

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA BITTAR CAMARGO

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE PROTEÍNAS DE LOCALIZAÇÃO NÃO  
CONVENCIONAL NO ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL**

CURITIBA

2017

JESSICA BITTAR CAMARGO

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE PROTEÍNAS DE LOCALIZAÇÃO NÃO  
CONVENCIONAL NO ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Biomedicina da Universidade Federal do  
Paraná como requisito à obtenção do título de  
Biomédico.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2017

## RESUMO

O espaço intermembrana mitocondrial (EIM) está envolvido com processos como a regulação do estado redox, apoptose e dobramento oxidativo e é ainda pouco conhecido. Assim, é importante conhecer a composição desse compartimento e todos os processos que acontecem nele. As proteínas podem chegar ao EIM por sequências de endereçamento; se possuírem a sequência ITS/MISS, que contém motivos característicos contendo resíduos de cisteínas, vão ser importadas através da via da proteína MIA/CHCHD4. Nessa via, ocorre o dobramento oxidativo de moléculas. Algumas proteínas possuem sequências de endereçamento para outros compartimentos celulares; no entanto, têm sido encontradas no EIM. Proteínas envolvidas com o balanço redox como Trx1, Grx1 e hERp18 não são convencionalmente consideradas como proteínas do EIM mas tiveram suas presenças confirmadas nesse compartimento, indicando uma possível função de regulação do balanço redox do EIM. Proteínas envolvidas com a proliferação celular e apoptose como PTEN, p53 e yHmf1 também foram encontradas no EIM; porém ainda sem uma função estabelecida nessa localização. A Gpx3 é uma proteína do citossol, onde é uma transdutora da sinalização pelo peróxido de hidrogênio. Mas quando encontrada no EIM possui funções diferentes, principalmente relacionadas com a manutenção da estrutura, potencial de membrana e equilíbrio redox mitocondrial. A glutationa-S-transferase 3 microsomal está relacionada com processos inflamatórios. Já foi encontrada no EIM e sugere-se que tenha esta mesma função nesse compartimento. Portanto, ainda são necessários mais estudos nessa área para identificar outras proteínas de localização não convencional ao EIM, estabelecer seus mecanismos de importação e suas funções nesta sublocalização mitochondrial.

Palavras chaves: espaço intermembrana mitocondrial, balanço redox, mecanismos de importação

## ABSTRACT

The mitochondrial intermembrane space (IMS) is involved with process such as redox state regulation, apoptosis and oxidative folding, and is still poorly understood. Thus, it is important to know the composition of this compartment and all the processes that take place in it. Proteins can be targeted to the IMS by localization sequence; if they have the ITS/MISS sequence, with characteristic cysteine residues-containing motives, they will be imported by the MIA protein pathway. In this pathway, such protein will be oxidatively folded. Some proteins have targeting sequences to other compartments, but they have been found in the IMS. Proteins involved with redox balance such as Trx1, Grx1 and hERp18 are not conventionally localized to the IMS, but their presence in this compartment has been confirmed, indicating a possible function of regulating the redox balance within the IMS. Proteins involved with cellular proliferation and apoptosis such as PTEN, p53 and yHmf1 can also be found in the IMS, even though they do not have an established function in this location. Gpx3 is a cytosolic protein, where it is a hydrogen peroxide signal transductor. But when it is found in the IMS, it has different functions, mainly related to the maintenance of mitochondrial structure, membrane potential and redox balance. The microsomal glutathione-S-transferase 3 is related to inflammatory processes. It has been found in the IMS and it is suggested the same role in this compartment. Therefore, more studies in this field are still necessary to identify other proteins nonconventionally present in the IMS, to establish their import mechanisms and their functions in this mitochondrial sublocalization.

Key words: mitochondrial intermembrane space, redox balance, import mechanism

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA MITOCÔNDRIA .....	11
FIGURA 2 - ENDEREÇAMENTO PARA A MITOCÔNDRIA .....	14
FIGURA 3 - ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS PARA OS COMPARTIMENTOS MITOCONDRIAIS .....	15
FIGURA 4 - MECANISMO DE IMPORTAÇÃO AO EIM .....	17
FIGURA 5 - RECONHECIMENTO DE PRECURSORES COM A SEQUÊNCIA ITS/MISS PELA MIA40/CHCHD4 .....	19
FIGURA 6 - MECANISMO DE AÇÃO DE TRX E GRX .....	22
FIGURA 7 - FORMAS DE GPX3 .....	27
FIGURA 7 - AÇÃO DA GPx3 NO ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL .....	28
FIGURA 7 - IMPORTAÇÃO DA p53 PELA CHCHD4 .....	29

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DE ENDEREÇAMENTO PARA MITOCÔNDRIA ...	14
TABELA 2 - PROTEÍNAS ENCONTRADAS NO EIM E SEU COMPATIMENTO CONVENCIONAL .....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HPETE	-	Ácido aracdônico 5-hidroxiperóxido
AIF	-	Fator de indução de apoptose
ATP	-	Trifosfato de adenosina
EIM	-	Espaço intermembrana mitocondrial
GPx3	-	Glutaciona Peroxidase 3
Grx	-	Glutaredoxina
GSH	-	Glutaciona
GST3M	-	Glutaciona-S-transferase 3 microssomal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Peróxido de hidrogênio
ITS	-	Sinal de endereçamento ao espaço intermembrana mitocondrial
ME	-	Membrana externa mitocondrial
MI	-	Membrana interna mitocondrial
MIA	-	Via de montagem do EIM
MISS	-	Sinal mitocondrial de distribuição no EIM
PI3K	-	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP2	-	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	-	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	-	Homólogo de fosfatase e tensina no cromossomo dez
SAM	-	Maquinaria de montagem e distribuição
TIM	-	Translocador da membrana interna
TOM	-	Translocador da membrana externa
Trx	-	Tioredoxina
TrxR	-	Tioredoxina redutase
Yap1	-	Proteína 1 associada a Yes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>9</b>
<b>3 MITOCÔNDRIA</b> .....	<b>10</b>
<b>4 IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA A MITOCÔNDRIA</b> .....	<b>13</b>
4.1 ENDEREÇAMENTO PARA A MITOCÔNDRIA .....	13
4.2 TRANSPORTE PARA A MITOCÔNDRIA E SEUS COMPARTIMENTOS ..	14
<b>5. IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL</b> .....	<b>17</b>
5.1 VIA DA MIA .....	17
<b>6. PROTEÍNAS DE LOCALIZAÇÃO NÃO CONVENCIONAL NO ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL</b> .....	<b>21</b>
6.1 FAMÍLIA DAS TIOREDOXINAS .....	22
6.1.1 Tioredoxinas no EIM .....	23
6.1.2 Glutaredoxinas no EIM .....	23
6.1.3 hERp18 no EIM .....	24
6.2 PTEN .....	24
6.3 GLUTATIONA PEROXIDASE 3 .....	26
6.4 p53 .....	28
6.5 yHmf1 .....	30
6.6 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE 3 MICROSSOMAL .....	30
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mitocôndria é uma organela essencial na célula. A síntese de energia em forma de ATP é uma das funções mais conhecidas e exploradas dessa organela. No entanto, a mitocôndria está envolvida com diversos processos essenciais para a célula como o controle do estado redox e controle de vias apoptóticas. (ALBERTS *et al*, 2015; MCBRIDE *et al*, 2006; LODISH *et al*, 2007).

O espaço intermembrana mitocondrial (EIM) é uma sublocalização da organela ainda não muito estudada. Porém, algumas descobertas mostram seu envolvimento em vários processos celulares e sua participação no dobramento de moléculas, controle redox e também na apoptose (STOJANOVSKI *et al*, 2008; KOEHLER e TIENSON, 2008). Portanto, estudos têm focado em compreender totalmente a composição desse espaço e a função das moléculas lá presentes.

Proteínas que, classicamente, eram encontradas em outros compartimentos têm sido encontradas no EIM (NUEBEL *et al*, 2016). O desafio para os pesquisadores hoje é descobrir por qual mecanismo elas são importadas ao EIM, em que condições isso acontece e qual é a função que desempenham neste ambiente.

Nesta revisão, os principais mecanismos de importação proteica para a mitocôndria são discutidos, assim como mecanismos específicos para o EIM. Além disso, algumas proteínas de localização convencional em outros compartimentos celulares que estão sendo encontradas no EIM serão discutidas.

## 2 JUSTIFICATIVA

A mitocôndria desempenha funções essenciais à célula.. Os principais processos já estudados ocorrem na matriz mitocondrial, fazendo desse compartimento o mais estudado até agora na mitocôndria.

No entanto, vêm se observando que vários processos também ocorrem no EIM. Porém, a sua composição ainda não é bem estudada e a função das moléculas que estão nessa localização também não é totalmente conhecida. Ainda, principalmente as proteínas que não são de localização convencional no EIM devem ser estudadas para se determinar o motivo de sua importação e sua função no EIM.

