Fernando Gomes

Caracterização funcional da peroxirredoxina mitocondrial (Prx1) na fisiologia redox de *Saccharomyces cerevisiae*

Functional characterization of mitochondrial peroxiredoxin (Prx1) in the redox physiology of *Saccharomyces cerevisiae*

São Paulo

2016

Fernando Gomes

Caracterização funcional da peroxirredoxina mitocondrial (Prx1) na fisiologia redox de *Saccharomyces cerevisiae*

Functional characterization of mitochondrial peroxiredoxin (Prx1) in the redox physiology of *Saccharomyces cerevisiae*

> Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

> Orientador (a): Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Fernando

Caracterização funcional da peroxirredoxina mitocondrial (Prx1) na fisiologia redox de *Saccharomyces cerevisiae*

135

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Prx1 2. Mitocôndria 3. Saccharomyces cerevisiae

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

Orientador

À minha mãe Maria (*in memoriam*), meu pai Valter, minha irmã Camila e meu irmão Vinícius, que sempre me amaram e me incentivaram em todas as etapas da minha vida.

A minha esposa Helena e ao Enzo, pelo amor e carinho. Amo todos vocês.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes."

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Valter e Maria, que sempre me apoiaram, me ensinaram o valor do trabalho feito com dedicação e, acima de tudo, me amaram incondicionalmente.

A minha esposa Helena Gabriela que esteve do meu lado durante toda essa jornada, me apoiando, e enchendo minha vida com seu valioso carinho e amor.

Aos meus queridos irmãos Camila e Vinicíus, minha principal fonte de inspiração.

Aos meus avós Francisco e Angelina, Aleonilda e Ricardo por terem me amparado quando criança e sempre me apoiado nos meus estudos.

Ao meu enteado Enzo Guilherme que enche minha vida com alegria e divertimento.

A Lúcia Elena, Nestor e Nestor Júnior por todo o apoio e carinho me dado desde que entrei para a família.

Ao meu orientador, professor Dr. Luis Eduardo Soares Netto Netto, por ter me aceitado como aluno de doutorado e depositado em mim a confinça para a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Mário Enrique de Barros e Dra. Marilene Demasi, por terem fornecidos anticorpos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Flávio Romero Palma por toda a ajuda com os resumos em inglês e seu companherismo indispensável.

Aos amigos de graduação Karen e Bruno, por me incentivarem na realização da pósgraduação. Agradeço também aos amigos da época do mestrado, Cleverson Busso, Erich Tahara, Janaína e Raquel, que me acolheram no início de minha morada em São Paulo.

Aos amigos Eduardo Tassone por ter me ajudado com a construção das proteínas recombinantes e Thiago Alegria pelas inúmeras dicas durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório Renato, Rogério, Amanda, Andressa, Júlia, Eduardo, Verônica, Janaína, Erina, Diogo, Vanessa, César, Simone, Cristina, Angélica, Anita, Renata, Carlos e Valesca.

Aos funcionários do Instituto de Biociências sempre disponíveis na resolução de questões administraivas.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, CNPq, CAPES e, principalmente, FAPESP.

A Deus, por todo o seu amor.

/	
TNIT	IOT
	лс н.
TT / T	

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Mitocôndria: estrutura e função	13
1.2 Mecanismos de importação das proteínas mitocondriais	18
1.2.1 O mecanismo de importação pressequencia	18
1.2.2 Processamento final dos precursores contendo pressequencia	23
1.2.3 O mecanismo de importação acoplado a processo oxidativo	31
1.3 A produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria	34
1.4 Sistemas antioxidantes na mitocôndria de Saccharomyces cerevisiae	36
1.4.1 Superóxidos Dismutases (SODs)	36
1.4.2 O sistema glutationa mitocondrial	36
1.4.3 Sistema glutarredoxina mitocondrial	38
1.4.4 Sistema tiorredoxina mitocondrial	40
1.4.5 Peroxidases mitocondriais	41
1.5 Prx1 de Saccharomyces cerevisiae	46
2. OBJETIVO GERAL	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Linhagens de Saccharomyces cerevisiae e Escherichia coli	51
3.2 Meios de cultura dos microrganismos	52
3.3 Condições de cultivo dos microrganismos	52
3.4 Métodos gerais para manipulação de DNA	53
3.5 Transformação Bacteriana	54
3.6 Transformação de células de Saccharomyces cerevisiae	54
3.7 Extração do DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	55
3.8 Isolamento de mitocôndrias com membrana externa intacta	56
3.9 Purificação das mitocôndrias em gradiente de densidade de sacarose	57
3.10 Quantificação das proteínas mitocondriais	58
3.11 Subfracionamento mitocondrial	59
3.12 Solubilidade das proteínas mitocondriais	59
3.13 Análise da estabilidade proteica <i>in organello</i>	60
3.14 Extratos proteicos de células de S. cerevisiae	60
3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-	
PAGE)	61
3.16 Western-blot	61
3.17 Isolamento de mitocôndrias para a quantificação da liberação de H ₂ O ₂	63
3.18 Quantificação da liberação de H ₂ O ₂ mitocondrial	64
3.19 Sensibilidade ao estresse oxidativo exógeno	65
3.20 Clonagens gênicas	65
3.21 Construção de mutantes duplos de S. cerevisiae	67
3.22 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	68
3.23 Atividade peroxidásica dependente de tiorredoxina	69
3.24 Purificação da proteína Prx1 da mitocôndria	70
4. RESULTADOS	71

4.1 Produções de anticorpos e testes de sua especificidade contra as proteínas	71
Prx1, 1rr2 e 1rx3	/1
4.2 Localização e solubilidade das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nos	
subcompartimentos mitocondriais	72
4.3 Investigação dos mecanismos de importação mitocondrial das proteínas	
Trr2, Trx3 e Prx1	80
4.4 Papel funcional da clivagem de Prx1 catalisada pela protease Oct1	87
4.5 Efeitos da clivagem de Oct1 sobre a atividade peroxidásica de Prx1	94
4.6 A função de Prx1 na manutenção da atividade mitocondrial	96
5. DISCUSSÃO	104
6. CONCLUSÕES	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura mitocondrial	14
Figura 2. Representação esquemática do sistema de fosforilação oxidativa de	
Saccharomyces cerevisiae	16
Figura 3. Representação esquemática do proteoma de Saccharomyces cerevisiae	17
Figura 4. Visão geral da maquinaria de importação das proteínas mitocondriais em	
S. cerevisiae	19
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de importação das proteínas	
contendo a pressequencia	20
Figura 6. Representação esquemática das etapas finas de processamento das	
proteínas mitocondriais contendo a pressequencia	24
Figura 7. Motivos de clivagem de proteases da matriz mitocondrial: MPP (A),	
Icp55 (B) e Oct1 (C)	26
Figura 8. Representação esquemática da geração de um N-degron em	
Saccharomyces cerevisiae	30
Figura 9. Representação esquemática do mecanismo de importação acoplado a	
processo oxidativo	32
Figura 10. Representação esquemática dos principais sítios geradores do radical	
ânion superóxido da cadeia respiratória de Saccharomyces cerevisiae	35
Figura 11. Representação esquemática dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina.	39
Figura 12. Representação esquemática do ciclo catalítico da peroxirredoxina Tsa1,	
um representante do grupo das 2-Cys-Prxs	44
Figura 13. Representação esquemática do ciclo catalítico da peroxirredoxina Prx1,	
um representante do grupo das 1-Cys-Prxs	45
Figura 14. Ciclo catalítico de Prx1 deduzido a partir dos dados apresentados no	
trabalho de Pedrajas et al. (2016)	48
Figura 15. Purificação das mitocôndrias em gradiente de densidade de sacarose	58
Figura 16. Teste dos anticorpos anti-Prx1p, anti-Trr2p e anti-Trx3p contra as	
proteínas mitocondriais de S. cerevisiae	71
Figura 17. Purificação da fração mitocondrial enriquecida através de gradiente de	
densidade de sacarose	73
Figura 18. Solubilidade mitocondrial das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1	75
Figura 19. Localização das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nas células crescidas em	

glicerol	76
Figura 20. Localização submitocondrial das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nas	
células crescidas em galactose	78
Figura 21. Western blot das frações do pellet e do sobrenadante do protocolo de	
subfracionamento mitocondrial	79
Figura 22. Importação de Prx1 em linhagens de levedura modificadas	01
Eigene 22. Subfracionamento mita con driel de linko com <i>AUAD</i> 2	01 02
Figura 23. Subfractonamento initocondrial da linhagem $2IMP2$	83
Figura 24. Subtracionamento mitocondrial das linnagens w I e $20C11$	84
Figura 25. Possiveis sitios de clivagem das proteinas Irr2 e Irx3 catalisado pela	05
protease MPP	85
Figura 26. Purificação da proteína Prx1 da mitocôndria através de cromatografia	_
de afinidade a níquel seguido de análise de espectrometria de massas	86
Figura 27. Ensaio de estabilidade das proteínas in organello	88
Figura 28. Aminoácidos presentes nos sítios de clivagem das proteases	
mitocondriais MPP e OCT1	91
Figura 29. Alinhamento da sequência de aminoácidos presentes na região de	
endereçamento mitocondrial das peroxirredoxinas 3 de mamíferos	92
Figura 30. A peroxirredoxina humana Prx3 é clivada pela protease Oct1 de	
levedura	93
Figura 31. Ensaio de estabilidade de Prx3 in organello	94
Figura 32. Purificação das proteínas recombinantes	95
Figura 33. Expressão de Prx1 em diferentes fontes de carbono e fases de	
crescimento	97
Figura 34. Sensibilidade dos mutantes nulos $\triangle PRX1$, $\triangle TRR2$ e $\triangle TRX3$ ao estresse	
oxidativo exógeno causado pelo peróxido de hidrogênio	98
Figura 35. Confirmação da construção dos duplos mutantes	99
Figura 36. Sensibilidade dos duplos mutantes ao estresse oxidativo exógeno	
causado pelo peróxido de hidrogênio	100
Figura 37. Liberação de H ₂ O ₂ em suspensões mitocondriais	100
Figura 38. Mecanismo proposto de importação mitocondrial da peroxiredoxina	
Prx1 de S. cerevisiae	110

