375. doi:10.1038/nrm3117.Arf.
- Drazic, A., H. Aksnes, M. Marie, M. Boczkowska, S. Varland, E. Timmerman, H. Foyn, N. Glomnes, G. Rebowski, F. Impens, K. Gevaert, R. Dominguez, and T. Arnesen. 2018. NAA80 is actin's N-terminal acetyltransferase and regulates cytoskeleton assembly and cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115:4399–4404. doi:10.1073/pnas.1718336115.
- Evjenth, R., K. Hole, O.A. Karlsen, M. Ziegler, T. Amesen, and J.R. Lillehaug. 2009. Human Naa50p (Nat5/San) Displays Both Protein N α - and N ϵ -Acetyltransferase Activity. *J. Biol. Chem.* 284:31122–31129. doi:10.1074/jbc.M109.001347.
- Forte, G.M.A., M.R. Pool, and C.J. Stirling. 2011. N-terminal Acetylation Inhibits Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol.* 9:1–13. doi:10.1371/journal.pbio.1001073.
- Frottin, F., A. Martinez, P. Peynot, S. Mitra, R.C. Holz, C. Giglione, and T. Meinnel. 2006. The Proteomics of N-terminal Methionine Cleavage. *Mol. Cell. Proteomics.* 5:2336–2349. doi:10.1074/mcp.M600225-MCP200.
- Gautschi, M., A. Mun, S. Ross, P. Ru, Y. Dubaquié, A. Ehrenhofer-murray, and S. Rospert. 2003. The Yeast N α -Acetyltransferase NatA Is Quantitatively Anchored to the Ribosome and Interacts with Nascent Polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* 23:7403–7414. doi:10.1128/MCB.23.20.7403.
- Gillingham, A.K., and S. Munro. 2007. The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:579–611. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123209.
- Goetze, S., E. Qeli, C. Mosimann, A. Staes, B. Gerrits, B. Roschitzki, S. Mohanty, E.M. Niederer, E. Laczko, E. Timmerman, V. Lange, E. Hafen, R. Aebersold, J. Vandekerckhove, K. Basler, C.H. Ahrens, K. Gevaert, and E. Brunner. 2009. Identification and Functional Characterization of N-terminally Acetylated Proteins in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 7:1–16. doi:10.1371/journal.pbio.1000236.
- Gonatas, N.K., A. Stieber, and J.O. Gonatas. 2006. Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J. Neurol. Sci.* 246:21–30. doi:10.1016/j.jns.2006.01.019.
- Gromyko, D., T. Arnesen, A. Rynningen, J.E. Varhaug, and J.R. Lillehaug. 2010. Depletion of the human N α -terminal acetyltransferase A induces p53-dependent apoptosis and p53-independent growth inhibition. *Int. J. Cancer.* 127:2777–2789. doi:10.1002/ijc.25275.
- Harada, A., Y. Takei, Y. Kanai, Y. Tanaka, S. Nonaka, and N. Hirokawa. 1998. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* 141:51–59. doi:10.1083/jcb.141.1.51.
- Hershko, A., H. Heller, E. Eytan, G. Kaklij, and I.A. Rose. 1984. Role of the α -amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:7021–7025. doi:10.1073/pnas.81.22.7021.
- Hofmann, I., and S. Munro. 2006. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility. *J. Cell Sci.* 119:1494–1503. doi:10.1242/jcs.02958.

- Hole, K., P. van Damme, M. Dalva, H. Aksnes, N. Glomnes, J.E. Varhaug, J.R. Lillehaug, K. Gevaert, and T. Arnesen. 2011. The human N-Alpha-acetyltransferase 40 (hNaa40p/hNatD) is conserved from yeast and N-terminally acetylates histones H2A and H4. *PLoS One*. 6:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0024713.
- Holmes, W.M., B.K. Mannakee, R.N. Gutenkunst, and T.R. Serio. 2014. Loss of amino-terminal acetylation suppresses a prion phenotype by modulating global protein folding. *Nat. Commun.* 5:1–11. doi:10.1038/ncomms5383.
- Hong, H., Y. Cai, S. Zhang, H. Ding, H. Wang, and A. Han. 2017. Molecular Basis of Substrate Specific Acetylation by N-Terminal Acetyltransferase NatB. *Structure*. 25:641–649.e3. doi:10.1016/j.str.2017.03.003.