Assim, faz-se necessário conhecer o que já está estabelecido para esse compartimento e o que ainda deve ser aprofundado e descoberto.

### 3 MITOCÔNDRIA

A mitocôndria está envolvida com vários processos celulares, entre eles o metabolismo energético, morte celular programada (apoptose), sinalização celular, metabolismo celular envolvendo lipídeos, aminoácidos e ferro (ALBERTS *et al*, 2015; MCBRIDE *et al*, 2006).

Uma célula eucariótica pode conter de centenas a milhares de mitocôndrias, que têm de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, podendo representar até 25% do volume celular. Segundo a teoria endossimbiótica, as mitocôndrias originaram da incorporação de uma célula bacteriana por uma outra célula. A distribuição dessa organela na célula é feita pelos microtúbulos, que também são responsáveis pela sua movimentação pelo citossol (ALBERTS *et al*, 2015; LODISH *et al*, 2007).

A mitocôndria garante à célula uma maquinaria capaz de gerar energia em forma de ATP. A cada glicose que é oxidada na célula, a mitocôndria é capaz de gerar 15 vezes mais energia do que a oxidação dessa molécula pela via glicolítica (que ocorre no citossol) (LODISH *et al*, 2007).

A estrutura mitocondrial conta com uma membrana externa e uma interna, gerando assim o espaço intermembrana mitocondrial (EIM) e matriz mitocondrial (Figura 1) (ALBERTS *et al*, 2015). A membrana externa da mitocôndria (ME) age como uma barreira, participando dos processos de fissão e fusão de membranas. Conta com complexos de importação de moléculas como as proteínas translocadoras da membrana externa (TOM, *translocators of the outer membrane*). A membrana externa possui porinas e, portanto, é permeável a íons e moléculas de até 5kDa (ALBERTS *et al*, 2015; LODISH *et al*, 2007).

O EIM tem sua função mais conhecida relacionada com a cadeia transportadora de elétrons. Ele é o compartimento para o qual os prótons são bombeados, gerando o gradiente de prótons necessário para síntese do ATP (ALBERTS *et al*, 2015). No entanto, recentemente outras funções importantes têm sido descobertas para essa localização. O EIM está envolvido com dobramento oxidativo de moléculas (STOJANOVSKI *et al*, 2008; KOEHLER e TIENSON, 2008) e é onde os fatores

envolvidos com a apoptose (como o citocromo  $b_2$ ) podem ser encontrados (KOEHLER e TIENSON, 2008).

Mesmo com a presença de porinas na ME e com a difusão de pequenas moléculas e íons, o estado redox do EIM não está em um equilíbrio com o do citossol. Pensa-se que diferentes proteínas no EIM alteram esse estado redox, já que o EIM é um compartimento mais oxidante do que o citossol (HU *et al*, 2008). No entanto, não há um conhecimento suficiente sobre a composição proteica do EIM, o que deve ser estudado para a compreensão total do papel desse compartimento na célula.

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA MITOCÔNDRIA

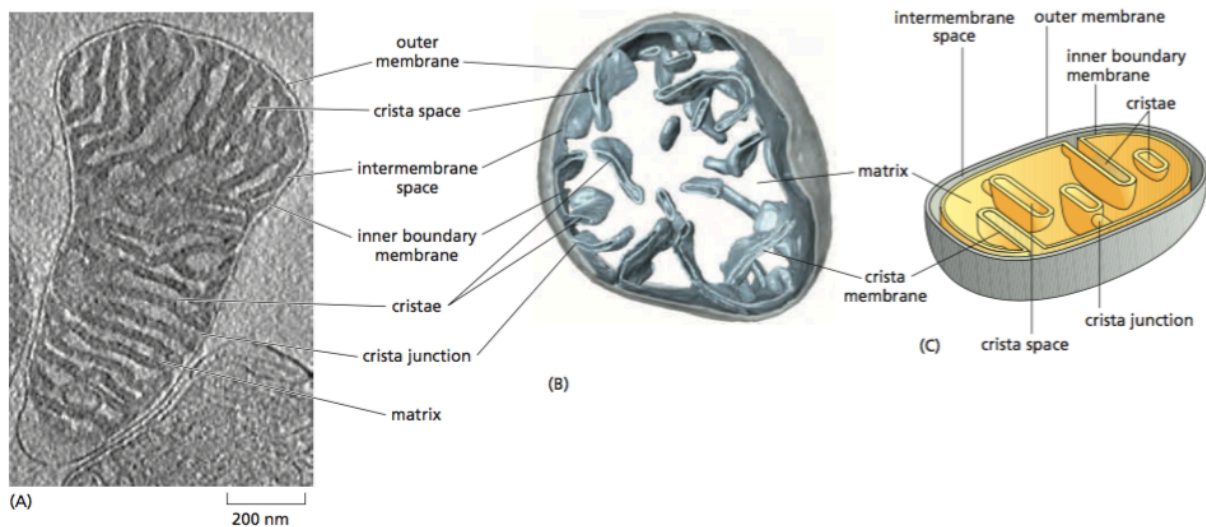


Figura 1. Estrutura da mitocondria. (A) corte de mitocôndria de coração de camundongo vista por microscopia eletrônica de transmissão; (B) corte transversal de mitocôndria, mostrando suas estruturas internas; (C) representação esquemática de uma mitocôndria, mostrando suas principais estruturas: membranas externa e interna, cristas (ALBERTS *et al*, 2015).

A membrana interna mitocondrial (MI), ao contrário da externa, é extremamente seletiva, não contendo porinas e não permitindo a livre passagem de íons por ela, necessitando que proteínas realizem esses transportes (ALBERTS *et al*, 2015). Apresenta-se dobrada em inúmeras cristas, onde estão os complexos proteicos que realizam a função clássica dessa organela. Na membrana interna, domínios em diferentes regiões segregam-se pelas suas funções. A membrana da região limite possui as proteínas dedicadas à importação proteica para a matriz mitocondrial,

inserção de novas membranas e também é onde novos complexos da cadeia respiratória são formados (ALBERTS *et al*, 2015; LODISH *et al*, 2007). Os complexos proteicos envolvidos na cadeia transportadora de elétrons e a ATP sintase estão presentes nas cristas mitocondriais. Na junção dessas cristas com a membrana da região limite existem complexos proteicos que formam uma barreira para manter os outros dois domínios separados. (ALBERTS *et al*, 2015, p. 758; MCBRIDE *et al*, 2006)

A matriz mitocondrial possui moléculas envolvidas na formação do cluster Fe-S e é onde ocorre a oxidação de moléculas energéticas, como o piruvato (produto da oxidação da glicose na via glicolítica) e ácidos graxos. Nesse compartimento também estão os ribossomos e DNA mitocondrial, compactado em nucleoides, além de diversas proteínas necessárias para o metabolismo da organela (ALBERTS *et al*, 2015; LODISH *et al*, 2007). Seu DNA próprio codifica treze proteínas mitocondriais (CHATZI *et al*, 2016). As proteínas mitocondriais codificadas pelo DNA nuclear são traduzidas como precursores (pré-proteínas) no citossol (GORNICKA *et al*, 2014) e, então, devem ser importadas para a organela.

## 4 IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA A MITOCÔNDRIA

As proteínas formadas pela tradução do DNA nuclear são produzidas no citossol e podem residir nesse mesmo compartimento ou serem exportadas para organelas, ou ainda secretadas para fora da célula. O destino de cada proteína pode ser determinado pela sua estrutura. Nela, sequências de aminoácidos direcionam o seu transporte.

### 4.1 ENDEREÇAMENTO PARA A MITOCÔNDRIA

O direcionamento das pré-proteínas codificadas pelo DNA nuclear à mitocôndria depende de sequências encontradas nas suas estruturas primárias (FIGURA 2). Vários mecanismos estão caracterizados para essa importação e distribuição. As proteínas podem ser direcionadas para a matriz, para o espaço intermembrana ou fazer parte das suas membranas. Portanto, diferentes sequências de endereçamento (TABELA 1) determinam a via por onde cada pré-proteína é importada e o seu destino final (MANGANAS *et al*, 2017).

Entre as sequências de importação para a mitocôndria temos a presequência. Ela apresenta-se como uma extensão N-terminal no precursor, tendo de 15 a 55 aminoácidos com carga geral positiva formando alfa-hélices anfipáticas. Quando importada, essa sequência sofre uma clivagem proteolítica, não participando, em geral, da proteína madura (MANGANAS *et al*, 2017; DUDEK *et al*, 2013). Precursores com presequência de sinalização serão importados para a matriz mitocondrial.