RESUMO

As peroxirredoxinas (Prxs) são peroxidases dependentes de tiol que catalisam a redução de uma ampla variedade de hidroperóxidos. A atividade catalítica das Prxs é suportada por um resíduo de cisteína catalítico altamente conservado, cuja oxidação pelo hidroperóxido gera o ácido sulfênico (Cys-SOH). Prx1 de Saccharomyces cerevsiae é uma enzima mitocondrial que catalisa a redução do H₂O₂ gerado no interior da mitocôndria. O mecanismo de redução do ácido sulfênico de Prx1 é uma questão de debate, com a glutarredoxina 2 (Grx2), tiorredoxina 3 (Trx3), tiorredoxina redutase 2 (Trr2) e ascorbato sendo propostos como possíveis redutores. Para avaliar a importância fisiológica de Prx1 na manutenção da homeostase redox mitocondrial, nós investigamos os mecanismos de importação e processamento mitocondrial de Prx1 assim como os de seus possíveis redutores Trr2 e Trx3. Os ensaios de solubilidade e subfracionamento mitocondrial demonstram que Prx1, Trr2 e Trx3 co-localizam na matriz mitocondrial, associadas fracamente com a membrana mitocondrial interna. Além disso, Prx1 apresenta dupla localização, estando presente também no espaço intermembrana mitocondrial possivelmenete na forma solúvel. O mecanismo de importação de Prx1 para o espaço intermembrana envolve a liberação da proteína precursora no interior da bicamada lipídica da membrana interna em decorrência de uma pequena região hidrofóbica localizada imediatamente após a pressequência. Em seguida, a subunidade Imp2 do complexo proteico IMP catalisa a clivagem da região hidrofóbica liberando Prx1 no espaço intermembrana. Durante a importação de Prx1 para a matriz mitocondrial, a enzima é clivada sequencialmente pelas proteases peptidase de processamento mitocondrial (MPP) e octapeptidil aminopeptidase 1 (Oct1). Oct1 catalisa a remoção de oito resíduos de aminoácidos da região N-terminal de Prx1. Esse processamento aumenta a estabilidade de Prx1 no interior da mitocôndria, mas não interfere na sua atividade peroxidásica in vitro. Apesar das enzimas Trr2 e Trx3 não serem clivadas por Oct1, a ausência de Oct1 causa eleavada instabilidade dessas proteínas. O processamento das Prxs por Oct1 parece ser um processo conservado visto que Oct1 de levedura é capaz de clivar a peroxirredoxina mitocondrial humana Prx3 expressa em S. cerevisiae. Estes resultados indicam o envolvimento de Oct1 no processamento das peroxirredoxinas, representando um sistema de controle de qualidade proteico que regula a homeostase das Prxs e, possivelmente, processos redox mitocondriais.

ABSTRACT

Peroxiredoxins (Prxs) are thiol-dependent peroxidases that catalyze the reduction of a wide variety of hydroperoxides. The Prxs catalytic activity is provided by the presence of a highly conserved catalytic cysteine residue whose oxidation by hydroperoxide generates sulfenic acid (Cys-SOH). Saccharomyces cerevsiae Prx1 is a mitochondrial enzyme that catalyzes the reduction of the H₂O₂ generated endogenously by mitochondria. The mechanism of reduction of Prx harboring Cys-SOH is a matter of debate, with glutaredoxin 2 (GRX2), thioredoxin 3 (Trx3), thioredoxin reductase 2 (Trr2), and ascorbate being proposed as possible reducers. To assess the functional role of Prx1 in maintaining the mitochondrial redox homeostasis, we investigated its mechanisms of import and processing, as well as those ones involved with its possible reducers, Trr2 and Trx3. Assays of solubility and mitochondrial sub-fractionation show that Prx1, Trr2 and Trx3 co-localize in the mitochondrial matrix compartment, being marginally associated with the inner mitochondrial membrane. In addition, Prx1 show dual localization, being also present in the mitochondrial intermembrane space, possibly in their soluble form. The import mechanism of Prx1 to the intermembrane space involves the release of protein's precursor within the lipid bilayer of the inner membrane due to a small, hydrophobic region located downstream the presequence. Imp2 subunit of the IMP protein complex then catalyzes the cleavage of the hydrophobic region of Prx1, releasing it to the mitochondrial intermembrane space. During its import into the matrix, Prx1 is sequentially cleaved by the mitochondrial processing-peptidase protease (MPP) and by octapeptidil aminopeptidase 1 (Oct1). Oct1 catalyzes the cleavage of eight amino acid residues from the N-terminal region of Prx1. This process increases stability of Prx1 inside the mitochondria, but does not interfere in its peroxidase activity in vitro. Interestingly, absence of Oct1 causes high instability of Trr2 and Trx3, although these proteins are not cleaved by this protease. Remarkably, the processing of Prxs by Oct1 seems to be a conserved process since yeast Oct1 is able to cleave the human mitochondrial peroxiredoxin Prx3 expressed in S. cerevisiae. Altogether, these results indicate the involvement of Oct1 in the processing of peroxiredoxins, representing a protein quality control system that regulates the homeostasis of Prxs and, possibly, mitochondrial redox processes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mitocôndria: estrutura e função

A mitocôndria é uma organela essencial da célula eucariótica. Sua função amplamente conhecida é a produção de energia celular na forma de ATP gerada pelo sistema de fosforilação oxidativa (SARASTE, 1999). No entanto, esta organela também participa na regulação de outros importantes processos celulares.

A mitocôndria desempenha uma função central no metabolismo de aminoácidos e lipídeos. Com a exceção da glicólise, todas as vias de oxidação das moléculas de alimento, incluindo o ciclo de Krebs, a β -oxidação de ácidos graxos e as vias de oxidação de aminoácidos, ocorrem no interior da mitocôndria (de WINDE; GRIVEL, 1993). Atua na biossíntese dos grupos heme e ferro-enxofre, sendo esta última a função essencial da mitocôndria para a célula eucariótica (HAMZA; DAILEY, 2012; KARNKOWSKA et al., 2016; LILL et al., 2012; ZHANG; HACH, 1999). Em adição a sua função central em diversas vias bioquímicas, a mitocôndria atua na regulação da via intrínseca da morte celular por apoptose (TAIT; GREENN, 2010) e tem sido associada na patologia de numerosas doenças, incluindo desordens neurodegenerativas (ITOH et al., 2013; LARSSON, 2010; MISHRA; CHAN, 2014).

Estruturalmente, a mitocôndria é composta por duas membranas, a membrana externa e interna. Estas delimitam dois compartimentos distintos. O espaço delimitado pela membrana interna é denominado matriz mitocondrial e a região existente entre as duas membranas é conhecido como espaço intermembrana (Figura 1). Matriz e espaço intermembrana diferem fortemente com relação à composição de íons e moléculas, principalmente em decorrência da permeabilidade seletiva da membrana interna (HERRMANN; RIEMER, 2010b). Enquanto que a membrana externa permite a livre difusão de moléculas de ~ 5 KDa entre o citoplasma e o espaço intermembrana, a membrana interna é altamente seletiva, sendo o transporte através de si fortemente controlado por translocadores substrato-específicos (RIEMER et al., 2015). Através da utilização de proteínas fluorescentes sensíveis às modificações redox foi demonstrado que o espaço intermembrana é significativamente mais oxidativo do que o citoplasma e a matriz mitocondrial (HERRMANN; RIEMER, 2010b).

Estudos pioneiros de microscopia eletrônica realizados na década de 50 (PALADE, 1952; SJOSTRAND, 1953) demonstraram que a membrana interna apresenta inúmeras dobras, ou invaginações, comumente denominadas de cristas mitocondriais. Por muito tempo, as cristas mitocondriais foram consideradas apenas prolongamentos da membrana interna,

possibilitando um grande aumento da área de superfície, o que facilitaria a alocação de inúmeras unidades do sistema de fosforilação oxidativa. Nesse modelo, toda a região do espaço intermembrana constituiria um compartimento único e homogêneo.



Figura 1. Representação esquemática da estrutura mitocondrial. O espaço intermembrana é estruturalmente subdividido em dois compartimentos: o espaço intermembrana periférico é definido como a região situada entre a membrana externa e a membrana interna periférica. Já o espaço intracristal compreende a região delimitada pela membrana cristal. A junção cristal é uma estrutura tubular que delimita esses dois compartimentos. FONTE: Adaptado de: Herrmann e Riemer (2010b).

O conceito de um espaço intermembrana único e contínuo foi questionado após a descoberta de pequenas estruturas tubulares formadas pela membrana interna, conhecidas como junções cristais (FREY; MANNELLA, 2000; MANNELLA et al., 1994, 1997; PERKINS et al., 1997) (Figura 1). As junções cristais delimitam duas regiões distintas da membrana interna: a membrana cristal, que compõe a crista mitocondrial, e a membrana periférica que representa a porção da membrana interna localizada próxima à membrana externa. Além disso, a junção cristal também delimita duas regiões distintas do espaço intermembrana: o espaço intermembrana periférico e o espaço intracristal (HERRMANN; RIEMER, 2010b; van der LAAN, 2012; van der LAAN, 2016). Apesar das junções cristais delimitarem regiões distintas da membrana interna, contendo diferentes composições

proteicas, existe uma constante troca de proteínas entre as mesmas dependendo das necessidades celulares (STOLDT et al., 2012; van der LAAN, 2016).

Na membrana cristal existe uma grande concentração dos componentes do sistema de fosforilação oxidativa, responsável pela síntese de ATP. Esse sistema é composto pela cadeia transportadora de elétrons e pelo complexo da ATP sintase.

A cadeia transportadora de elétrons, ou simplesmente cadeia respiratória, é composta por uma série de carregadores que catalisam a transferência sequencial de elétrons oriundos das oxidações das moléculas de alimentos para o oxigênio molecular. A maioria desses carregadores encontram-se agrupados em quatro complexos multiproteicos embebidos na membrana interna, conhecidos como complexos respiratórios I (NADH:ubiquinonaoxidorredutase), II (succinato-ubiquinona-oxidorredutase), III (ubiquinona:citocromo coxidorredutase) e IV (citocromo c-oxidase). Em adição aos complexos I, II, III e IV outras duas moléculas completam a cadeia respiratória: uma quinona hidrofóbica conhecida como ubiquinona, ou simplesmente conzima Q, e o citocromo c (HATEFI, 1985; LENAZ; GENOVA, 2010; SCHAFFER; SULEIMAN, 2007; TZAGOLOFF, 1982).

A fosforilação oxidativa inicia-se com a entrada de elétrons na cadeia respiratória, a partir das coenzimas reduzidas NADH e FADH2, geradas a partir das oxidações das moléculas de alimento. NADH e FADH2 são oxidadas pelos complexos I e II, respectivamente. Os elétrons são então transferidos sequencialmente para a ubiquinona, o complexo III, o citocromo c, o complexo IV e, finalmente, para o oxigênio molecular (SARASTE, 1999).

A energia liberada durante a passagem dos elétrons, através da cadeia respiratória, impulsiona o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Dessa forma é gerado um armazenamento temporário de energia potencial eletroquímica, decorrente da diferença de concentração de prótons, e da separação de cargas através da membrana mitocondrial interna. A energia potencial eletroquímica, conhecida como força próton-motriz, impulsiona a síntese de ATP, à medida que os prótons fluem de volta à matriz mitocondrial de acordo com o gradiente eletroquímico, através de um poro associado com o complexo da ATP-sintase (SCHULTZ; CHAN, 2001).