- Hou, F., C.W. Chu, X. Kong, K. Yokomori, and H. Zou. 2007. The acetyltransferase activity of San stabilizes the mitotic cohesin at the centromeres in a shugoshin-independent manner. *J. Cell Biol.* 177:587–597. doi:10.1083/jcb.200701043.
- Hua, K.T., C.T. Tan, G. Johansson, J.M. Lee, P.W. Yang, H.Y. Lu, C.K. Chen, J.L. Su, P.S.B. Chen, Y.L. Wu, C.C. Chi, H.J. Kao, H.J. Shih, M.W. Chen, M.H. Chien, P.S. Chen, W.J. Lee, T.Y. Cheng, G. Rosenberger, C.Y. Chai, C.J. Yang, M.S. Huang, T.C. Lai, T.Y. Chou, M. Hsiao, and M.L. Kuo. 2011. N- α -Acetyltransferase 10 Protein Suppresses Cancer Cell Metastasis by Binding PIX Proteins and Inhibiting Cdc42/Rac1 Activity. *Cancer Cell*. 19:218–231. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.010.
- Hwang, C.S., A. Shemorry, and A. Varshavsky. 2010. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science (80-.)*. 327:973–977. doi:10.1126/science.1183147.
- Ingram, A.K., G.A.M. Cross, and D. Horn. 2000. Genetic manipulation indicates that ARD1 is an essential N α -acetyltransferase in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111:309–317. doi:10.1016/S0166-6851(00)00322-4.
- Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, and J. Neefjes. 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* 11:1680–1685. doi:10.1016/S0960-9822(01)00531-0.
- Jung, C.H., S.-H. Ro, J. Cao, N.M. Otto, and D.-H. Kim. 2010. mTOR regulation of autophagy. *Natl. Institutes Heal.* 584:1287–1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.mTOR.
- Kapahi, P., B.M. Zid, T. Harper, D. Koslover, V. Sapin, and S. Benzer. 2004. Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Curr. Biol.* 14:885–890. doi:10.1016/j.
- Kreft, M.E., D. Giandomenico, G. V Beznoussenko, N. Resnik, A.A. Mironov, and K. Jezernik. 2010. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biol. Cell*. 102:593–607. doi:10.1042/bc20100024.
- Kuo, H.P., D.F. Lee, C. Te Chen, M. Liu, C.K. Chou, H.J. Lee, Y. Du, X. Xie, Y. Wei, W. Xia, Z. Weihua, J.Y. Yang, C.J. Yen, T.H. Huang, M. Tan, G. Xing, Y. Zhao, C.H. Lin, S.F. Tsai, I.J. Fidler, and M.C. Hung. 2010. ARD1 stabilization of TSC2 suppresses tumorigenesis through the mTOR signaling pathway. *Sci. Signal.* 3:1–13. doi:10.1126/scisignal.2000590.

- Lee, E.J., J.H. Seo, J. Park, T.T.L. Vo, S. An, S.-J. Bae, H. Le, H.S. Lee, H. Wee, D. Lee, Y. Chung, J.A. Kim, M.-K. Jang, S.H. Ryu, E. Yu, S.H. Jang, Z.Y. Park, and K.-W. Kim. 2017. SAMHD1 acetylation enhances its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity and promotes cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 8:68517–68529. doi:10.18632/oncotarget.19704.
- Liszczyk, G., J.M. Goldberg, H. Foy, E.J. Petersson, T. Arnesen, and R. Marmorstein. 2013. Molecular Basis for Amino-Terminal Acetylation by the Heterodimeric NatA Complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:1098–1105. doi:10.1038/nsmb.2636.
- Liu, Z., Y. Liu, H. Wang, X. Ge, Q. Jin, G. Ding, Y. Hu, B. Zhou, Z. Chen, X. Ge, B. Zhang, X. Man, and Q. Zhai. 2009. Patt1, a novel protein acetyltransferase that is highly expressed in liver and downregulated in hepatocellular carcinoma, enhances apoptosis of hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:2528–2537. doi:10.1016/j.biocel.2009.08.009.