A sequência de endereçamento sinal-beta é formada por uma glicina, uma lisina ou uma glutamina e dois aminoácidos hidrofóbicos. Precursores com essa sequência formam proteínas beta-barril na ME. (KUTIK *et al*, 2008; DUDEK *et al*, 2013)

Precursores de proteínas direcionadas ao EIM podem conter a sequência ITS/MISS, que necessita de um resíduo de cisteína que pode estar no arranjo CX3C ou CX9C, sendo X aminoácidos variáveis. Um resíduo hidrofóbico de leucina nessa sequência também é essencial (MILENKOVIC *et al*, 2009; DUDEK *et al*, 2013).

FIGURA 2 - ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS PARA A MITOCÔNDRIA

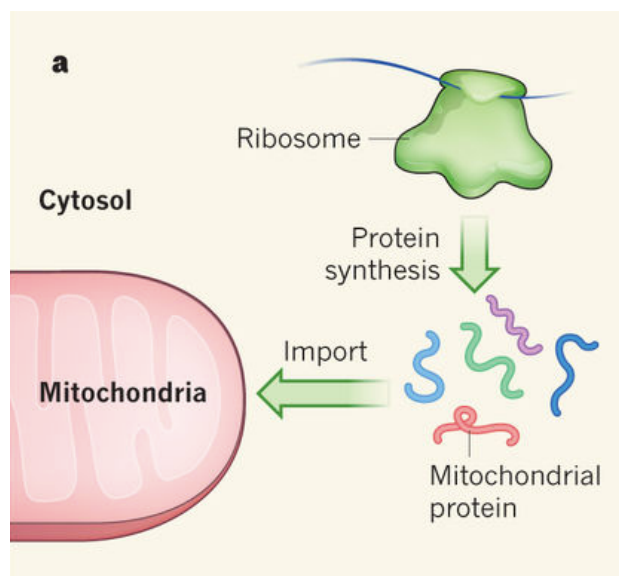


Figura 2: Proteínas sendo sintetizadas pelos ribossomos no citosol. A proteína vermelha tem um sinal para a mitocôndria e seria importada à essa organela (HAYNES, 2015).

Proteínas destinadas à incorporação na membrana interna possuem sequências internas de endereçamento. Essas proteínas possuem regiões hidrofóbicas e devem ser transportadas com carreadores (DUDEK *et al*, 2013).

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DE ENDEREÇAMENTO PARA MITOCÔNDRIA

<b>Sequência</b>	<b>Característica</b>	<b>Compartimento alvo</b>
<b>Presequência</b>	15 a 55 aminoácidos positivos na extremidade N-terminal	Matriz mitocondrial
<b>Sinal-beta</b>	Glicina/Lisina/Glutamina e dois aminoácido hidrofóbico	Membrana externa mitocondrial
<b>ITS/MISS</b>	Arranjo CX3C ou CX9C	Espaço intermembrana mitocondrial
<b>Membrana interna</b>	Sequência interna de aminoácidos hidrofóbicos	Membrana interna mitocondrial

## 4.2 TRANSPORTE PARA A MITOCÔNDRIA E SEUS COMPARTIMENTOS

Os precursores de proteínas sintetizados no citossol devem atravessar, primeiramente, a membrana externa mitocondrial. A passagem ocorre pelo complexo TOM, necessário para a importação de todas as proteínas codificadas por DNA nuclear. (FIGURA 3). O precursor passa, então, para o EIM. Se possuir a sequência sinal-beta, esse precursor interage com as chaperonas Tim pequenas (Tim9-Tim10) do EIM (DUDEK *et al*, 2013), que o entregam ao complexo SAM (*sorting and assembly machinery*) na ME, onde será dobrado corretamente e inserido nesta membrana (GORNICKA *et al*, 2014) (FIGURA 3, via verde)

Se o precursor possuir a presequência, quando estiver no EIM vai interagir com o complexo TIM23 (*translocator of the internal membrane*, translocador da membrana interna) e com o motor associado a translocase de presequência (PAM - *presequence translocase associated motor*) na MI. A energia para a passagem do precursor para a matriz mitocondrial pelo TIM23 vem do potencial de membrana presente graças às diferenças iônicas da matriz e do EIM (CHACINSKA *et al*, 2008). Na matriz, a presequência é clivada por uma peptidase, resultando na proteína madura (MANGANAS *et al*, 2017; DUDEK *et al*, 2013; MILENKOVIC *et al*, 2009) (FIGURA 3, via azul).

Algumas proteínas que ficam na membrana interna da mitocôndria possuem a sequência de endereçamento para a matriz mitocondrial (presequência) que é seguida por um sinal hidrofóbico. Mas a sequência hidrofóbica inibe a translocação completa pela membrana interna através dos complexos TIM22 e TIM23. A presequência é então clivada pela peptidase da matriz mitocondrial. Uma outra clivagem proteolítica faz com que a proteína madura seja liberada no EIM. Nesse processo, a hidrólise de ATP não é necessária, sendo que a energia para a translocação da proteína vem do potencial eletroquímico da membrana (CHACINSKA *et al*, 2008) (FIGURA 3, via laranja).

FIGURA 3 - ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS PARA OS COMPARTIMENTOS MITOCONDRIAIS

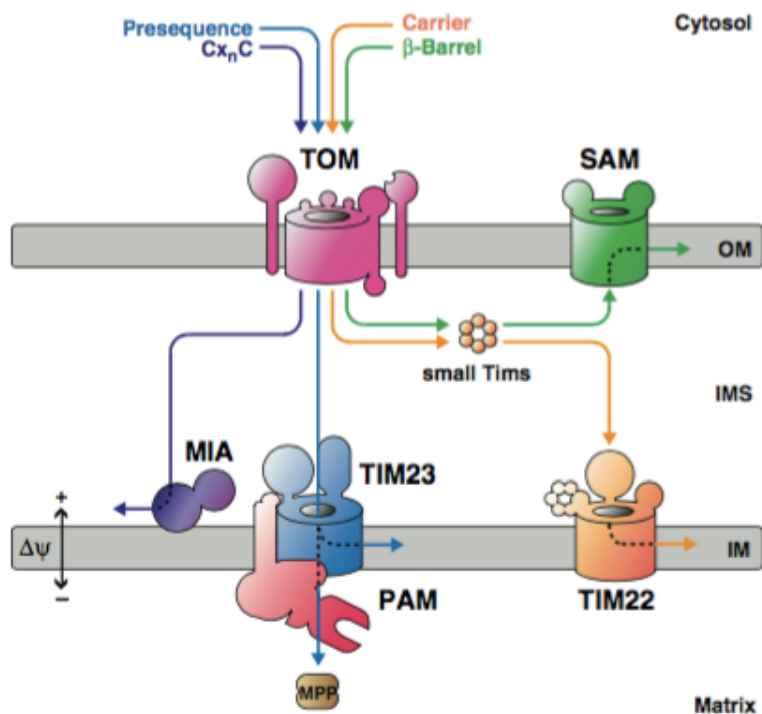


Figura 3: Endereçamento de proteínas para os compartimentos mitocondriais. Siglas: TOM: translocador da membrana externa, SAM: maquinaria de distribuição e montagem; TIM: translocador da membrana interna; MIA: via de montagem do EIM, PAM: motor associado a translocase de presequência, MPP: peptidase processadora mitocondrial IMS: espaço intermembrana mitocondrial (Dudek *et al*, 2013).

No entanto, nem todas as pré-proteínas que chegam ao EIM serão transportadas para a matriz ou farão parte de alguma membrana. Se a sequência ITS/MISS estiver presente na estrutura proteica, a molécula vai passar pela via de montagem do EIM (FIGURA 2, via roxa), descrita mais à frente.

## 5 IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL

O EIM possui proteínas envolvidas em diversos processos vitais. Alguns deles são o transporte de metabólitos, do grupo heme, de íons metálicos, indução de apoptose e também são participantes da cadeia de transporte de elétrons (SIDERIS e TOKATLIDIS, 2010).

Dentre os mecanismos descritos para a importação de proteínas no EIM da mitocôndria, um deles foi descrito acima e depende da presença da pré-sequência seguida de um domínio hidrofóbico no N-terminal. (vista de outra forma na figura 4).

FIGURA 4 - MECANISMO DE IMPORTAÇÃO AO EIM

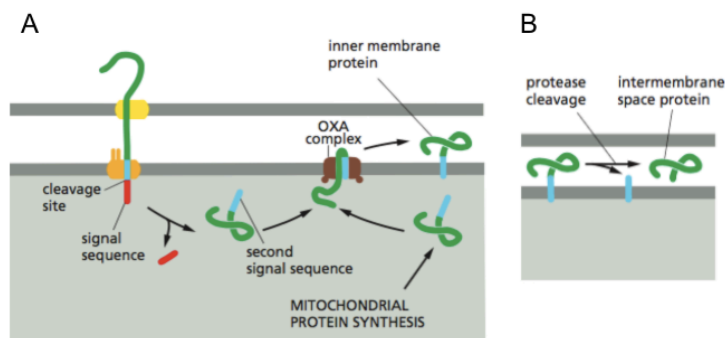


Figura 4: Mecanismo de importação de proteína ao EIM. (A) a pré-proteína é transportada para a matriz, voltando ao EIM pelo complexo OXA, ficando ancorada na MI; (B) clivagem da âncora hidrofóbica, liberando totalmente a proteína no EIM. (Adaptado de Alberts et al, 2014)

Outra classe de proteínas do espaço intermembrana é composta por aquelas que adquirem ligações dissulfeto durante a sua formação como um mecanismo de retenção no EIM, ou seja, essas pré-proteínas dependem de resíduos de cisteína na sua estrutura para sua importação (MILENKOVIC *et al*, 2009). Uma maquinaria específica é dedicada a essa formação de ligações dissulfeto, a via da Mia40/CHCHD4.