A cadeia respiratória da levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui certa particularidade em virtude desse organismo não possuir o complexo respiratório I funcional (Figura 2). Ao invés dele, a levedura possui três NADH desidrogenases localizadas na membrana mitocondrial interna, que catalisam a oxidação do NADH e concomitante redução da ubiquinona (BAKKER et al., 2001). As enzimas Nde1 e Nde2 catalisam a oxidação do

NADH proveniente do citoplasma (LUTTIK et al., 1998), enquanto Ndi1, o NADH da matriz mitocondrial (MARRES et al., 1991). Ao contrário do complexo respiratório I, essas enzimas são incapazes de bombear prótons para o espaço intermembrana durante o processo de transferência de elétrons.



Figura 2. Representação esquemática do sistema de fosforilação oxidativa de *Saccharomyces cerevisiae*. As setas indicam o fluxo de elétrons através dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Os elétrons derivados do NADH e succinato são transferidos para o oxigênio molecular por meio de uma série de carreadores presentes na membrana mitocondrial interna. O gradiente eletroquímico gerado pela transferência de elétrons impulsiona a síntese de ATP por meio do complexo da ATP-sintase. Para fins de simplificação não estão sendo demonstradas as junções cristais. NDE1/2 – NADH desidrogenase externa 1/2, NDI1 – NADH desidrogenase interna 1, II – complexo respiratório II, III – complexo respiratório III, IV – complexo respiratório IV, Q – coenzima Q, *cytc* – citocromo *c*. FONTE: Adaptado de Herrero et al. (2008).

Existem inúmeras evidências que suportam a teoria endossimbionte para o surgimento das mitocôndrias. De acordo com essa teoria as mitocôndrias são derivadas de uma α -proteobactéria ancestral, que foi engolfada por uma célula eucariótica primordial há aproximadamente 1,5-2 bilhões de anos (GRAY et al., 1999). No decorrer da evolução, o genoma mitocondrial sofreu uma extensiva redução devido a inúmeras perdas ou transferências de genes para o DNA nuclear (ANDERSSON; KURLAND, 1998). No entanto, na célula eucariótica atual existe um pequeno número de proteínas e RNAs funcionais codificados pelo DNA mitocondrial (mtDNA). Em *S. cerevisiae*, por exemplo, o genoma mitocondrial contém os genes codificantes para três subunidades do complexo respiratório

IV: *COX1*, *COX2* e *COX3*, três subunidades da ATP-sintase: *ATP6*, *ATP8* e *ATP9*, uma subunidade do complexo III: *COB1*, uma proteína ribossomal: VAR1, para os RNAr 15S e 21S e finalmente para os 24 tRNA que perfazem todos os códons (FOURY et al.,1998).

Um estudo proteômico identificou 851 proteínas que fazem parte de um conjunto de aproximadamente 1000 proteínas preditas fazerem parte da composição da mitocôndria de *S. cerevisiae* (REINDERS et al., 2006) (Figura 3). Como mencionado anteriormente, apenas um pequeno número delas (~ 1%) são codificados pelo mtDNA, sendo a grande maioria (~ 99%) codificadas por genes nucleares, traduzidas no citoplasma e posteriormente importadas para o interior da mitocôndria (MEISINGER et al., 2009). Dessa forma, há necessidade de um complexo mecanismo de importação que as receba, processe e as distribua pelos diferentes compartimentos mitocondriais (BECKER et al., 2012; BOLENDER et al., 2008; CHACINSKA et al., 2009; DUDEK et al., 2013; HARBAUER et al., 2014; NEUPERT; HERRMANN, 2007; SCHMIDT et al., 2010; STOJANOVSKI et al., 2012).



Figura 3. Representação esquemática do proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*. As porcentagens de proteínas envolvidas nos diferentes processos mitocondriais foram definidas de acordo com o trabalho de Reinders et al. (2006). FONTE: Adaptado de Schmidt et al. (2010).

1.2 Mecanismos de importação das proteínas mitocondriais

Grande parte do conhecimento da maquinaria de importação das proteínas mitocondriais foi obtida através de estudos utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo (Figura 4). Com exceção das proteínas codificadas pelo mtDNA e proteínas α-hélices da membrana externa, o restante dos precursores proteicos mitocondriais são translocados para o interior da organela através do complexo proteico TOM (*translocase of the outer membrane*) localizado na membrana externa. Dessa forma, TOM pode ser visto como o portão de entrada para a importação da grande maioria das proteínas mitocondriais (CHACINSKA et al., 2009; DOLEZAL et al., 2006; HERRMANN et al., 2012; SCHMIDT et al., 2010; STOJANOVSKI et al., 2012). A partir do complexo TOM, os precursores podem seguir diferentes rotas de importação. A via de importação a ser seguida irá depender de sinais específicos presentes na sequência de aminoácidos da proteína precursora. Quatro principais vias de importação (A, B, C e D da figura 4) que direcionam as proteínas para os diferentes sub-compartimentos da mitocôndria tem sido amplamente caracterizadas (BOHNERT et a., 2015; HARBAUER et al., 2014; SCHMIDT et al., 2010).

A seguir, segue-se uma descrição das vias de importação dos precursores contendo pressequência (rota de importação A da figura 4) e dos precursores ricos em resíduos de cisteínas (rota de importação B da figura 4) das proteínas mitocondriais de *S. cerevisiae*.

1.2.1 O mecanismo de importação pressequencia

Grande parte das proteínas mitocondriais é traduzida a partir do RNAm com uma extensão N-terminal conhecida como pressequencia. A pressequencia direciona a importação da maioria das proteínas para a matriz mitocondrial e de uma fração considerável para a membrana interna (MOSSMANN et al., 2012; SCHMIDT et al., 2010). Proteínas contendo a pressequencia são inicialmente translocadas através do complexo TOM seguido do complexo TIM23 (*translocase of the inner membrane*) situado na membrana mitocondrial interna. A partir de TIM23 elas podem ser liberadas lateralmente para a membrana interna ou então serem completamente importadas para a matriz com auxílio do complexo PAM (*pressequence translocase-associated motor*) (CHACINSKA et al., 2009; DOLEZAL et al., 2006; NEUPERT; HERRMANN, 2007; SCHMIDT et al., 2010) (Figura 5).



Figura 4. Visão geral da maquinaria de importação das proteínas mitocondriais em S. *cerevisiae*. Com a exceção das proteínas codificadas no mtDNA e as proteínas α -hélices da membrana externa o restante dos precursores proteicos mitocondriais são translocados para o interior da organela através do complexo proteico TOM localizado na membrana externa. A - Os precursores contendo pressequência cliváveis são translocados para a matriz mitocondrial através do complexo TIM23 localizado na membrana interna. Esse processo requer a energia do gradiente eletroquímico de prótons. **B** - Os precursores ricos em resíduos de cisteínas destinados ao espaço intermembrana são importados através da maquinaria MIA. MIA_{40} funciona como um receptor e uma oxido-redutase para os precursores, catalizando a inserção de ligações dissulfetos nas proteínas precursoras. Erv1 reoxida MIA₄₀ para que ela possa realizar um novo evento de importação. C - Os precursores dos carregadores metabólicos hidrofóbicos da membrana interna são ligados pelas proteínas TIM no espaço intermembrana e posteriormente inseridos na membrana interna através do complexo TIM22 em um processo dependente da energia do gradiente eletroquímico de prótons. D - Os precurosres das proteínas barril-β da membrana externa são transferidos para a maquinaria SAM com auxílio das chaperonas TIM. A maquinaria SAM insere esses precursores na membrana externa. E - As proteínas de membrana exerna com segmentos a-hélice transmembrana são inseridas na membrana através de mecanismos pouco caracterizados. No exemplo demonstrado, a importação desses precursores requer a participação da maquinaria MIM. F - As proteínas codificadas no mtDNA são inseridas na membrana interna com auxílio da maquinaria OXA. Adaptado de Bohnert et al. (2015).

A composição da pressequencia é rica em aminoácidos carregados positivamente e em aminoácidos hidrofóbicos os quais formam uma α -hélice anfipática. Os aminoácidos positivos são dominantes em um dos lados da hélice enquanto no outro lado estão presentes resíduos hidrofóbicos (ABE et al., 2000; CHACINSKA et al., 2009; DOLEZAL et al., 2006; ENDO et al., 2011; HABIB et al., 2007; MOSSMANN et al., 2012; NEUPERT; HERRMANN, 2007).

As pressequencias possuem um tamanho médio de 15-50 resíduos e são reconhecidas sequencialmente pelos complexos TOM e TIM23 durante a etapa de translocação (CHACINSKA et al., 2009). Aproximadamente 60% ou mais de todas as proteínas mitocondriais são sintetizadas com pressequencias (VÖGTLE et al., 2009).



Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de importação das proteínas contendo a pressequencia. Os componentes do complexo TOM (*translocase of the outer membrane*) estão coloridos em verde, os do complexo TIM23 (*translocase of the inner membrane*) estão destacados em tons de vermelho e laranja. As proteínas precursoras são inicialmente translocadas através do complexo de membrana externa TOM. Nessa etapa, os receptores Tom20 e Tom22 interagem com a pressequencia e direcionam os precursores para o poro formado por Tom40. Após emergirem no espaço intermembrana, os precursores são transferidos para o complexo TIM23 com auxílio dos domínios receptores de Tim50 e Tim21 que se projetam para o espaço intermembrana. Impulsionados pelo potencial de membrana ($\Delta \Psi$), os precursores são translocados através do poro formado por Tim23. A etapa final de importe para a matriz é impulsionado pelo complexo PAM, no qual a chaperona mtHsp70 puxa os polipeptídeos para o interior da matriz utilizando a energia da hidrólise do ATP. Proteínas contendo uma pequena região hidrofóbica após a pressequencia são lateralmente liberadas na bicamada lipídica da membrana interna. Detalhes de cada um dos componentes estão descritos no texto. IV e III – complexos respiratórios IV e III, respectivamente. FONTE: Adaptado de Becker et al. (2012).

Nas etapas iniciais da translocação através do complexo TOM a região hidrofóbica da pressequencia interage com o domínio receptor de Tom20, enquanto que a região carregada positivamente é reconhecida por Tom22 (SAITOH et al., 2007; SHIOTA et al., 2011; YAMANO et al., 2008b). Após a etapa de reconhecimento, os precursores são translocados através de um canal formado pela proteína barril- β Tom40. Durante esse processo, os precursores adquirem a forma de cadeias polipeptídicas lineares, podendo adquirir uma conformação estendida ou de α -hélice (SCHMIDT et al., 2010).