- Lodish, H., A. Berk, S. Zipursky, and E. All. 2000. Folding, Modification, and Degradation of Proteins (Section 3.2). In *Molecular Cell Biology* 4th edition. New York: W. H. Freeman;
- Magin, R.S., S. Deng, H. Zhang, B. Cooperman, and R. Marmorstein. 2017. Probing the interaction between NatA and the ribosome for co-translational protein acetylation. *PLoS One*. 12:1–16. doi:10.1371/journal.pone.0186278.
- Matteoni, R., and T.E. Kreis. 1987. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* 105:1253–1265. doi:10.1083/jcb.105.3.1253.
- Midorikawa, Y., S. Tsutsumi, H. Taniguchi, M. Ishii, Y. Kobune, T. Kodama, M. Makuuchi, and H. Aburatani. 2002. Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Japanese J. Cancer Res.* 93:636–643. doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb01301.x.
- Miotto, M.C., A.A. Valiente-Gabioud, G. Rossetti, M. Zweckstetter, P. Carloni, P. Selenko, C. Griesinger, A. Binolfi, and C.O. Fernández. 2015. Copper Binding to the N-Terminally Acetylated, Naturally Occurring Form of Alpha-Synuclein Induces Local Helical Folding. *J. Am. Chem. Soc.* 137:6444–6447. doi:10.1021/jacs.5b01911.
- Mueller, A.G., M. Moser, R. Kluge, S. Leder, M. Blum, R. Buttner, H.-G. Joost, and A. Schurmann. 2002. Embryonic Lethality Caused by Apoptosis during Gastrulation in Mice Lacking the Gene of the ADP-Ribosylation Factor-Related Protein 1. *Mol. Cell Biol.* 22:1488–1494. doi:10.1128/mcb.22.5.1488-1494.2002.
- Mughal, A.A., Z. Grieg, H. Skjellegrind, A. Fayzullin, M. Lamkhannat, M. Joel, M.S. Ahmed, W. Murrell, E.O. Vik-Mo, I.A. Langmoen, and B. Stangeland. 2015. Knockdown of NAT12/NAA30 reduces tumorigenic features of glioblastoma-initiating cells. *Mol. Cancer*. 14:1–18. doi:10.1186/s12943-015-0432-z.
- Mullen, J.R., P.S. Kayne, R.P. Moerschell, S. Tsunasawa, M. Gribskov, M. Colavito-Shepanski, M. Grunstein, F. Sherman, and R. Sternglanz. 1989. Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *EMBO J.* 8:2067–2075. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb03615.x.
- Murthi, A., and A.K. Hopper. 2005. Genome-wide screen for inner nuclear membrane protein targeting in *Saccharomyces cerevisiae*: Roles for N-acetylation and an integral membrane protein. *Genetics*. 170:1553–1560. doi:10.1534/genetics.105.043620.

- Myklebust, L.M., P. Van Damme, S.I. Støve, M.J. Dörfel, A. Abboud, T. V Kalvik, C. Grauffel, V. Jonckheere, Y. Wu, J. Swensen, H. Kaasa, G. Liszczak, R. Marmorstein, N. Reuter, G.J. Lyon, K. Gevaert, and T. Arnesen. 2014. Biochemical and cellular analysis of Ogden syndrome reveals downstream N α -acetylation defects. *Hum. Mol. Genet.* 24:1956–1976. doi:10.1093/hmg/ddu611.
- Neri, L., M. Lasa, A. Elosegui-Artola, D. D’Avola, B. Carte, C. Gazquez, S. Alve, P. Roca-Cusachs, M. Iñarrairaegui, J. Herrero, J. Prieto, B. Sangro, and R. Aldabe. 2017. NatB-mediated protein N α -terminal acetylation is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 8:40967–40981. doi:10.18632/oncotarget.17332.
- Neuwald, A.F., and D. Landsman. 1997. GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem. Sci.* 22:154–155.
- Ni, J.Q., M. Markstein, R. Binari, B. Pfeiffer, L.P. Liu, C. Villalta, M. Booker, L. Perkins, and N. Perrimon. 2008. Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods.* 5:49–51. doi:10.1038/nmeth1146.
- Osberg, C., H. Aksnes, S. Ninzima, M. Marie, and T. Arnesen. 2016. Microscopy-based *Saccharomyces cerevisiae* complementation model reveals functional conservation and redundancy of N-terminal acetyltransferases. *Sci. Rep.* 6:1–10. doi:10.1038/srep31627.