### 5.1 VIA DA MIA

A MIA (via de montagem do EIM, do inglês *mitochondrial intermembrane assembly pathway*) tem como principais componentes as proteínas Mia40 e a sulfidril

oxidase Erv1. Também chamada de Tim40, a Mia40, em leveduras, está ligada a membrana interna mitocondrial, expondo seu domínio catalítico ao EIM, onde pode reconhecer e ligar a cisteínas específicas (*docking cysteines*) *upstream* ou *downstream* dos sinais de endereçamento (ITS/MISS) dos substratos importados. A Mia40 é um tipo específico de oxidoreductase, tendo o menor domínio oxidoreductase já descrito na literatura (HOFMANN *et al*, 2005; BANCI *et al*, 2009) .

A Mia40 humana é menor que a de leveduras e é solúvel no EIM, não estando ligada à membrana interna. Em humanos, ela é denominada CHCHD4. Ela tem 75% de similaridade de sequência em comparação com a Mia40 de levedura. Por ter a extremidade C-terminal com maior homologia, o mecanismo de ação nesses diferentes organismos é similar (HOFMANN *et al*, 2005) .

As pré-proteínas são importadas em um estado reduzido e, após cruzarem a membrana externa, interagem com a Mia40/CHCHD4 que, então, introduz ligações dissulfeto nesses precursores (BANCI *et al*, 2009). Na via da Mia40/CHCHD4, a energia para a translocação de proteínas é fornecida pela formação das ligações dissulfeto no substrato. Portanto, a hidrólise de ATP ou o potencial de membrana não são necessários como fontes de energia para o processo (MORDAS e TOKATLIDIS, 2015, SIDERIS e TOKATLIDIS, 2010).

A Mia40/CHCHD4 é capaz de diferenciar seus próprios substratos de outras proteínas ricas em cisteínas. Os substratos dessa via têm características em comum: não possuem uma pré-sequência, têm massa molecular baixa (6-18kDa) e possuem motivos característicos contendo cisteína. Esses substratos podem ter motivos gêmeos CX3C (pequenas Tims), gêmeos CX9C (Cox17, Cox19, por exemplo) ou motivos gêmeos CX2C (como a Erv1) (MANGANAS *et al*, 2017; MILENKOVIC *et al*, 2009).

A extremidade N-terminal da Mia40/CHCHD4 possui o sítio ativo para a oxidação (sítio CPC), que vai ser responsável pela formação de ligações dissulfeto com o substrato. Uma fenda hidrofóbica na Mia40/CHCHD4 age como o sítio de reconhecimento e ligação do substrato. Assim, a Mia40/CHCHD4 tem tanto o papel de receptor como de importação. No sítio CPC, a segunda cisteína (Cys55) é essencial para o papel catalítico da Mia40/CHCHD4 (MANGANAS *et al*, 2017; MILENKOVIC *et al*, 2009).

O reconhecimento dos precursores é feito pela interação na fenda hidrofóbica entre o sítio ativo CPC da Mia40/CHCHD4 e a sequência ITS/MISS do substrato. Essa sequência é composta por nove aminoácidos e está localizada antes ou depois da cisteína que vai se ligar a Mia40/CHCHD4. Pré-proteínas que contêm motivos gêmeos CX3C ou CX9C precisam da formação de duas ligações dissulfeto para a sua oxidação completa. Ocorrendo a interação na fenda hidrofóbica entre pré-proteína e Mia40/CHCHD4, este posicionamento permite a seleção do primeiro motivo CX<sub>n</sub>C para ancoramento, formando um complexo transitente entre uma cisteína desse motivo no precursor e a segunda cisteína do motivo CPC da Mia40/CHCHD4 (SIDERIS *et al*, 2009) (FIGURA 5). Esse intermediário é mantido por uma ligação dissulfeto intermediária, formada por um ataque nucleofílico. O substrato é então liberado da Mia40/CHCHD4 por um segundo ataque nucleofílico, desta vez na cisteína de ancoramento por uma cisteína do outro motivo CX<sub>n</sub>C do substrato (MORDAS e TOKATLIDIS, 2015; BANCI *et al*, 2009, SIDERIS e TOKATLIDIS, 2010). Após a liberação do substrato, o motivo CPC da Mia40/CHCHD4 fica reduzido e é reoxidado pela Erv1, tornando-se funcional novamente (MESECKE *et al*, 2005).

FIGURA 5 - RECONHECIMENTO DE PRECURSORES COM A SEQUÊNCIA ITS/MISS PELA MIA40/CHCHD4

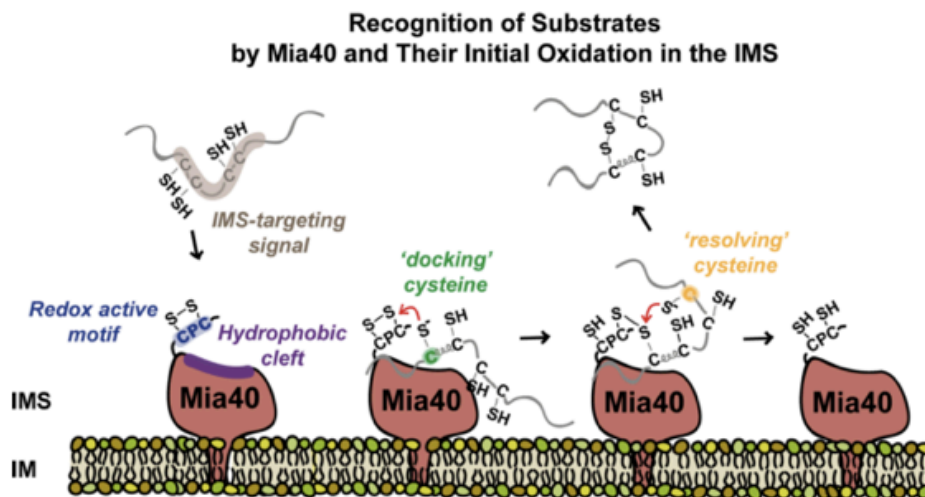


Figura 5. Mecanismo de importação de proteínas para o EIM pela via dependente de Mia40/CHCHD4. Os precursores farão interações entre suas sequências gêmeas CX3C ou CX9C e a fenda hidrofóbica de Mia40/CHCHD4. A cisteína de ancoramento liga-se ao motivo CPC e, em seguida, a outra cisteína do motivo faz uma ligação com a cisteína de ancoramento, liberando a molécula da Mia40/CHCHD4 (MORDAS e TOKATLIDIS, 2015).

Estudos vêm mostrando a existência de substratos para a Mia40/CHCHD4 com motivos diferentes dos já citados e também substratos que não possuem a sequência ITS/MISS de endereçamento para o IMS, como descrito no próximo item.

## 6 PROTEÍNAS DE LOCALIZAÇÃO NÃO CONVENCIONAL AO EIM

O EIM possui proteínas que têm as sequências que podem direcioná-las a este compartimento. Como discutido, essas sequências seriam a ITS/MISS e a presequência seguida de sequência hidrofóbica. No entanto, têm-se encontrado proteínas nesse espaço que não possuem essas sequências.

Assim, pesquisas tentam elucidar por quais mecanismos essas proteínas chegaram no EIM e qual seria o seu papel nesse local não convencional à elas. Isso se deve à importância desse compartimento, e da organela como um todo, no metabolismo celular, relacionando-se com várias situações patológicas. Entre elas pode-se citar câncer, diabetes, aterosclerose, doenças renais e infarto do miocárdio.

Na tabela 2, algumas proteínas que já foram encontradas no EIM e de localização canônica diferente do EIM (NUEBEL, *et al*, 2016).