Após emergirem do complexo TOM, os precursores são reconhecidos pelo complexo TIM23 localizado na membrana mitocondrial interna (Figura 5). Durante a translocação por TIM23 as proteínas podem seguir através de duas possíveis rotas de importação: ser liberadas lateralmente para a membrana interna ou então direcionadas para a matriz mitocondrial (CHACINSKA et al., 2009; NEUPERT; HERRMANN, 2007; SCHMIDT et al., 2010). Proteínas destinadas à matriz são hidrofílicas e a pressequencia geralmente contem a informação necessária para a sua importação. Por outro lado, um pequeno número de precursores contem um segmento hidrofóbico adicional localizado imediatamente após a pressequencia. Esta porção hidrofóbica bloqueia a translocação através de Tim23, induzindo a liberação das proteínas para o interior da fase lipídica da membrana interna (GLICK et al., 1992).

O mecanismo de translocação por meio do complexo TIM23 é considerado o processo mais complexo dentre a maquinaria geral de importação (CHACINSKA et al., 2009). A translocação por este complexo envolve a cooperação com o complexo TOM, a cadeia respiratória, o complexo PAM e duas diferentes fontes de energia: o gradiente eletroquímico (potencial de membrana) e o ATP (BECKER et al., 2012; CHACINSKA et al., 2009; SCHMIDT et al., 2010).

O complexo TIM23 pode ser subdivido em dois componentes: um embebido na membrana interna, formando um poro; e outro na matriz, atuando como um motor impulsionando a translocação (HERRMANN et al., 2012). As subunidades Tim50, Tim23 e Tim21 da porção embebida na membrana possuem domínios que se projetam para o interior do espaço intermembrana que interagem com o complexo TOM. Isto permite a eficiente translocação dos precursores que emergem do complexo TOM para o interior do complexo TIM23 (CHACINSKA et al., 2005; GEISSLER et al., 2002; MOKRANJAC et al., 2009; TAMURA et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2002).

Inicialmente, os precursores que emergiram do complexo TOM são reconhecidos pelo domínio receptor da subunidade Tim50 do complexo TIM23 (SCHULZ et al., 2011). Tim50

se associa fortemente com o domínio de Tim23 exposto para o espaço intermembrana. Dessa forma, a informação sobre o surgimento de uma proteína a partir do complexo TOM é diretamente transferida para o poro formado pela subunidade TIM23 (MOKRANJAC et al., 2009; TAMURA et al., 2009). Ocorre então a translocação através desse poro sendo ele grande o suficiente para permitir a passagem de uma cadeia polipeptídica em uma conformação de α -hélice (TRUSCOTT et al., 2001). A subunidade Tim17 é estruturalmente similar a Tim23 e, apesar de sua função não estar completamente elucidada, ela parece desempenhar uma função regulatória na abertura do poro formado por Tim23 (MARTINEZ-CABALLERO et al., 2007; MEIER et al., 2005).

A proteína Tim21 possui uma função dupla: interage tanto com o complexo TOM, quanto com componentes da cadeia respiratória mitocondrial (van der LAAN et al., 2006). Tem sido postulado que a interação de Tim21 com componentes da cadeia respiratória assegura um eficiente uso do gradiente eletroquímico durante o processo de translocação através de Tim23 (DIENHART 2008; van der LAAN et al., 2006; WIEDEMANN et al., 2007). O gradiente eletroquímico gerado através da membrana interna é crucial para a translocação dos precursores através de TIM23. Basicamente ele exerce duas funções: a ativação de TIM23 e a criação de um efeito eletroforético que impulsiona a importação dos precursores contendo a pressequencia, já que o gradiente eletroquímico é negativo no interior da matriz, enquanto as pressequencias são carregadas positivamente (CHACINSKA et al., 2009; MEINECKE et al., 2006; TRUSCOTT et al., 2001).

A etapa final de translocação das proteínas para a matriz mitocondrial requer a ação do complexo PAM que atua como um motor impulsionador do importe. A subunidade central do complexo PAM é formada pela chaperona mtHsp70 (proteína do choque térmico da matriz de 70KDa). Esta se liga nas cadeias polipeptídicas desenoveladas dos precursores, impulsionando sua translocação para o interior da matriz de maneira dependente da hidrólise de ATP (CHACINSKA et al., 2009; NEUPERT; HERRMANN, 2007; SCHMIDT et al., 2010).

Durante sua ação, mtHsp70 coopera com algumas co-chaperonas, dentre elas Mge1, Tim44, Pam16, Pam17 e Pam18. Mge1, também conhecida como GrpE, é um fator de troca de nucleotídeo que estimula a liberação do ADP de mtHsp70. Tim44 atua como um sitio de ancoragem para mtHsp70 no complexo TIM23. As co-chaperonas Pam16, Pam17 e Pam18 são necessárias para coordenar a função de mtHsp70 com o complexo TIM23 (SCHMIDT et al., 2010).

Nos últimos anos, surgiram dois modelos que tentam explicar o mecanismo pelo qual mtHsp70 impulsiona a translocação de proteínas para o interior da matriz. O primeiro deles, conhecido como aprisionamento passivo (*passive trapping*), prediz que as moléculas de mtHsp70 se ligam nos precursores polipeptídicos desenovelados a medida que eles emergem de TIM23. Isto impede que os mesmos retornem (*back-sliding*) para o espaço intermembrana. À medida que novos segmentos do polipeptídio alcançam a matriz por difusão novas moléculas de mtHsp70 se ligam nos mesmos, favorecendo um movimento direcional do precursor para o interior da matriz (LIU et al., 2003; OKAMOTO et al., 2002; YAMANO et al., 2008a). O segundo modelo, conhecido como puxamento ativo (*active pulling*), prediz que as moléculas de mtHsp70 ligadas a membrana através de Tim44 alteram sua conformação impulsionando ativamente o precursor para o interior da matriz (CHAUWIN et al., 1998). Estudos funcionais utilizando mutantes de mtHsp70 indicam que ambos os modelos operam durante a importação dos precursores para o interior da matriz (KRAYL et al, 2007).

1.2.2 Processamento final dos precursores contendo pressequencia

Após os precursores alcançarem a matriz mitocondrial, a maioria das pressequencias são proteoliticamente removidas através da ação de uma enzima denominada peptidase de processamento mitocondrial (MPP) (GAKH et al., 2002; KALOUSEK et al., 1993; MOSSMANN et al., 2012; TAYLOR et al., 2001) (Figura 6). MPP é um heterodímero solúvel constituído por duas proteínas homólogas Mas1 (β -MPP) e Mas2 (α -MPP). Ambas subunidades de MPP são essenciais para a viabilidade celular, indicando o papel central da remoção da pressequencia na maturação das proteínas mitocondrias (SCHMIDT et al., 2010).

MPP também é capaz de reconhecer e clivar pressequencias de proteínas que foram lateralmente liberadas na bicamada lipídica da membrana interna durante a translocação através de Tim23 (MOSSMANN et al., 2012). Conforme anteriormente citado, proteínas que utilizam esta rota de importação possuem uma pequena região hidrofóbica localizada logo após a pressequência. Este segmento hidrofóbico causa um bloqueio da translocação através do complexo TIM23, induzindo a liberação lateral das proteínas para o interior da bicamada lipídica da membrana interna (GLICK et al., 1992). A pressequencia que inicialmente foi lançada para o interior da matriz é clivada pela protease MPP.

No caso de proteínas da membrana interna, o sinal hidrofóbico tipicamente permanece como parte da proteína madura e ancora a proteína na bicamada lipídica. Para proteínas solúveis do espaço intermembrana, o sinal hidrofóbico é clivado pelo complexo IMP (*inner* <u>membrane peptidase</u>), liberando a proteína madura nesse compartimento (CHACINSKA et al., 2009; SCHMIDT et al., 2010; MOSSMANN et al., 2012) (Figura 6).



Figura 6. Representação esquemática das etapas finas de processamento das proteínas mitocondriais contendo a pressequencia. Após alcançarem a matriz mitocondrial as pressequencias são removidas pela peptidase MPP. MPP também atua na clivagem de proteínas que foram lateralmente liberadas na bicamada lipídica. As pressequencias clivadas por MPP são posteriormente degradadas pela ação da oligopeptidase Cym1. Para um grupo bem menor de proteínas, proteases adicionais catalisam posteriores eventos de clivagem. Icp55 e Oct1 catalisam respectivamente a clivagem de um e oito resíduos de aminoácidos da região N-terminal gerada por MPP. Detalhes de cada um dos componentes estão descritos no texto. FONTE: Adaptado de Becker et al. (2012).

O complexo IMP consiste de um hetero-oligomero composto por duas subunidades catalíticas (Imp1 e Imp2) e uma subunidade regulatória (Som1) (JAN et al., 2000; NUNNARI et al., 1993; SCHNEIDER et al., 1994). As subunidades catalíticas Imp1 e Imp2 possuem os sítios catalíticos expostos para o espaço intermembrana e atuam na clivagem da região hidrofóbica das proteínas precursoras cujas formas maduras residem no espaço intermembrana (BAUER et al., 1994; JAN et al., 2000; NUNNARI et al., 1993; SCHMIDT et

al., 2010; SCHNEIDER et al., 1994). Atualmente existem apenas seis substratos conhecidos do complexo IMP: as proteínas Cox2, Mcr1, Gut2, Cyb2 e Ptc5 são clivadas por Imp1 enquanto Cyc1 é clivada por Imp2 (GASSER et al., 1982; HARTL et al., 1987; NUNNARI et al., 1993; ESSER et al., 2004). Curiosamente, não há um consenso entre os sítios de clivagem de ambas as proteases. Imp1 parece requerer um aminoácido acídico (D ou E) na posição -1 em relação ao sítio de clivagem e um aminoácido hidrofóbico não aromático na posição -3. Imp2 requer um resíduo de alanina nas posições -1 e -3 (LUO et al., 2006; NUNNARI et al., 1993; POVEDA-HUERTES et al., 2016; TEIXEIRA e GLASER, 2013).

As pressequencias clivadas por MPP são rapidamente degradadas evitando que as mesmas interfiram com o potencial de membrana mitocondrial em decorrência de suas cargas positivas (MOSSMANN et al., 2012). A degradação das pressequencias é catalisada pela oligopeptidase Cym1 localizada na matriz mitocondrial (ALIKHANI et al., 2011) (Figura 6).

A atividade catalítica de MPP reside na subunidade Mas1, ao qual pertence ao grupo das metaloproteases, possuindo um motivo de ligação ao zinco (GAKH et al., 2002). A análise da estrutura cristalina de MPP em complexo com peptídeos sintéticos revelou que a clivagem ocorre com as pressequencias em uma conformação estendida, em contraste a conformação de α -hélice adotada durante a translocação pelos complexos TOM e TIM23 (TAYLOR et al., 2001).

Durante muitos anos o sítio exato de clivagem de MPP foi determinado apenas para um pequeno conjunto de proteínas, tradicionalmente através do sequenciamento de Edman, utilizando proteínas purificadas das mitocôndrias. Com bases nessas informações, programas de predição de sítios de clivagens foram criados (EMANUELSSON et al., 2007), porém suas predições muitas vezes eram incorretas devido ao limitado número de informações (VÖGTLE et al., 2009). A situação mudou significativamente com um trabalho proteômico global realizado por Vögtle et al. (2009). Neste trabalho, os autores determinaram sistematicamente a região N-terminal de 615 diferentes proteínas dentre as 851 proteínas descritas na mais completa análise proteômica da mitocôndria de levedura (REINDERS et al., 2006).