- Pavlou, D., and A. Kirmizis. 2016. Depletion of histone N-terminal-acetyltransferase Naa40 induces p53-independent apoptosis in colorectal cancer cells via the mitochondrial pathway. *Apoptosis.* 21:298–311. doi:10.1007/s10495-015-1207-0.
- Pimenta-Marques, A., R. Tostões, T. Marty, V. Barbosa, R. Lehmann, and R.G. Martinho. 2008. Differential requirements of a mitotic acetyltransferase in somatic and germ line cells. *Dev. Biol.* 323:197–206. doi:10.1016/j.ydbio.2008.08.021.
- Polevoda, B., S. Brown, T.S. Cardillo, S. Rigby, and F. Sherman. 2008. Yeast N α -terminal acetyltransferases are associated with ribosomes. *J. Cell. Biochem.* 103:492–508. doi:10.1002/jcb.21418.
- Polevoda, B., T.S. Cardillo, T.C. Doyle, G.S. Bedi, and F. Sherman. 2003. Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB N α -terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* 278:30686–30697. doi:10.1074/jbc.M304690200.
- Polevoda, B., J. Hoskins, and F. Sherman. 2009. Properties of Nat4, an N α -Acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* That Modifies N Termini of Histones H2A and H4. *Mol. Cell. Biol.* 29:2913–2924. doi:10.1128/mcb.00147-08.
- Polevoda, B., J. Norbeck, H. Takakura, A. Blomberg, and F. Sherman. 1999. Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 18:6155–6168. doi:10.1093/emboj/18.21.6155.
- Polevoda, B., and F. Sherman. 2001. NatC N α -terminal Acetyltransferase of Yeast Contains Three Subunits, Mak3p, Mak10p, and Mak31p. *J. Biol. Chem.* 276:20154–20159. doi:10.1074/jbc.M011440200.
- Polevoda, B., and F. Sherman. 2003. Composition and function of the eukaryotic N-terminal acetyltransferase subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:1–11. doi:10.1016/S0006-291X(03)01316-0.
- Qian, X., X. Li, Q. Cai, C. Zhang, Q. Yu, Y. Jiang, J.H. Lee, D. Hawke, Y. Wang, Y. Xia, Y.

- Zheng, B.H. Jiang, D.X. Liu, T. Jiang, and Z. Lu. 2017. Phosphoglycerate Kinase 1 Phosphorylates Beclin1 to Induce Autophagy. *Mol. Cell.* 65:917-931.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.01.027.
- Rathore, O.S., A. Faustino, P. Prudêncio, and P. Van Damme. 2016a. Absence of N-terminal acetyltransferase diversification during evolution of eukaryotic organisms. *Nat. Publ. Gr.* 1–13. doi:10.1038/srep21304.
- Rathore, O.S., A. Faustino, P. Prudêncio, P. Van Damme, C.J. Cox, and R.G. Marinho. 2016b. Absence of N-terminal acetyltransferase diversification during evolution of eukaryotic organisms. *Nature.* 1–13. doi:10.1038/srep21304.
- Raychaudhuri, S., M. Sinha, D. Mukhopadhyay, and N.P. Bhattacharyya. 2008. HYPK, a Huntingtin interacting protein, reduces aggregates and apoptosis induced by N-terminal Huntingtin with 40 glutamines in Neuro2a cells and exhibits chaperone-like activity. *Hum. Mol. Genet.* 17:240–255. doi:10.1093/hmg/ddm301.
- Ree, R., L.M. Myklebust, P. Thiel, H. Foyn, K.E. Fladmark, and T. Arnesen. 2015. The N-terminal acetyltransferase Naa10 is essential for zebrafish development. *Biosci. Rep.* 35:1–10. doi:10.1042/BSR20150168.
- Ren, T., B. Jiang, G. Jin, J. Li, B. Dong, J. Zhang, L. Meng, J. Wu, and C. Shou. 2008. Generation of novel monoclonal antibodies and their application for detecting ARD1 expression in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 264:83–92. doi:10.1016/j.canlet.2008.01.028.