TABELA 2 - PROTEÍNAS ENCONTRADAS NO EIM E SEU COMPARTIMENTO CONVENCIONAL

<b>Proteína</b>	<b>Compartimento convencional</b>
Tioredoxina citoplasmática (Trx1)	Citossol
Tioredoxina redutase citoplasmática (TrxR)	Citossol
Glutaredoxina citoplasmática (Grx1)	Citossol
Glutaredoxina redutase citoplasmática	Citossol
PTEN	Citossol, matriz mitocondrial
Glutaciona peroxidase 3	Citossol
p53	Núcleo, matriz mitocondrial
hERp18	Retículo endoplasmático
yHmf1	Citossol
Glutaciona-S-transferase 3 microsomal	Citossol

Fonte: NUEBEL *et al*, 2016

Em seguida, serão discutidas essas proteínas, sua função no compartimento convencional, sua possível função no EIM e, se já elucidado, qual mecanismo de transporte a levou ao EIM.

## 6.1 FAMÍLIA DAS TIOREDOXINAS

A família de proteínas Trx é caracterizada pelo dobramento Trx e o motivo CXXC, em que duas cisteínas reativas estão separadas por dois aminoácidos variáveis. Nessa família estão incluídas as próprias tioredoxinas e, também, as glutaredoxinas (Grx). As Grx são enzimas especializadas na redução da ligação dissulfeto entre uma proteína e a glutathiona (GSH) (PAI *et al*, 2007). A reação redox catalisada pela Trx1 e Grx1 ocorre pelo seguinte mecanismo: o grupo tiol da cisteína N-terminal do motivo CXXC ataca a ligação dissulfeto na proteína, deixando um grupo tiol livre nessa proteína e fazendo uma ligação dissulfeto com outro do mesmo alvo; em seguida, o outro grupo tiol do motivo CXXC ataca a ligação entre a Trx ou Grx e o alvo, liberando a proteína alvo reduzida e a Trx ou Grx oxidada (FIGURA 6).

FIGURA 6 - MECANISMO DE AÇÃO DE TRX E GRX

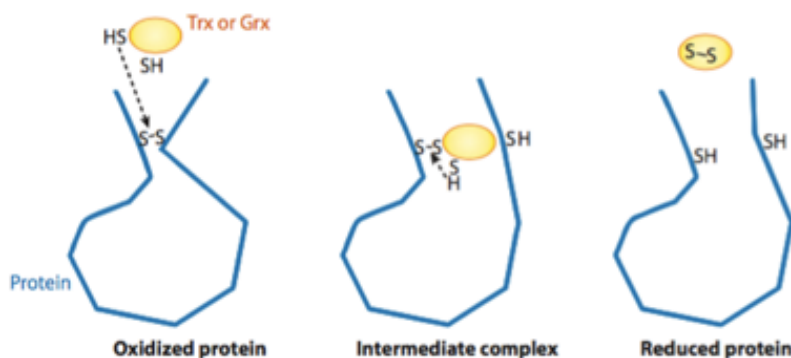


Figura 6. Etapas da redução por Trx e Grx. A proteína oxidada sofre um ataque por uma das duas cisteínas de Trx/Grx, formando uma ligação com uma das cisteínas da proteína. Em seguida, a outra cisteína de Trx/Grx ataca essa ligação, liberando a proteína reduzida e Trx/Grx oxidada com uma ligação dissulfeto formada entre suas duas cisteínas. (MEYER *et al*, 2009)

Para voltarem às suas formas ativas, capazes de reduzirem outras pontes dissulfeto de proteínas, a Trx precisa ser reduzida pela Trx redutase, usando elétrons do NADPH, enquanto a Grx é reduzida pela glutatona (KLOMSIRI *et al*, 2011).

### 6.1.1 Tioredoxinas no EIM

No sistema das tioredoxinas de mamíferos estão presentes duas isoformas da Trx, a forma citosólica Trx1 e a forma mitocondrial Trx2. No entanto, vêm se observando a presença de Trx1 (e da sua Trx redutase) do citossol de levedura no EIM (VÖGTLE *et al*, 2012), enquanto a Trx2 é encontrada na matriz mitocondrial. Sugere-se que a presença de Trx1 no EIM pode ser responsável para manter um ambiente redox nesse compartimento, além de promover poder redutor a outras espécies como a Gpx3 (KRITSILIGKOU *et al*, 2017). O seu mecanismo de importação para o EIM ainda não foi identificado.

### 6.1.2 Glutaredoxinas no EIM

No caso das glutaredoxinas, a isoforma Grx1 é uma forma citosólica dessa enzima, responsável pela regulação de eventos como polimerização da actina, vasodilatação, hipertrofia celular, ativação de fatores de transcrição e propagação da apoptose (PAI *et al*, 2007). Além dessa isoforma, outras podem vir do gene *GRX2*. Esse gene resulta em um mRNA com dois códons de início de tradução: se a tradução iniciar no primeiro deles, a proteína terá sequência de endereçamento para a matriz mitocondrial; se a tradução começar no segundo códon de início, uma forma citosólica mais curta da Grx2 é sintetizada (KOJER *et al*, 2015). No entanto, a presença de Grx1 citosólica, em humanos (PAI *et al*, 2007), e da Grx2 citosólica, em leveduras, (KOJER *et al*, 2015) foi evidenciada no EIM. O papel dessas moléculas no EIM é hipotetizado, porém seus mecanismos de importação até esse compartimento ainda não são conhecidos.

A Grx1 no EIM parece ter função de regulação redox da apoptose. Ela pode ser liberada deste compartimento, em um mecanismo que simula o início da apoptose (PAI, *et al*, 2007).

Há a hipótese que a isoforma citosólica de Grx2 seria importada para o EIM e faria o controle cinético que permite as reações oxidativas de formação de ligações dissulfeto neste ambiente altamente oxidante. Isso é importante pois o EIM está em contato com o citossol pelas porinas da membrana externa. Esses canais na membrana permitem a passagem de pequenas moléculas e íons, principalmente GSH. A GSH é capaz de reduzir moléculas e, se estivesse em equilíbrio no citossol e EIM, as proteínas importadas estariam em sua maior parte reduzidas. Isso não seria ideal pois a importação pela via da MIA depende da oxidação das moléculas para a formação de ligações dissulfeto no dobramento, e com a ação da GSH isso não seria viável. Portanto, a Grx2 citosólica no EIM teria o papel de possibilitar essas oxidações (KOJER *et al*, 2015).

### **6.1.3 hERp18 no EIM**

Outra proteína da superfamília de tioredoxinas que foi encontrada no EIM humano é a proteína 18 residente do retículo endoplasmático (hERp18) (NUEBEL *et al*, 2016). Essa proteína também possui a função de catalisar a formação de ligações dissulfeto em moléculas do retículo endoplasmático, usando seu motivo CX2C, com as cisteínas Cys<sup>66</sup> e Cys<sup>69</sup> (ALANEN *et al*, 2003). Portanto, ela teria uma função de defesa contra o estresse oxidativo nessa organela e hipotetiza-se que tenha essa mesma função no EIM (NUEBEL *et al*, 2016).

### **6.2 PTEN**

O supressor de tumor PTEN (homólogo de fosfatase e tensina no cromossomo dez) é necessário para a manutenção de atividades celulares normais. Tem como sua função clássica a atividade de fosfatase lipídica tendo o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) como seu principal substrato, sendo capaz de clivá-lo e gerar fosfatidilinositol-

4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). O PIP<sub>3</sub> é o produto principal das fosfoinosítídeo 3-quinases (PI3K), portanto, quando o PTEN age antagonizando-a, ele é capaz de inibir a via de sinalização PI3K-Akt. Essa via é responsável por estimular processos celulares como crescimento, proliferação e sobrevivência. Assim, quando o PTEN inibe essa via, ele pode funcionar como um supressor de tumor, regulando a proliferação e sobrevivência de células tumorais (BONONI e PINTON, 2015; HOPKINS *et al*, 2015)

Além da sua ação como supressor de tumor, o PTEN tem papel no desenvolvimento embrionário, metabolismo celular e homeostase. Quando no núcleo, o PTEN tem como função estabilizar os centrômeros e, assim, manter a integridade do DNA (SHEN *et al*, 2015).

A atividade do PTEN depende da presença de uma cisteína reativa que pode ser oxidada. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pode oxidar a cisteína reativa do PTEN, formando uma ligação dissulfeto com uma outra cisteína da molécula, inativando-a (SHEN *et al*, 2015).

A forma clássica do PTEN já foi localizado na mitocôndria, agindo principalmente nas membranas mitocondriais, porém o modo pelo qual ela é transportada para lá ainda não é conhecido. Há a possibilidade dela ser transportada por meio de vesículas ou carregada pelo AIF (SHEN *et al*, 2015).

O AIF é o fator de indução de apoptose, uma proteína mitocondrial que está envolvida na morte celular independente de caspases, sendo também uma proteína crítica para a sobrevivência e desenvolvimento normal celular. Ela possui uma atividade de oxidoreductase que é essencial para a produção de energia na mitocôndria. O AIF é capaz de interagir com o PTEN e também inibe sua oxidação, deixando-o na sua forma ativa (SHEN *et al*, 2015).