O estudo de Vögtle et al. (2009) possibilitou realizar o alinhamento da região Nterminal da maioria das proteínas mitocondriais que possuem pressequencia. Isto permitiu identificar todos os sítios de clivagem de MPP, fornecendo informações valiosas para a criação de um consenso de clivagem para esta peptidase (VÖGTLE et al., 2009). O motivo de clivagem de MPP possui uma arginina altamente conservada na posição -2 em relação ao Nterminal maduro das proteínas (MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2009; VÖGTLE et al., 2011) (Figura 7A).



Figura 7. Motivos de clivagem de proteases da matriz mitocondrial: MPP (A), Icp55 (B) e Oct1 (C). O alinhamento dos sítios de clivagem dos substratos das proteases permitiu gerar os motivos de clivagem consenso das mesmas. No total, foram utilizadas as sequências de 38 proteínas substratos de Icp55 (B) e 12 de Oct1 (C). FONTE: Adaptado de Mossmann et al. (2012).

A clivagem da pressequencia feita por MPP libera a proteína madura ao qual adquire seu enovelamento final. No entanto, para algumas proteínas, etapas de clivagem adicionais são necessárias para a maturação final. As enzimas Oct1 (*octapeptidyl aminopeptidase 1*) e Icp55 (*intermediate cleaving peptidase 55*) catalisam clivagens adicionais na região Nterminal de algumas proteínas clivadas por MPP (Figura 6) (MOSSMANN et al., 2012; NAAMATI et al., 2009; VÖGTLE et al. 2009; VÖGTLE et al. 2011).

Icp55 é uma aminopeptidase que cliva um único aminoácido (fenilalanina, tirosina ou leucina) da região N-terminal de um conjunto de proteínas clivadas por MPP (Figura 6) (NAAMATI et al., 2009; VÖGTLE et al., 2009). Esta enzima é uma metaloprotease altamente conservada, localizada na matriz mitocondrial e associada perifericamente à membrana interna (VÖGTLE et al., 2009). A deleção do gene *ICP55* não causa nenhum defeito de crescimento em meio fermentativo ou respiratório (VÖGTLE et al., 2009).

A clivagem feita por Icp55 é estritamente dependente do processamento inicial de MPP (MOSSMANN et al., 2012). A descoberta de Icp55 confirma o motivo altamente conservado de MPP, no qual uma arginina está presente na posição -2 em relação ao local da sua clivagem. Antes da descrição de Icp55, um número considerável de proteínas substratos de MPP apresentava um resíduo de arginina na posição -3. Isto levou a hipótese de que MPP também poderia atuar no motivo contendo a arginina na posição -3. No entanto, com a descoberta de Icp55 ficou evidente que o sítio de clivagem de MPP é de fato uma arginina na posição -2, pois em seguida, Icp55 remove mais um aminoácido (MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2009) (Figura 7B).

Atualmente 39 proteínas foram descritas como substratos de Icp55 (MOSSMANN et al., 2012; SCHMIDT et al., 2010). Essas proteínas atuam em diferentes processos mitocondriais e a função da clivagem catalisada por Icp55 permanece pouco entendida (veja a seguir uma discussão conjunta do papel das clivagens de Icp55 e Oct1 na estabilização proteica).

Assim como Icp55, Oct1 é uma metaloprotease localizada na matriz mitocondrial, mas que catalisa a clivagem de oito resíduos de aminoácidos (octapeptídeo) da região N-terminal de algumas proteínas clivadas por MPP (Figura 6) (BRANDA; ISAYA 1995; GAKH et al., 2002; GAVEL; von HEIJNE, 1990; ISAYA et al., 1994; KOPPEN; LANGER, 2007; MARCONDES et al., 2010; VÖGTLE et al., 2011). A enzima possui um motivo de ligação ao zinco e dois resíduos de cisteínas altamente conservados importantes para a estabilidade da enzima (CHEW et al., 1996; GAKH et al., 2002). Semelhante a Icp55, a clivagem feita por Oct1 é estritamente dependente do primeiro evento de clivagem catalisado por MPP (MOSSMANN et al., 2012).

A deleção do gene *OCT1* não é letal para as células de levedura, porém causa a perda completa do DNA mitocondrial (mtDNA) (ISAYA et al., 1994), indicando o importante papel de Oct1 na maturação das proteínas mitocondriais.

O alinhamento dos sítios de clivagem dos substratos de Oct1 caracterizados até o momento permitiu gerar um motivo de clivagem consenso dessa peptidase (MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2011). O sítio de clivagem de Oct1 possui um resíduo de arginina altamente conservado na posição -10 em relação ao N-terminal maduro das proteínas (Figura 7C). De fato, conforme anteriormente citado, um resíduo de arginina é encontrada na posição -2 do sítio de clivagem de MPP (considerando-se apenas o primeiro evento de clivagem, a arginina encontra-se na posição -2 em relação ao sítio de clivagem de MPP e -10 em relação ao sítio de clivagem por Oct1). A posição -8 é também altamente conservada, podendo ser encontrado resíduos hidrofóbicos como fenilalanina, leucina e isoleucina. Finalmente, observa-se uma prevalência de resíduos de serina e treonina distribuídos nas posições -5, -6 e -7 (MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2011).

Até o momento, foram descritas18 proteínas como substratos da peptidase Oct1 na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre elas, algumas foram extensivamente caracterizadas e confirmadas como verdadeiros substratos de Oct1 através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Esse é o caso das proteínas Rip1, CoxIV e Mdh1 (BRANDA; ISAYA 1995; GRAHAM et al., 1993; HURT et al., 1985; ISAYA et al., 1994; NETT et al., 1997; NETT; TRUMPOWER, 1999; VÖGTLE et al., 2011). Outras foram apenas parcialmente caracterizadas por meio de estudos *in vitro*: Sdh1, Mrps28, Lpd1, Rim1, Tuf1, Imo32 (BRANDA; ISAYA 1995; VÖGTLE et al., 2011). Finalmente, as proteínas Crp3, Mrp21, Rsm24, Prx1, Ysa1, Hem15, Idp1, Pet122 e Mrpl20, foram apenas preditas como possíveis substratos de Oct1, não havendo dados experimentais (BRANDA; ISAYA 1995; MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2009; VÖGTLE et al., 2011).

As proteínas substratos de Oct1 possuem funções diversas, atuando na cadeia respiratória, ciclo de Krebs, manutenção do mtDNA, tradução mitocondrial, ciclo da ureia, enovelamento proteico e resposta a estresse (VÖGTLE et al., 2011). O papel funcional da clivagem catalisada por Oct1 não está completamente entendido. Um estudo inicial sobre as proteínas Rip1 e CoxIV (as proteínas Rip1 e CoxIV fazem parte dos complexos respiratórios III e IV, respectivamente) demonstrou que a forma intermediária de CoxIV se acumula na matriz mitocondrial, enquanto o intermediário de Rip1 é corretamente inserido na membrana mitocondrial interna (ISAYA et al., 1994) (BECKMANN et al., 1989; DOWHAN et al., 1985). Posteriormente, Nett e Trumpower (1999) demonstraram que ambas as formas

intermediária e processada de Rip1 são funcionais sendo corretamente incorporadas no complexo respiratório III.

Evidências indicam que as clivagens catalisadas por Icp55 e Oct1 possuem um importante papel na estabilidade das proteínas-alvo na matriz mitocondrial (Vögtle et al. 2009; 2011). Os intermediários gerados pela clivagem de MPP são instáveis e a posterior remoção de aminoácidos catalisada pelas enzimas Icp55 e Oct1 convertem os polipeptídeos em produtos proteicos mais estáveis (HARBAUER et al., 2014; MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2009; VÖGTLE et al., 2011).

A hipótese do aumento da estabilidade proteica parece ter relação com a regra Nterminal (*N-end rule*) da proteólise de proteínas citosólicas (VARSHAVSKY, 2008). A regra N-terminal foi inicialmente descrita para proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* através de estudos demonstrando que a estabilidade de proteínas geradas artificialmente era diretamente relacionada com a natureza do aminoácido N-terminal (BACHMAIR et al., 1986; BACHMAIR; VARSHAVSKY, 1989). Estudos posteriores revelaram que o sistema proteolítico ubiquitina-proteassomo é o responsável pelo reconhecimento e degradação dessas proteínas citosólicas (DOUGAN et al., 2012; TASAKI et al., 2012) (Figura 8). Embora no sistema citosólico as proteínas responsáveis pela regra N-terminal tenham sido identificadas, no sistema mitocondrial os componentes responsáveis pelas modificações pós-traducionais dos aminoácidos e degradação das proteínas alvos ainda são pouco caracterizados (VÖGTLE et al., 2011). De qualquer forma, a composição de aminoácidos na região N-terminal parece afetar a estabilidade das proteínas-alvo no citosol e na mitocôndria de forma similar (VÖGTLE et al., 2009; 2011).

O aminoácido N-terminal responsável por uma elevada taxa de degradação proteica é denominado aminoácido desestabilizante. Aminoácidos desestabilizantes presentes na região N-terminal são conhecidos como marcas de degradação ou simplesmente *N-degrons*. Além do aminoácido desestabilizante os *N-degrons* são constituídos por um resíduo de lisina presente na região interna da proteína e outro resíduo de lisina na região N-terminal desestruturada (BACHMAIR; VARSHAVSKY, 1989; PRAKASH et al., 2004; SUZUKI; VARSHAVSKY, 1999; VARSHAVSKY, 1996).

Durante a síntese das proteínas, os *N-degrons* não estão presentes, surgindo no decorrer da vida da proteína, como parte de um processo regulado de degradação. Os mecanismos moleculares pelo qual os *N-degrons* são gerados permanecem pouco entendidos. Durante a criação de um *N-degron*, os aminoácidos N-terminais são convertidos

sequencialmente em desestabilizadores terciários, secundários e primários (SRIRAM; KWON, 2010; SRIRAM et al., 2011) (Figura 8).

Em Saccharomyces cerevisiae, a geração de um N-degron em proteínas citosólicas inicia-se com a desaminação dos aminoácidos desestabilizadores terciários asparagina e glutamina, catalisada pela enzima Nta1 (*N-terminal amidase*) (BAKER; VARSHAVSKY, 1995). Os aminoácidos gerados, aspartato e gluatamato, são considerados desestabilizadores secundários. Estes por sua vez, são convertidos em desestabilizadores primários através de uma reação de arginilação catalisada pela enzima Ate1 (*arginyl-tRNA-protein transferase 1*) (BALZI et al., 1990). O resíduo de arginina é um aminoácido desestabilizador primário e caracteriza o término da geração do *N-degron*.