- Ribeiro, A.L., R.D. Sil, H. Foyn, and M.N. Tiago. 2016. Naa50 / San-dependent N-terminal acetylation of Scc1 is potentially important for sister chromatid cohesion. *Nat. Publ. Gr.* 1–16. doi:10.1038/srep39118.
- Rope, A.F., K. Wang, R. Evjenth, Jinchuan Xing, J.J. Johnston, J.J. Swensen, W.E. Johnson, B. Moore, C.D. Huff, L.M. Bird, J.C. Carey, J.M. Opitz, C.A. Stevens, T. Jiang, C. Schank, H.D. Fain, R. Robison, B. Dalley, S. Chin, S.T. South, J.P. Theodore, L.B. Jorde, H. Hakonarson, J.R. Lillehaug, L.G. Biesecker, M. Yandell, T. Arnesen, and G.J. Lyon. 2011. Using VAAST to identify an X-linked disorder resulting in lethality in male infants due to N-terminal acetyltransferase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 89:28–43. doi:10.1016/j.ajhg.2011.05.017.
- Schiza, V., D. Molina-Serrano, D. Kyriakou, A. Hadjiantoniou, and A. Kirmizis. 2013. N-alpha-terminal Acetylation of Histone H4 Regulates Arginine Methylation and Ribosomal DNA Silencing. *PLoS Genet.* 9. doi:10.1371/journal.pgen.1003805.
- Scott, D.C., J.K. Monda, E.J. Bennett, J.W. Harper, and B.A. Schulman. 2011. N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science (80-.).* 334:674–678. doi:10.1126/science.1209307.
- Setty, S.R.G., T.I. Strohlic, A.H.Y. Tong, C. Boone, and C.G. Burd. 2004. Golgi targeting of Arf-like GTPase Arl3p requires its N α -acetylation and the integral membrane protein Sys1p. *Nat. Cell Biol.* 6:414–419. doi:10.1038/ncb1121.
- Shin, D.H., Y.S. Chun, K.H. Lee, H.W. Shin, and J.W. Park. 2009. Arrest defective-1 controls tumor cell behavior by acetylating myosin light chain kinase. *PLoS One.* 4. doi:10.1371/journal.pone.0007451.
- Silva, R.D., and R.G. Marinho. 2015. Developmental roles of protein N-terminal acetylation.

Proteomics. 15:2402–2409. doi:10.1002/pmic.201400631.

- Song, O., X. Wang, J.H. Waterborg, and R. Sternglanz. 2003. Accelerated Publication An N_ε-Acetyltransferase Responsible for Acetylation of the N-terminal Residues of. *J. Biol. Chem.* 278:38109–38113. doi:10.1074/jbc.C300355200.
- Sönnichsen, B., L.B. Koski, A. Walsh, P. Marschall, B. Neumann, M. Brehm, A.M. Alleaume, J. Artelt, P. Bettencourt, E. Cassin, M. Hewitson, C. Holz, M. Khan, S. Lazik, C. Martin, B. Nitzsche, M. Ruer, J. Stamford, M. Winzi, R. Heinkel, M. Röder, J. Finell, H. Häntsch, S.J.M. Jones, M. Jones, F. Piano, K.C. Gunsalus, K. Oegema, P. Gönczy, A. Coulson, A.A. Hyman, and C.J. Echeverri. 2005. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 434:462–469. doi:10.1038/nature03353.
- Srinivasan, S., V. Chitalia, R.D. Meyer, E. Hartsough, M. Mehta, I. Harrold, N. Anderson, H. Feng, L.E.H. Smith, Y. Jiang, C.E. Costello, and N. Rahimi. 2015. Hypoxia-induced expression of phosphocyanin-like 3 regulates expression of VEGFR-2 and promotes angiogenesis. *Angiogenesis*. 18:449–462. doi:10.1007/s10456-015-9468-3.
- Starheim, K.K., T. Arnesen, D. Gromyko, A. Rynningen, J.E. Varhaug, and J.R. Lillehaug. 2008. Identification of the human N_ε-acetyltransferase complex B (hNatB): A complex important for cell-cycle progression. *Biochem. J.* 415:325–331. doi:10.1042/BJ20080658.