Uma outra forma de PTEN encontrada na mitocôndria tem seu mecanismo de transporte elucidado. O PTEN alfa é uma forma do PTEN estendida na extremidade N-terminal. É traduzida a partir do mesmo gene e mRNA, mas sua tradução é iniciada em um códon não-AUG (CUG) em uma via dependente de eIF2. Um motivo palindrômico ao redor de CUG pode ser essencial para esse tipo de tradução. O PTEN alfa é localizado na mitocôndria, na matrix mitocondrial, onde pode induzir a citocromo c oxidase e a produção de ATP pela sua atividade na cadeia transportadora de elétrons

(LIANG *et al*, 2014).

A isoforma longa do PTEN é uma forma obtida por uma tradução alternativa que tem uma extensão de 173 aminoácidos na extremidade N-terminal da proteína e pode ser secretada e também pode ser encontrada na mitocôndria (MALANEY *et al*, 2013; LIANG *et al*, 2014). A sublocalização do PTEN longo na mitocôndria ainda não foi especificada. No entanto, evidenciou-se que o PTEN-longo interage com o citocromo c, que pode estar presente tanto no EIM quanto na matriz mitocondrial. Portanto, sugere-se que essa proteína possa estar presente no EIM, no entanto mais estudos devem ser feitos para confirmar essa localização (LIANG *et al*, 2014).

Essa extensão de 173 aminoácidos dá uma característica hidrofóbica ao PTEN-longo, sendo então capaz de atravessar membranas, o que seria um mecanismo para o PTEN-longo chegar nos compartimentos da mitocôndria (MALANEY *et al*, 2013).

### 6.3 GLUTATIONA PEROXIDASE 3

A glutationa peroxidase 3, GPx3, é uma proteína com três resíduos de cisteína, onde um deles é oxidado e pode então ser reduzido pela glutationa. A Gpx3 funciona como uma transdutora de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no citossol (TOLEDANO *et al*, 2004). O  $H_2O_2$ , apesar de ser uma espécie reativa de oxigênio que pode levar a danos oxidativos, pode agir como uma molécula sinalizadora. A GPx3 é uma das moléculas que medeia essa função de sinalização do  $H_2O_2$  (TOLEDANO *et al*, 2004; KRITSILIGKOU *et al*, 2017). Quando leveduras são tratadas com  $H_2O_2$ , o mRNA que tem a maior expressão nessa condição é o da GPx3 (GERASCHENKO *et al*, 2012).

O  $H_2O_2$  oxida a GPx3 no citossol, resultando na formação de uma ligação dissulfeto intermolecular com Yap1 (fator de transcrição que regula essa resposta). Depois, a forma ativa do Yap1 é gerada pela formação de ligações dissulfeto intramoleculares dentro da Yap1. Essa forma ativa de Yap1 serve como um regulador da transcrição, podendo ativar a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e na supressão de genes apoptóticos (TOLEDANO *et al*, 2004; KRITSILIGKOU *et al*, 2017).

Mesmo a GPx3 tendo sua ação no citossol, foi mostrado por estudos de proteômica que ela estaria presente no EIM de leveduras (KRITSILIGKOU *et al*, 2017).

A forma de GPx3 que está no EIM não é idêntica à do citossol (FIGURA 7). A proteína é traduzida a partir do mesmo mRNA, no entanto, a tradução não inicia no mesmo códon. A GPx3 do EIM é traduzida a partir de um códon não-AUG que está localizado 18 nucleotídeos *upstream* do códon de início tradicional, levando a uma extensão N-terminal que é capaz de endereçar proteínas ao EIM. Essa extensão faz com que a GPx3 interaja com a Mia40/CHCHD4 e portanto está conectada a maquinaria de dobramento oxidativo no EIM (FIGURA 8) (KRITSILIGKOU *et al*, 2017). A mesma via de tradução que não inicia pelo códon AUG é aquela vista na tradução de forma alfa de PTEN (LIANG *et al*, 2014).

FIGURA 7 - FORMAS DE GPX3

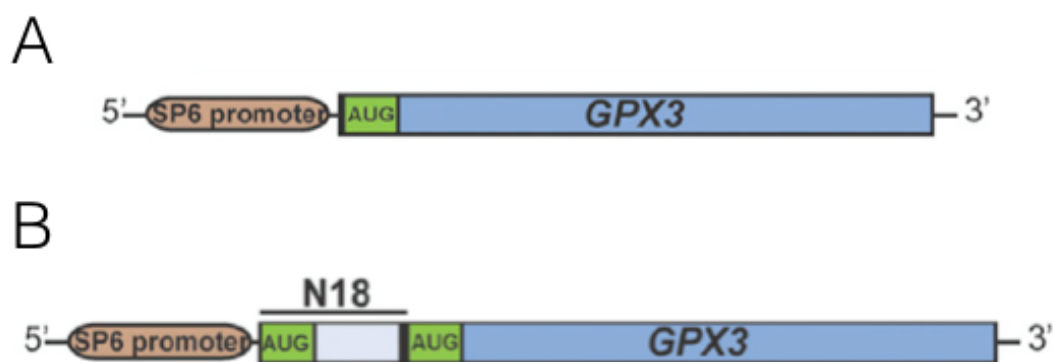


Figura 7: (A) Forma citossólica de Gpx3. (B) Forma de Gpx3 com extensão N-terminal de 18 nucleotídeos, direcionando a proteína para o espaço intermembrana mitocondrial. (KRITSILIGKOU *et al*, 2017).

Sugere-se que a função desempenhada pela GPx3 no EIM seja diferente daquela no citossol. Essa proteína não vai agir como uma transdutora de  $H_2O_2$ , apesar de ser capaz de reduzir o  $H_2O_2$  formando água. No EIM, ela está relacionada com a manutenção da integridade estrutural da organela e do potencial de membrana interna mitocondrial. Além disso, a GPx3 parece agir como uma oxidoreductase nesse compartimento mitocondrial, interagindo com a Mia40/CHCHD4 no dobramento oxidativo de moléculas, onde a GPx3 agiria como a Erv1, na reciclagem de Mia40/CHCHD4 reduzida (KRITSILIGKOU *et al*, 2017).

FIGURA 8- AÇÃO DA GPx3 NO ESPAÇO INTERMEMBRANA MITOCONDRIAL

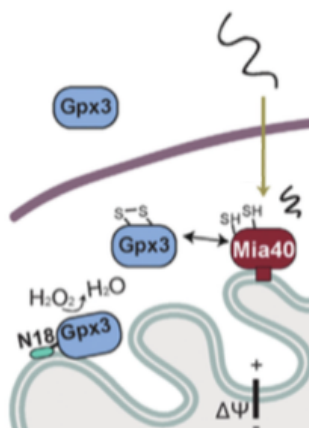


Figura 8: A GPx3, quando traduzida a partir de um códon não AUG, possui uma sequência de endereçamento para o EIM. No EIM, ela pode interagir com a MIA, reduzindo-a; ter ação antioxidante, reduzindo o peróxido de hidrogênio a água e também é capaz de manter a estrutura mitocondrial e o potencial de membrana interna (Adaptado de KRITSILIGKOU *et al*, 2017).

#### 6.4 p53

A proteína p53 está envolvida em vários processos celulares, entre eles o ciclo celular, apoptose, homeostase redox e metabolismo. Tem como principal função manter a estabilidade genômica do DNA durante o seu reparo. Também no núcleo, pode agir como um fator de transcrição que é capaz de se ligar a promotores de genes alvo, controlando a sua taxa de transcrição (PARK *et al*, 2016). No citoplasma, participa da regulação de processos como autofagia e apoptose e também pode se ligar a

membrana externa da mitocôndria (formando complexos com BclXL e Bcl) em resposta a estímulos de apoptose (ZHUANG *et al*, 2013). Graças a essas funções, a p53 é considerada como uma proteína anti-câncer.

A proteína p53 pode, ainda, atuar na matriz mitocondrial, interagindo com a ciclofilina D para abrir poros de transição de permeabilidade mitocondrial para induzir a necrose (ZHUANG *et al*, 2013). Assim como no núcleo, a p53 está associada com a manutenção da integridade do DNA mitocondrial. Ainda na matriz, a p53 está envolvida também com a cadeia de transporte de elétrons e a respiração celular. No núcleo, o gene SCO2, Síntese de Citocromo C Oxidase 2, pode ter sua transcrição aumentada pela ligação de p53 no seu promotor. O produto desse gene participa da cadeia de transporte de elétrons na matriz mitocondrial, fazendo com que menos espécies reativas de oxigênio sejam formadas. Portanto, pode-se dizer que a p53 também promove um efeito antioxidante na célula (PARK *et al*, 2016).

Apesar de ter ações caracterizadas na matriz e membranas mitocondriais, foi evidenciada a presença de p53 no EIM. Isso se dá pelo seu mecanismo de transporte para a mitocôndria quando a célula está submetida a estresse oxidativo (ZHUANG *et al*, 2013).