Figura 8. Representação esquemática da geração de um *N-degron* **em** *Saccharomyces cerevisiae*. A proteína direcionada a degradação está representada por uma esfera laranja. A geração do *N-degron* inicia com a desaminação dos aminoácidos desestabilizadores terciários glutamina e asparagina catalisada pela enzima Nta1. A desaminação gera os aminoácidos desestabilizadores secundários aspartato e glutamato, aos quais são posteriormente convertidos no desestabilizador primário arginina, através de uma reação de arginilação catalisada pela enzima Ate1. A etapa de degradação inicia-se com a ubiquitinação do *N-degron* catalisada por uma enzima E3 ligase conhecida como N-recognina Ubr1. A ubiquitinação encaminha o polipeptídeo para a degradação através do sistema proteolítico proteassmo. Além da arginina, outros aminoácidos são desestabilizadores primários. Eles podem ser agrupados em duas classes: *N-degrons* da classe 1 – engloba aminoácidos carregados positivamente, H, L e R; *N-degrons* da classe 2 – engloba aminoácidos hidrofóbicos volumosos, F, L, W, I e Y. FONTE: Adaptado de Sriram et al. (2011).

O processo de degradação de proteínas citosólicas envolve o reconhecimento do *Ndegron* através de uma enzima denominada N-recognina Ubr1(*ubiquitin ligase N-recognin 1*). Esta é uma enzima E3 ligase que catalisa a ligação de uma cadeia de ubiquitina no resíduo de lisina presente no interior da proteína alvo (BACHMAIR et al., 1986; BARTEL et al., 1990; VARSHAVSKY, 1996). Uma vez formada, a cadeia de ubiquitina será reconhecida pelo sistema proteolítico proteassomo, ao qual irá degradar o polipeptídeo alvo (DOHMEN et al., 1991). Além da arginina e da lisina ubiquitinada, Ubr1 é capaz de reconhecer outros aminoácidos desestabilizadores primários que constituem os *N-degrons* da classe 1 e 2 (BYRD et al., 1998; DU et al., 2002).

A regra N-terminal para estabilidade de proteínas citosólicas está presente em todos os organismos examinados, incluindo a levedura, mamíferos, plantas e bactérias. No entanto, cada organismo possui um conjunto de aminoácidos desestabilizadores característicos (SRIRAM et al., 2011; TASAKI et al., 2012).

Baseado na hipótese da regra N-terminal, Vögtle et al. (2009, 2011) propuseram que a clivagem de proteínas da matriz mitocondrial por MPP cria regiões N-terminais contendo aminoácidos desestabilizadores. Por outro lado, as clivagens catalisadas pelas enzimas Icp55 e Oct1 geram proteínas com aminoácidos estabilizadores na região N-terminal. Dessa forma, embora a regra do N-terminal apresente semelhanças para proteínas citosólicas e mitocondriais, os mecanismos subjacentes parecem ser bastante distintos.

No entanto, para um total de 39 proteínas substratos de Icp55 e 18 de Oct1, apenas 6 proteínas foram experimentalmente analisadas (3 proteínas substratos de Icp55 - Aco1, Atp3 e Tim21 e 3 de Oct1 – CoxIV, Rip1 e Mdh1). Além disso, o significado fisiológico das clivagens de Icp55 e Oct1, bem como os mecanismos envolvidos no ganho de estabilidade gerado pela ação dessas proteases, não estão claros.

1.2.3 O mecanismo de importação acoplado a processo oxidativo

O mecanismo de importação acoplado a processo oxidativo é responsável pela importação de grande parte das proteínas solúveis para o espaço intermembrana (Figura 9). Ao contrário das proteínas de matriz, que possuem a pressequencia, o sinal de importação dessas proteínas é composto por resíduos de cisteínas altamente conservados presentes no interior das sequências proteicas (FISCHER; RIEMER, 2013; HERRMAN; RIEMER, 2010a; HERRMANN; RIEMER, 2012; HERRMANN; RIEMER, 2014; RIEMER et al., 2009;



RIEMER et al., 2011). Durante o processo de importação esses resíduos são oxidados, originando a formação de ligações dissulfetos.

Figura 9. Representação esquemática do mecanismo de importação acoplado a processo oxidativo. A grande maioria das proteínas solúveis do espaço intermembrana possuem resíduos de cisteínas altamente conservados presentes no interior das suas sequências. As proteínas precursoras são sintetizadas no citosol e seus resíduos de cisteínas devem ser mantidos na forma reduzida (Cys-SH). Após serem translocadas através do complexo TOM, os precursores são reconhecidos pela oxidoredutase Mia40 que se encontra na forma oxidada (1). Um dos resíduos de cisteínas do precursor faz um ataque nucleofílico na ligação dissulfeto de Mia40, originando um intermediário misto Mia40precursor (2). O intermediário misto é resolvido pelo ataque de outra cisteína da proteína-alvo ao dissulfeto misto, originando dissulfeto intramolecular no precursor (3), liberando Mia40 na sua forma reduzida e o substrato oxidado na sua forma madura (4). Mia40 é reoxidada através da ação da flavoenzima Erv1 (5). Os elétrons de Mia40 são inicialmente transferidos para o motivo CxxC altamente conservado de Erv1. Em seguida, o cofator FAD presente na molécula de Erv1 reoxida o motivo CxxC. Os elétrons do cofator FAD podem seguir dois possíveis caminhos: eles podem ser transferidos diretamente para o oxigênio molecular originando peróxido de hidrogênio (H2O2) (6) ou serem lançados na cadeia respiratória através da proteína citocromo c (7). IV – complexo respiratório IV, ME - membrana externa, MI - membrana interna. FONTE: Adaptado de Schmidt et al. (2010).

Os precursores proteicos são inicialmente translocados através do complexo TOM presente na membrana externa. Durante a translocação os precursores são mantidos em uma conformação desenovelada com os resíduos de cisteínas na forma reduzida (tiól – Cys-SH).

Após emergirem no espaço intermembrana, os precursores são reconhecidos pela oxidoredutase Mia40 (*mitochondrial IMS import and assembly*) (CHACINSKA et al., 2004; FISCHER; RIEMER 2013; SCHMIDT et al., 2010). Nesta etapa, o ânion tiolato (Cys-S⁻) de um dos resíduos de cisteína da proteína precursora faz um ataque nucleofílico na ligação dissulfeto de Mia40, originando uma ligação dissulfeto intermolecular mista entre a proteína precursora e Mia40 (BIEN et al., 2010; MESECKE et al., 2005). A formação dessa ligação dissulfeto garante o aprisionamento das proteínas no espaço intermembrana, evitando assim o retorno (*backslidin*) para o citoplasma (BANCI et al., 2010; BRAGOSZEWSKI et al., 2015; FISCHER; RIEMER, 2013).

A interação entre Mia40 e a proteína precursora é desfeita através da formação de ligações dissulfetos intramoleculares na molécula precursora. Desta forma, Mia40 é liberada na sua forma reduzida enquanto o precursor é oxidado para sua forma oxidada e totalmente processada (BIEN et al., 2010; CHACINSKA et al., 2004; FISCHER; RIEMER, 2013; GRUMBT et al., 2007; MESECKE et al., 2008; MILENKOVIC et al., 2007; SIDERIS; TOKATLIDIS, 2007; TERZIYSKA et al., 2009).

Para que o mecanismo de importação continue em funcionamento as moléculas reduzidas de Mia40 precisam ser recicladas para sua forma oxidada. A oxidação de Mia40 é catalisada por uma segunda proteína denominada Erv1 (*essential for respiration and viability 1*) (BIEN et al., 2010). Erv1 pertence ao grupo das flavoproteínas e, portanto, possui um domínio de ligação a FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e um motivo CxxC altamente conservado. O motivo CxxC encontra-se próximo ao FAD o que permite a transferência de elétrons do motivo CxxC reduzido para o cofator FAD (COPPOCK; THORPE, 2005; FASS, 2008).

A oxidação de Mia40 ocorre através da transferência de seus elétrons para o motivo CxxC de Erv1 oxidado (BIEN et al., 2010). O motivo CxxC de Erv1 é então re-oxidado pelo cofator FAD. A partir de FAD os elétrons que foram incialmente removidos das proteínas substratos possuem dois possíveis destinos: eles podem ser transferidos diretamente para o oxigênio molecular produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou serem lançados na cadeia respiratória através da molécula de citocromo *c* (BIEN et al., 2010; BIHLMAIER et al., 2007; KOEHLER; TIENSON, 2009).

Tem sido postulado que a transferência de elétrons de Erv1 diretamente para o oxigênio molecular pode gerar quantidades significativas de H_2O_2 no espaço intermembrana mitocondrial (KOEHLER; TIENSON, 2009).

1.3 A produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria

O termo "espécies reativas de oxigênio" (EROs) é utilizado na descrição de um coletivo de espécies químicas (com propriedades distintas) formadas pela redução incompleta do oxigênio molecular (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007). Portanto, sempre que possível é melhor a descrição individual de cada EROs em um dado sistema enzimático ou celular (WINTERBOURN, 2008; FORMAN et al., 2015).

A redução mono-eletrônica do O_2 produz o radical ânion superóxido (O_2^{-}) , uma molécula com um tempo de meia-vida curto, que pode ser rapidamente convertido em H₂O₂ por uma reação de dismutação entre duas moléculas de O_2^{-} , gerando uma molécula de H₂O₂ e outra de oxigênio molecular. A reação de dismutação pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisada enzimaticamente pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H₂O₂ é relativamente estável com um tempo de meia-vida de aproximadamente 1ms em sistemas celulares. Entretanto, na presença de metais de transição reduzidos tais como Fe²⁺ e Cu⁺, o H₂O₂ é parcialmente reduzido, originando o radical hidroxil (OH). Este é considerado um dos mais potentes oxidantes, reagindo indiscriminadamente com diversas moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007).

Em condições fisiológicas, as EROs são produzidas em uma ampla variedade de processos biológicos, sendo a mitocôndria considerada a principal geradora dessas espécies e o O_2^{-} o precursor da maioria das EROs (ADAM-VISI; CHINOPOULOS, 2006; BALABAN et al., 2005; BRAND, 2010; FIGUEIRA et al., 2013; HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; KOWALTOWSKI et al., 2009; MURPHY, 2009) (Figura 10).

Dentro da cadeia respiratória, os principais centros geradores de O_2^{--} são os sítios de ligação da ubiquinona dos complexos respiratórios I e III e os grupos prostéticos flavina do complexo I (BLEIER et al., 2015; BRAND, 2010; DRÖSE et al., 2014; KOOPMAN et al., 2010; KOWALTOWSKI et al., 2009; SUN; TRUMPOWER, 2003; TURRENS, 2003). *Saccharomyces cerevisiae* não possui o complexo respiratório I. No entanto, suas NADH desidrogenases externas (Nde1 e Nde2) e interna (Ndi1) também estão envolvidas na geração de O_2^{--} (FANG; BEATTIE, 2003; GOMES, et al., 2012).