- Starheim, K.K., K. Gevaert, and T. Arnesen. 2012. Protein N-terminal acetyltransferases: When the start matters. *Trends Biochem. Sci.* 37:152–161. doi:10.1016/j.tibs.2012.02.003.
- Starheim, K.K., D. Gromyko, R. Evjenth, A. Rynningen, J.E. Varhaug, J.R. Lillehaug, and T. Arnesen. 2009a. Knockdown of Human N_ε-Terminal Acetyltransferase Complex C Leads to p53-Dependent Apoptosis and Aberrant Human Arl8b Localization. *Mol. Cell. Biol.* 29:3569–3581. doi:10.1128/mcb.01909-08.
- Starheim, K.K., D. Gromyko, R. Velde, J. Varhaug, and T. Arnesen. 2009b. Composition and biological significance of the human N_ε-terminal acetyltransferases. *BMC Proc.* 3:S3. doi:10.1186/1753-6561-3-s6-s3.
- Starheim, K.K., T. V Kalvik, G. Bjørky, and T. Arnesen. 2017. Depletion of the human N-terminal acetyltransferase hNaa30 disrupts Golgi integrity and ARFRP1 localization. *Biosci. Rep.* 37:1–12. doi:10.1042/BSR20170066.
- Varland, S., and T. Arnesen. 2018. Investigating the functionality of a ribosome-binding mutant of NAA15 using *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Res. Notes*. 11:1–8. doi:10.1186/s13104-018-3513-4.
- Varland, S., C. Osberg, and T. Arnesen. 2015. N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects. *Proteomics*. 15:2385–2401. doi:10.1002/pmic.201400619.
- Vetting, M.W., L.P. Luiz, M. Yu, S.S. Hegde, S. Magnet, S.L. Roderick, and J.S. Blanchard. 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:212–226. doi:10.1016/j.abb.2004.09.003.
- Wang, Y., M. Mijares, M.D. Gall, T. Turan, A. Javier, D.J. Bornemann, K. Manage, and R. Warrior. 2010. *Drosophila* variable nurse cells encodes arrest defective 1 (ARD1), the

- catalytic subunit of the major N-terminal acetyltransferase complex. *Dev. Dyn.* 239:2813–2827. doi:10.1002/dvdy.22418.
- Wenzlau, J.M., P.J. Garl, P. Simpson, K.R. Stenmark, J. West, K.B. Artinger, R.A. Nemenoff, and M.C.M. Weiser-Evans. 2006. Embryonic growth - Associated protein is one subunit of a novel N-terminal acetyltransferase complex essential for embryonic vascular development. *Circ. Res.* 98:846–855. doi:10.1161/01.RES.0000214539.86593.7a.
- Whiteway, M., and J.W. Szostak. 1985. The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell.* 43:483–492. doi:10.1016/0092-8674(85)90178-3.
- Williams, B.C., C.M. Garrett-Engele, Z. Li, E. V Williams, E.D. Rosenman, and M.L. Goldberg. 2003. Two Putative Acetyltransferases, San and Deco, Are Required for Establishing Sister Chromatid Cohesion in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 13:2025–2036. doi:10.1016/j.cub.2003.11.018.
- Yang, D., Q. Fang, M. Wang, R. Ren, H. Wang, M. He, Y. Sun, N. Yang, and R.M. Xu. 2013. N α -acetylated Sir3 stabilizes the conformation of a nucleosome-binding loop in the BAH domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:1116–1118. doi:10.1038/nsmb.2637.
- Yi, C.H., H. Pan, J. Seebacher, I.H. Jang, S.G. Hyberts, G.J. Heffron, M.G. Vander Heiden, R. Yang, F. Li, J.W. Locasale, H. Sharfi, B. Zhai, R. Rodriguez-Mias, H. Luithardt, L.C. Cantley, G.Q. Daley, J.M. Asara, S.P. Gygi, G. Wagner, C.F. Liu, and J. Yuan. 2011. Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell.* 146:607–620. doi:10.1016/j.cell.2011.06.050.
- Yu, M., J. Gong, M. Ma, H.U.I. Yang, J. Lai, H. Wu, L.I.N. Li, L. Li, and D. Tan. 2014. Immunohistochemical analysis of human arrest-defective-1 expressed in cancers in vivo. *Oncol. Rep.* 21:909–915. doi:10.3892/or_00000303.