Nessas condições, a importação de p53 para a mitocôndria pode ser dada pelo mecanismo análogo ao da Mia40/CHCHD4. Nos mamíferos, proteína CHCHD4 atua como a Mia40/CHCHD4 juntamente com a sulfidril oxidase dependente de FAD análoga a Erv1 (GFER). A p53, sob estresse oxidativo, tem dois pares de cisteínas que podem formar ligações dissulfeto intramoleculares, que é uma característica dos substratos de CHCHD4. (ZHUANG *et al*, 2013).

Nesse mecanismo de importação, a p53 com duas cisteínas reduzidas entra no EIM pelo complexo TOM. A CHCHD4 oxidada (com uma ligação dissulfeto intramolecular) sofre ataque por umas das cisteínas de p53, quebrando sua ligação dissulfeto intramolecular. Em seguida, a p53 faz uma ligação dissulfeto com a CHCHD4, e cada uma dessas moléculas fica com um grupo -SH livre.

Na próxima etapa, a GFER oxidada ataca esse complexo entre CHCHD4 e p53, liberando a p53 oxidada (com uma ligação dissulfeto intramolecular) e fazendo uma ligação dissulfeto com a CHCHD4. Em seguida, a CHCHD4 faz uma ligação dissulfeto

entre suas duas cisteínas, ficando oxidada novamente para reagir com outra p53, e a GFER é oxidada via citocromo c e COX da MI da mitocôndria. Então, a p53 pode ficar no EIM ou ser translocada para a MI ou para a matriz mitocondrial. Nesta via da CHCHD4, não se sabe com certeza como a p53 faz essa translocação, no entanto, hipotetiza-se que seja pelo complexo TIM (FIGURA 9) (PARK *et al*, 2016).

FIGURA 9 - IMPORTAÇÃO DE p53 PELA CHCHD4

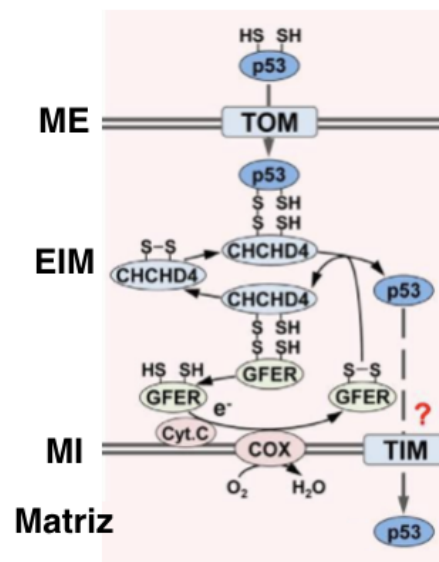


Figura 9: A p53 entra na mitocôndria pelo complexo TOM da ME (membrana externa), chegando ao EIM (espaço intermembrana mitocondrial). Nesse compartimento, interage com a CHCHD4 e é translocada através da MI (membrana interna por um mecanismo incerto, que pode ser pela TIM (Adaptado de PARK *et al*, 2016).

Se a p53 residir no EIM, sua função neste compartimento ainda não foi esclarecida. Será necessário, também, explorar se existe a presença dessa proteína no EIM quando a célula não está sob estresse oxidativo e qual seria a sua função nesse contexto.

## 6.5 yHmf1

A proteína yHmf1 está presente em citoplasma de leveduras e é um membro da família de proteínas p14.5. Essa família tem suas proteínas altamente conservadas desde bactérias a eucariotos. Proteínas da família p14.5 estão normalmente envolvidas

nas vias de apoptose celular e na conservação do DNA mitocondrial (como a yMmf1) enquanto a yHmf1 tem como função no citoplasma o controle de tradução proteica no citoplasma (NUEBEL *et al*, 2016; OXELMARK *et al*, 2000).

A yHmf1 foi localizada no EIM de leveduras. Supõe-se que ela possa estar envolvida em mecanismos de apoptose junto com a yMmh1. Mecanismos que expliquem sua importação ao EIM ainda não foram esclarecidos (NUEBEL *et al*, 2016).

## **6.6 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE 3 MICROSSOMAL**

Essa proteína, abreviada por GST3M, é originalmente encontrada no retículo endoplasmático e microsossomos mas já teve sua presença confirmada no EIM (MURPHY, 2012). Ela pode reduzir 5-HPETE (ácido aracdônico 5-hidroxiperóxido) usando a glutationa, tendo como produto o leucotrieno-A<sub>4</sub>. Também tem como função a produção de leucotrieno-C<sub>4</sub> a partir do leucotrieno-A<sub>4</sub>, provando então sua participação nas cascatas de inflamação (JAKOBSSON *et al*, 2000). Provavelmente a GST3M faria uma mesma atividade relacionada com a cascata de inflamação no EIM, no entanto nenhum mecanismo de importação para ela foi elucidado (NUEBEL *et al*, 2016).

## 7 CONCLUSÃO

O EIM já provou-se como um compartimento que participa de processos além da cadeia transportadora de elétrons. Ainda se sabe pouco sobre as moléculas que estão nessa sublocalização, como chegaram e que função realizam nesse compartimento. Mesmo as proteínas que já estão sendo estudadas, ainda não estão elucidados seus papéis no EIM. Portanto, estudos que procuram esses esclarecimentos devem continuar e o foco deve ser dado tanto no mecanismo de transporte da proteína para o EIM quanto sua função.

## REFERÊNCIAS

- ALANEN, Heli I.; WILLIAMSON, Richard A.; HOWARD, Mark J.; LAPPI, Anna-Kaisa; JÄNTTI, Heli P.; RAUTIO, Sini M.; KELLOKUMPU, Sakari; RUDDOCK, Lloyd W. **Functional Characterization of ERp18, a New Endoplasmic Reticulum-located Thioredoxin Superfamily Member.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(31):28912-20, Ago, 2003; doi: 10.1074/jbc.M304598200.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RA, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter; WILSON, John; HUNT, Tim. **Molecular Biology of the Cell.** Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, Nova York. 6ª ed. 2015.
- BANCI, Lucia; BERTINI, Ivano; CEFARO, Chiara; CIOFI-BAFFONI, Simone; GALLO, Angelo; MARTINELLI, Manuele; SIDERIS, Dionisia P.; KATRAKILI, Nitsa; TOKATLIDIS, Kostas. **MIA40/CHCHD4 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria.** *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(2):198-206, Fev. 2009; doi: 10.1038/nsmb.1553.
- BERGEAUD, Marie; MATHIEU, Lise; GUILLAUME, Arnaud; MOLL, Ute M.; MIGNOTTE, Bernard; LE FLOCH, Nathalie; VAYSSIÈRE, Jean-Luc; RINCHEVAL, Vincent. **Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F1F0-ATP synthase.** *Cell Cycle*, 12(17):2781-93, Set. 2013; doi: 10.4161/cc.25870.
- BONONI, Angela; PINTON, Paolo. **Study of PTEN subcellular localization.** *Methods*, 77-78:92-103, Mai. 2015. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.10.002
- CHACINSKA, Agnieszka; GUIARD, Bernard; MÜLLER, Judith M.; SCHULZE-SPECKING, Agnes; GABRIEL, Kipros; KUTIK, Stephan; PFANNER, Nikolaus. **Mitochondrial Biogenesis, Switching the Sorting Pathway of the Intermembrane Space Receptor Mia40.** *Journal of Biological Chemistry*, 283(44):29723-9, Out. 2008; doi: 10.1074/jbc.M805356200.
- CHATZI, Afroditi; MANGANAS, Phanee; TOKATLIDIS, Kostas. **Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space: A regulated process important for cell physiology and disease.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(6 Pt A):1298-306, Jun. 2016; doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.023.
- DUDEK, Jan; REHLING, Peter; VAN DER LAAN, Martin. **Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks.** *Biochimica e Biophysica Acta*, 1833(2):274-85, Fev. 2013; doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.028.
- GERASHCHENKO, Maxim V.; LOBANOV, Alexei V.; GLADYSHEV, Vladim N. **Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress.** *PNAS* 109(43):17394-9, Out. 2012; doi:

10.1073/pnas.1120799109.

GORNICKA, Agnieszka; BRAGOSZEWSKI, Piotr; CHROSCICKI, Piotr; WENZ, Lena-Sophie; SCHULZ, Christian; REHLING, Peter; CHACINSKA, Agnieszka. **A discrete pathway for the transfer of intermembrane space proteins across the outer membrane of mitochondria.** *Molecular Biology of The Cell*, 25(25):3999-4009, Dez. 2014; doi: 10.1091/mbc.E14-06-1155.

HOFMANN, Sabine; ROTHBAUER, Ulrich; MUHLENBEIN, Nicole; BAIKER, Kerstin; HELL, Kai; BAUER, Matthias F. **Functional and Mutational Characterization of Human MIA40 Acting During Import into the Mitochondrial Intermembrane Space.** *Journal of Biological Chemistry*, 353(3):517-28; Out. 2005; doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.064.