A geração do O_2^{-} no interior da mitocôndria parece ser um processo regulado, e as EROs mitocondriais (mtEROs) podem desempenhar funções benéficas e maléficas (FIGUEIRA et al., 2013). Assim, o H_2O_2 pode atuar como uma molécula sinalizadora, modulando direta ou indiretamente a atividade de proteínas através da oxidação de resíduos de cisteínas específicos (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; HAMANAKA; CHANDEL,



2010; HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; MURPHY et al., 2011; MURPHY, 2012; NETTO; ANTUNES, 2016; RHEE et al., 2005; RIEMER et al., 2015; VEAL., et al., 2007).

Figura 10. Representação esquemática dos principais sítios geradores do radical ânion superóxido da cadeia respiratória de *Saccharomyces cerevisiae*. As pontas das setas pretas indicam o fluxo de elétrons através dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. As setas vermelhas indicam a geração do O_2^- . Os principais sítios de geração do O_2^- são o sítio de ligação da ubiquinona do complexo III e as enzimas contendo flávina NADH desidrogenases Nde1/2 e Ndi1. O O_2^- é rapidamente dismutado (reação 1) a H₂O₂ e oxigênio molecular. Na presença de metais de transição reduzidos, tais como o Fe²⁺, o H₂O₂ é parcialmente reduzido (reação 2 - também conhecida como reação de Fenton) originando o OH. O H₂O₂ tem a propriedade de se difundir através das membranas mitocondriais (não demonstrado) devido à ausência de cargas. Além disso, ele pode facilmente se difundir através dos canais de porina presentes na membrana mitocondrial externa (reação 3). NDE1/2 – NADH desidrogenase externa 1/2, NDI1 – NADH desidrogenase interna 1, II – complexo respiratório II, III – complexo respiratório III, IV – complexo respiratório IV, Q – coenzima Q, *cytc* – citocromo *c*. FONTE: Adaptado de Herrero et al. (2008).

Por outro lado, a produção excessiva de mtEROs gera danos em biomoléculas e isto tem sido relacionado com o desenvolvimento e progressão de uma série de doenças, incluindo o câncer, diabetes, doenças inflamatórias e doenças neuro-degenerativas (HAMANAKA; CHANDEL, 2010; ITOH et al., 2013; KOWALTOWSKI et al., 2009; LARSSON, 2010; MARTIN, 2010; MISHRA; CHAN, 2014). Dessa forma, os níveis de EROs mitocondriais

precisam ser estritamente controlados de forma a garantir o funcionamento adequado da mitocôndria (MARÍ et al., 2013).

1.4 Sistemas antioxidantes na mitocôndria de Saccharomyces cerevisiae

Para controlar os níveis de EROs e manter a funcionalidade adequada, a mitocôndria contem uma série de sistemas enzimáticos que atuam diretamente na eliminação dessas espécies.

1.4.1 Superóxidos Dismutases (SODs)

As enzimas superóxido dismutases (SODs) convertem o O_2^- em oxigênio molecular e H_2O_2 , o qual pode posteriormente ser reduzido a água pela ação das catalases e peroxidases (discutido posteriormente). A atividade catalítica das SODs requer a participação de um metal (FRIDOVICH, 1995). As células de *Saccharomyces cerevisiae* expressam duas SODs: uma citosólica dependente de cobre e zinco, conhecida como Sod1, e uma mitocondrial dependente de manganês, denominada Sod2 (CULOTTA et al., 2006).

A enzima Sod2 localizada na matriz mitocondrial, desempenha um papel central na detoxificação do O_2^{-} gerado pela cadeia respiratória mitocondrial. De fato, o mutante nulo $\Delta SOD2$ apresenta um severo defeito de crescimento sob condições respiratórias (GUIDOT et al., 1993; van LOON et al., 1986). Apesar de Sod1 ter sido classicamente descrita como uma enzima citosólica, Sturtz et al. (2001) demonstraram que uma pequena fração da enzima também se localiza no espaço intermembrana mitocondrial, desempenhando um importante papel na proteção contra os danos oxidativos nesse compartimento.

1.4.2 O sistema glutationa mitocondrial

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo contendo tiol e que está presente em elevadas concentrações na maioria dos organismos (MEISTER; ANDERSON, 1983). Muitas funções têm sido propostas para a GSH em uma variedade de processos celulares incluindo transporte de aminoácidos, síntese de ácidos nucléicos e proteínas, síntese de grupos ferro-enxofre e detoxificação de agentes xenobióticos e carcinogênicos (JAMIESON et al., 1998; MORANO et al., 2012; PENNINCKX et al., 1993; TOLEDANO et al., 2013). Cabe destacar o envolvimento de GSH no metabolismo das EROs, desempenhando uma importante função na manutenção do estado de oxido-redução dos grupos sulfidrilas (-SH) proteicos (CARMEL-
HAREL; STORZ, 2000; DEPONTE, 2013; GRANT et al., 1996) que está diretamente relacionado a este trabalho.

Em *Saccharomyces cerevisiae* e na maioria dos eucariontes, GSH é sintetizada unicamente no citoplasma através da ação sequencial das enzimas Gsh1 (*Y-glutamylcysteine synthetase*) e Gsh2 (*glutathione synthase*) (GRANT et al., 1997; OHTAKE; YABUCHI, 1991). Após sua síntese, GSH é distribuída para vários compartimentos celulares, incluindo núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria (TOLEDANO et al., 2013).

GSH é um componente essencial para a levedura. Células que não possuem GSH (obtidas através da deleção do gene *GSH1*) são inviáveis, porém são capazes de crescer devido à adição exógena de GSH ao meio de cultivo (GRANT et al., 1996; STEPHEN; JAMIESON, 1996). A natureza essencial de GSH parece estar relacionada com a sua função na maturação dos grupos ferro-enxofre que são sintetizados na matriz mitocondrial e atuam como co-fatores de enzimas essenciais da célula de levedura (KUMAR et al., 2011; SIPOS et al., 2002; TOLEDANO et al., 2013).

O papel de GSH no metabolismo das EROs está centrado no grupo sulfidrila (-SH) do seu resíduo de cisteína que, por exemplo, fornece elétrons para a redução de ligações dissulfeto de proteínas antioxidantes, como as enzimas glutationa peroxidases e posteriormente) glutarredoxinas (discutidas (CARMEL-HAREL; STORZ. 2000: FRIDOVICH, 1989). Ao realizar essas funções, a GSH se oxida em GSSG. A redução de GSSG é catalisada por uma flavo-enzima denominada glutationa redutase (Glr1) que recebe seus elétrons do NADPH (DEPONTE, 2013; OUTTEN; CULOTTA, 2004). GSH também reduz dissulfetos e ácidos sulfenicos (entre outras formas) que foram gerados em decorrência da ação das EROs. A reação de GSH com um dissulfeto protéico gera um dissulfeto misto entre uma molécula de GSH e a proteína, o que poderia proteger o grupo tiól protéico de posteriores oxidações (SHELTON et al., 2005).

Apenas GSH é transportada para o interior da mitocôndria, sendo GSSG incapaz de sair desse compartimento (GRIFFITH; MEISTER, 1985; OLAFSDOTTIR; REED, 1998). Outten e Culotta (2004) demonstraram que a enzima glutationa redutase Glr1, além de estar no citoplasma, também se localiza na matriz mitocondrial e atua na redução da GSSG desse compartimento. A geração da isoforma mitocondrial a partir do único gene *GLR1* é feita através da utilização de um sítio de início de tradução alternativo, gerando assim uma sequência de endereçamento mitocondrial (OUTTEN; CULOTTA, 2004).

Atualmente, há controvérsias com relação às metodologias empregadas no cálculo dos valores dos potencias de oxido-redução do par redox GSH/GSSG presente nos diferentes

compartimentos celulares. No entanto, há um consenso de que a maior parte do *pool* de glutationa do citoplasma encontra-se no estado reduzido. Valores de potencial de óxido-redução do estado estacionário (E) que variam de $E_{GSH} = -286$ mV a $E_{GSH} = -320$ mV foram reportados através do emprego de sondas redox, construídas a partir da fusão de proteínas do metabolismo redox com GFP (BRAUN et al., 2010; HU et al., 2008; KOJER et al., 2012; MORGAN et al., 2011; OSTERGAARD et al., 2004).

Kojer et al. (2012) demonstraram que o *pool* de glutationa do citoplasma e espaço intermembrana estão cineticamente conectados, apresentando valores de potencial de óxido-redução de $E_{GSH} = -306$ mV e $E_{GSH} = -301$ mV, respectivamente. Segundo os autores, canais de porinas presentes na membrana mitocondrial externa asseguram o rápido equilíbrio do *pool* de glutationa entre os dois compartimentos.

A maioria da glutationa presente na matriz mitocondrial também se encontra na forma reduzida. No entanto, o *pool* de glutationa da matriz é regulado de maneira totalmente independente do citoplasma e espaço intermembrana (KOJER et al., 2012; KOJER; RIEMER, 2014; RIEMER et al., 2015). Kojer et al. (2012) reportaram um valor de potencial de óxido-redução de E_{GSH} = -301 mV para o *pool* da matriz mitocondrial.

1.4.3 Sistema glutarredoxina mitocondrial

As glutarredoxinas (GRXs) são proteínas que atuam na redução de dissulfetos proteicos ou dissulfetos mistos formados entre glutationa e proteína. A reação é dependente de resíduos de cisteínas altamente conservados presentes no interior do sítio ativo das GRXs (FERNANDES; HOLMGREN, 2004; HERRERO et al., 2008; HOLMGREN, 1989; TOLEDANO et al., 2007). A atividade oxido-redutase das GRXs é suportada pelo sistema glutationa (discutido acima).

Durante o ciclo catalítico, as GRXs reduzem as ligações dissulfetos utilizando elétrons de seus resíduos de cisteínas. A GRX oxidada é então reduzida pela GSH que por sua vez foi reduzida pelo NADPH em uma reação catalisada pela glutationa redutase Glr1 (DISCOLA et al., 2009; HERRERO et al., 2008; HOLMGREN, 1989) (Figura 11).

GRXs podem catalisar reações através de dois mecanismos. No mecanismo monotiólico, apenas um resíduo de cisteína no sítio ativo participa da catalise. Já no mecanismo ditiólico, dois resíduos de cisteínas do sítio ativo de Grx são necessários. Reações de redução de dissulfetos mistos entre glutationa e proteínas se processam pelo mecanismo

monotiólico de Grxs, enquanto reações de redução de ligações dissulfeto em proteínas se processam pelo mecanismo ditiólico (FERNANDES; HOLMGREN, 2004).