HOPKINS, Benjamin H.; HODAKOSKI, Cindy; BARROWS, Doug; MENSE, Sarah; PARSONS, Ramon E. **PTEN function: the long and the short of it.** *Trends Biochem Sci*, 39(4):183-190, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.006

JAKOBSSON, Per-Johan; MANCINI, Joseph A.; RIENDEAU, Denis; FORD-HUTCHINSON, Anthony W. **Identification and Characterization of a Novel Microsomal Enzyme with Glutathione-dependent Transferase and Peroxidase Activities.** *Journal of Biological Chemistry*. 272(36):22934-9, Set. 1997; PMID: 9278457.

KLOMSIRI, Chananat; KARPLUS, P. Andrew; POOLE, Leslie B. **Cysteine-Based Redox Switches in Enzymes.** *Antioxidants & redox signaling*,14(6):1065-77, Mar. 2011; doi: 10.1089/ars.2010.3376.

KOEHLER, Carla M.; TIENSON, Heather L. **Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(1):139-45, Jan. 2009; doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.08.002.

KOJER, Kerstin; PELEH, Valentina; CALABRESE, Gaetano; HERRMANN, Johannes M.; RIEMER, Jan. **Kinetic control by limiting glutaredoxin amounts enables thiol oxidation in the reducing mitochondrial intermembrane space.** *Molecular Biology of the Cell*, 26(2):195-204, Jan. 2015; doi: 10.1091/mbc.E14-10-1422.

KRITSILIGKOU, Paraskevi; CHATZI, Afroditi; CHARALAMPOUS, Georgia; MIRONOV, Aleksandr; GRANT, Chris M.; TOKATLIDIS, Kostas. **Targeting of a Thiol Peroxidase to the Mitochondrial Intermembrane Space Facilitates Oxidative Protein Folding.** *Cell Reports*, 14;18(11):2729-2741, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.053.

KUTIK, Stephan; STOJANOVSKI, Diana; BECKER, Lars; BECKER, Thomas; MEINECKE, Michael; KRÜGER, Vivien; PRINZ, Claudia; MEISINGER, Chris; GUIARD,

Bernard; WAGNER, Richard; PFANNER, Nikolaus. **Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial  $\beta$ -Barrel Proteins.** *Cell*, 132(6):1011-24, Mar. 2008; doi: 10.1016/j.cell.2008.01.028.

LIANG, Hui; HE, Shiming; YANG, Jingyi; JIA, Xinying; WANG, Pan; CHEN, Xi; ZHANG Zhong; ZOU, Xiajuan; MCNUTT, Michael A.; SHEN, Wen Hong; YIN, Yuxin. **PTEN $\alpha$  is a PTEN isoform Translated through Alternative Initiation and Regulates Mitochondrial Function.** *Cell Metabolism*, 19(5):836-48. Mai. 2014 doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.023.

LODISH, Harvey; BERK, Arnold; KAISER, Chris A.; KRIEGER, Monty; SCOTT, Matthew P.; BRETSCHER, Anthony; PLOEGH, Hidde; MATSUDAIRA, Paul. **Molecular Cell Biology.** W.H. Freeman, Nova York. 6<sup>a</sup> Ed. 2008.

MALANEY, Prerna; UVERSKY, Vladimir N.; DAVÉ, Vrushank. **The PTEN Long N-tail is intrinsically disordered: increased viability for PTEN therapy.** *Molecular Biosystems*, 9(11):2877-88, Nov. 2013; doi: 10.1039/c3mb70267g.

MANGANAS, Phanee; MACPHERSON, Lisa; TOKATLIDIS, Kostas. **Oxidative protein biogenesis and redox regulation in the mitochondrial intermembrane space.** *Cell Tissue Res*, 67(1):43-57, Jan. 2017; doi: 10.1007/s00441-016-2488-5.

MCBRIDE, Heidi M.; NEUSPIEL, Margaret; WASIAK, Sylwia. **Mitochondria: More Than Just a Powerhouse.** *Current Biology*, 16(14):R551-60, Jul. 2006; doi: 10.1016/j.cub.2006.06.054.

MESECKE, Nikola; TERZIYSKA, Nadia; KOZANY, Christian; BAUMANN, Frank; NEUPERT, Walter; HELL, Kai; HERRMANN, Johannes M. **A Disulfide Relay System in the Intermembrane Space of Mitochondria that Mediates Protein Import.** *Cell*, 121(7):1059-69, Jul. 2005; doi: 10.1016/j.cell.2005.04.011.

MILENKOVIC, Dusanka; RAMMING, Thomas; MÜLLER, Judith M.; WENZ, Lena-Sophie; GEBERT, Natalia; SCHULZE-SPECKING, Agnes; STOJANOVSKI, Diana; ROSPERT, Sabine; CHACINSKA, Agnieszka. **Identification of the Signal Directing Tim9 and Tim10 into the Intermembrane Space of Mitochondria.** *Molecular Biology of the Cell*, 20(10):2530-9, Mai, 2009; doi: 10.1091/mbc.E08-11-1108.

MORDAS, Amelia, TOKATLIDIS, Kostas. **The MIA Pathway: A Key Regulator of Mitochondrial Oxidative Protein Folding and Biogenesis.** *Accounts of Chemical Research*, 48(8):2191-9, Ago. 2015; doi: 10.1021/acs.accounts.5b00150.

MURPHY, Michael P. **Mitochondrial Thiols in Antioxidant Protection and Redox Signaling: Distinct Roles for Glutathionylation and Other Thiol Modifications.** *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(6):476-495, Fev, 2012, doi: 10.1089/ars.2011.4289.

NUEBEL, Esther; MANGANAS, Phanee; TOKATLIDIS, Kostas. **Orphan proteins of unknown function in the mitochondrial intermembrane space proteome: New pathways and metabolic cross-talk.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(11):2613-23, Nov, 2016; doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.07.004.

OXELMARK, Ellinor; MARCHINI, Antonio; MALANCHI, Ilaria; MAGHERINI, Francesca; JAQUET, Laurence; HAJIBAGHERI, M.A. Nasser; BLIGHT, Kenneth J.; JAUNIAUX, Jean-Claude; TOMMASINO, Massimo. **Mmf1p, a Novel Yeast Mitochondrial Protein Conserved throughout Evolution and Involved in Maintenance of the Mitochondrial Genome.** *Molecular and Cellular Biology*, 20(20):7784-97, Oct. 2000; PMID: PMC86367.

PAI, Harish V.; STARKE, David W.; LESNEFSKY, Edward J.; HOPPEL, Charles L.; MIEYAL, John J. **What is the functional significance of the unique location of glutaredoxin 1 (GRx1) in the intermembrane space of mitochondria?** *Antioxidants and redox signaling*, 9(11):2027-33, Nov. 2007; doi: 10.1089/ars.2007.1642.

PARK, Hoon; ZHUANG, Jie; HWANG, Paul M. **p53 as guardian of the mitochondrial genome.** *FEBS Lett.* 590(7): 924–934, Apr. 2016; doi: 10.1002/1873-3468.12061.

SIDERIS, Dionisia P.; PETRAKIS, Nikos; KATRAKILI, Nitsa; MIKROPOULOU, Despina; GALLO, Angelo; CIOFI-BAFFONI, Simone; BANCI, Lucia; BERTINI, Ivano; TOKATLIDIS, Kostas. **A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding.** *The Journal of Cell Biology*, 187(7):1007-22, Dec. 2009, doi: 10.1083/jcb.200905134.

SHEN, Shao-Ming; GUO, Meng; XIONG, Zhong; YU, Yun; ZHAO, Xu-Yun; ZHANG, Fei-Fei; CHEN, Guo-Qiang. **AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation.** *EMBO Reports*, 16(11): 1563–1580, Nov. 2015; doi: 10.15252/embr.201540536.

SIDERIS, Dionisia P.; TOKATLIDIS, Kostas. **Oxidative Protein Folding in the Mitochondrial Intermembrane Space.** *Antioxidants & redox signaling*, 3(8):1189-204, Oct. 2010; doi: 10.1089/ars.2010.3157.

STOJANOVSKI, Diana; MÜLLER, Judith M.; MILENKOVIC, Dusanka; GUIARD, Bernard; PFANNER, Nikolaus; CHACINSKA, Agnieszka. **The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(4):610-7, Apr. 2008; doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.004.

ZHUANG, Jie; WANG, Ping-yuan; HUANG, Xinglu; CHEN, Xiaoyuan; KANGA, Ju-Gyeong; HWANG, Paul M. **Mitochondrial disulfide relay mediates translocation of p53 and partitions its subcellular activity.** *PNAS*, 110(43):17356-61, Oct. 2013; doi: 10.1073/pnas.1310908110.