Figura 11. Representação esquemática dos sistemas tiorredoxina e glutarredoxina. Em ambos os sistemas, a fonte inicial do poder redutor é fornecido pela molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). As flavo-enzimas tiorredoxina redutase (Trr) e glutationa redutase (Glr) inicialmente reduzidas pelo NADPH catalisam a redução de tiorredoxina (Trx) e glutationa (GSH), respectivamente. Um dos principais substratos da tiorredoxina são as peroxirredoxinas. As Prxs reduzem uma ampla variedade de peróxidos incluindo o H_2O_2 . Por outro lado, as glutarredoxinas são reduzidas pela glutationa, pois possuem sítios de ligação para esta molécula. As Grxs são capazes de reduzir ligações dissulfetos em proteínas RSSR e também dissulfetos mistos formados entre glutationa e proteínas. FONTE: Adaptado de Herrero et al. (2008).

Saccharomyces cerevisae possui cinco GRXs amplamente caracterizadas. As Grx1 e Grx2 atuam pelo mecanismo ditiólico e estão localizadas no citoplasma (FERNANDES; HOLMGREN, 2004). Apesar de Grx1 e Grx2 compartilharem 64% de identidade na sequencia de aminoácidos, a atividade específica de Grx2 é 15 vezes maior do que a de Grx1 (DISCOLA et al., 2009). Semelhante ao que ocorre com Glr1, Grx2 apresenta dupla localização entre o citoplasma e a mitocôndria (PORRAS et al., 2006). Ambas as isoformas são produzidas a partir do único gene *GRX2*. A isoforma mitocondrial é gerada através de um códon de tradução alternativo que permite a síntese de uma sequencia de endereçamento

mitocondrial (PORRAS et al., 2006; PORRAS et al., 2010). Na mitocôndria, Grx2 possui dupla localização. Uma parte é encontrada na matriz mitocondrial de forma solúvel e a outra na porção externa da membrana mitocondrial externa (PORRAS et al., 2006).

Recentemente, Kojer et al. (2015) demonstraram que a isoforma citosólica de Grx2 desprovida da sequência de endereçamento mitocondrial também está presente em pequenas quantidades no espaço intermembrana. Os autores demonstraram que Grx2 desempenha um importante papel na formação das ligações dissulfeto das proteínas substratos da via de importação acoplada a processo oxidativo (discutido no item 1.2.3).

Grx3 e Grx4 são enzimas monotiólicas localizadas no núcleo (MOLINA et al., 2004). Ambas atuam na regulação da localização nuclear do fator de transcrição Aft1, responsável pela ativação de genes envolvidos no metabolismo do ferro (OJEDA et al., 2006; PUJOL-CARRIÓN et al., 2006).

Grx5 é uma enzima monotiólica localizada na matriz mitocondrial que possui um papel central nos estágios finais da biogênese dos grupos ferro-enxofre (MÜHLENHOFF et al., 2003; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, et al., 2002). A ausência desta enzima desencadeia um acumulo de ferro na mitocôndria e uma diminuição nas atividades de enzimas que contém grupamentos ferro-enxofre (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2002).

1.4.4 Sistema tiorredoxina mitocondrial

As tiorredoxinas (Trxs) são tiól-dissulfeto oxido-redutases de baixo peso molecular (12-13kDa) que reduzem ligações dissulfetos em proteínas como enzimas e fatores de transcrição. De forma semelhante às GRXs, a atividade oxido-redutase das TRXs é baseada em resíduos de cisteínas altamente conservados presentes no sítio ativo das enzimas (HERRERO et al., 2008; HOLMGREN, 1989; RIETSCH; BECKWITH, 1998; TOLEDANO et al., 2007). Diferentemente das Grx, as Trxs não apresentam sítios de ligação a GSH (NETTO et al., 2016).

Algumas enzimas foram descritas como substratos das TRXs, incluindo a ribonucleotídeo redutase (RNR) (necessária para a síntese de dNTP, componentes do DNA), a 3'-fosfoadenosina 5'fosfosulfato redutase (PAPS, necessária para a assimilação de enxofre), as tiorredoxinas peroxidases ou peroxirredoxinas (discutidas posteriormente) e fatores de transcrição como NF-kB (CAMIER et al., 2007; KOC et al., 2006; MULLER, 1991; QIN te al., 1995).

Durante o ciclo catalítico, as Trxs reduzem ligações dissulfeto de proteínas alvo, utilizando elétrons de seus resíduos de cisteínas. A Trx oxidada é então reduzida por uma flavo-enzima conhecida como tiorredoxina redutase (Trr). Esta possui uma função semelhante à glutationa redutase, no qual sua atividade é suportada por elétrons fornecidos pelo NADPH. Porém, ao contrário de Glr que reduz a glutationa, Trr catalisa a redução de Trx (Figura 11).

Saccharomyces cerevisiae possui duas Trxs (Trx1 e Trx2) e uma Trr (Trr1) citosólicas (GAN, 1991). Nosso grupo estudou o sistema tiorredoxina citosólico e mostrou que Trr1 é muito especifica para a redução de Trxs de levedura em relação à Trxs humanas e bacterianas (Oliveira et al., 2010). Em adição, a levedura *S. cerevisiae* possui um sistema tiorredoxina mitocondrial completo, composto pela tiorredoxina Trx3 e pela tiorredoxina redutase Trr2 (PEDRAJAS et al., 1999). O sistema Trx mitocondrial parece atuar preferencialmente na proteção contra o estresse oxidativo gerado em decorrência da produção de EROs mitocondriais já que, até o momento, o único alvo identificado é a Prx1, uma Prx mitocondrial que é alvo do presente estudo. No entanto, Trr2 parece apresentar uma função antioxidante independente de Trx3, uma vez que o mutante nulo $\Delta TTR2$ é extremamente sensível ao estresse oxidativo quando comparado com o mutante $\Delta TRX3$ que não apresenta nenhuma sensibilidade (PEDRAJAS et al., 2000; TROTTER; GRANT, 2005).

Um estudo do proteoma do espaço intermembrana da mitocôndria de levedura demonstrou que as enzimas Trr1 e Trx1 também se localizam nesse compartimento, além de estarem presentes no citosol. No entanto, não foi demonstrado o mecanismo molecular de importação nem o papel que essas proteínas desempenham no equilíbrio redox da mitocôndria (VÖGTLE et al., 2012).

1.4.5 Peroxidases mitocondriais

As peroxidases compreendem um diverso grupo de enzimas capazes de reduzir peróxidos orgânicos e inorgânicos utilizando-se de resíduos de cisteína reativos ("*Cys-based peroxidases*") ou grupos heme ("*heme-based peroxidases*").

No espaço intermembrana da mitocôndria da levedura existe uma peroxidase com atividade baseada em grupo heme que catalisa a redução do H₂O₂, conhecida como citocromo *c* peroxidase (Ccp1). Ccp1 é reduzida por elétrons derivados do ferro presente na molécula de citocromo *c*, um dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Recentemente, Ccp1 foi demonstrada ser um componente essencial para o crescimento de uma linhagem que não possui 8 peroxidases ($\Delta 8 \ strain - deleção das 5 \ peroxiredoxinas e 3 \ gluationa \ peroxidases,$ descritas posteriormente) (KAYA et al., 2015). Linhagens $\Delta 8$ apresentaram aneuploidia do cromossomo XI e a consequente superexpressão do gene *CCP1*, presente neste cromossomo, parece ser um fator compensatório importante. A superexpressão de Ccp1 aliviou o estresse oxidativo causado pela deficiência das 8 peroxidases, suportando o crescimento da linhagem $\Delta 8$. Esses resultados também sugerem um papel central da mitocôndria na manutenção da homeostase redox celular.

No caso das peroxidases com atividade baseada em resíduos de cisteína, o substrato redutor é em geral um tiól como GSH ou Trx. Com base no substrato redutor, essas peroxidases são divididas em duas famílias: glutationa peroxidases, que utilizam principalmente a glutationa, e tiorredoxina peroxidases (também conhecidas como peroxirredoxinas) que utilizam principalmente Trx como redutores (FLOHÉ et al., 2011; HERRERO et al., 2008).

As enzimas glutationa peroxidases (GPXs) reduzem o H_2O_2 e outros hidroperóxidos orgânicos, tais como hidroperóxidos de ácidos graxos, utilizando o poder redutor fornecido pela molécula de glutationa (HERBETTE et al., 2007; MARGIS et al., 2008; MORANO et al., 2012). Existem duas principais classes de enzimas GPX: GPX clássicas e fosfolipídeo hidroperóxido GPX (PHGPX - *phospholipid hydroperoxide GPXs*).

As GPX clássicas são tetraméricas, solúveis e atuam na redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos. Por outro lado, as PHGPXs são geralmente monoméricas e encontram-se aderidas às membranas celulares. Além de hidroperóxidos solúveis, elas reduzem hidroperóxidos de lipídeos derivados da peroxidação lipídica (HERRERO et al., 2008; ROVERI et al., 1994).

As GPXs foram classicamente descritas em humanos, no qual o seu mecanismo catalítico envolve ciclos de oxidação-redução do grupo tiol presente no sítio ativo (FLOHÉ et al., 1973). No entanto, para a maioria das GPXs humanas (Gpx1, Gpx2, Gpx3 e Gpx4) o grupo tiol é substituído por um aminoácido incomum, a selenocisteína. Após a redução do hidroperóxido, a selenocisteína oxidada é reduzida pela molécula de GSH (HERBETTE et al., 2007; VEAL et al., 2007).

Estudos iniciais indicaram que a levedura expressa três GPXs, denominadas Gpx1, Gpx2 e Gpx3 (INOUE et al., 1999). Posteriormente, foi demonstrado que as três enzimas são da classe PHGPXs, apresentando atividades contra hidroperóxidos solúveis e lipídicos (AVERY; AVERY, 2001). Nenhuma das três PHGPXs tem selenocisteína e a atividade peroxidásica está baseada em resíduos de Cys. Curiosamente, ao contrário das GPXs humanas que são reduzidas por glutationa, as enzimas de levedura são preferencialmente reduzidas por tiorredoxina (DELAUNAY et al., 2002; MORANO et al., 2012; OHDATE et al., 2010; TANAKA et al., 2005).

Com relação à localização sub-celular, as três enzimas GPXs estão presentes no citoplasma aparentemente atuando na proteção contra a peroxidação lipídica e resistência contra metais pesados (AVERY; AVERY, 2001; AVERY et al., 2004; BASU et al., 2004; INOUE et al., 1999). Gpx3 também possui um importante papel atuando como um sensor e transdutor da resposta ao estresse oxidativo mediada pelo fator de transcrição Yap1 (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; DELAUNAY et al., 2002).

Ukai et al. (2011) demonstraram que Gpx2 apresenta dupla localização, sendo encontrada no citoplasma e na mitocôndria. Na mitocôndria a enzima encontra-se associada com a membrana externa (com face voltada para o citoplasma) e interna (com face voltada para a matriz).

De maneira semelhante, Vögtle et al. (2012) demonstraram através de um estudo proteômico que Gpx3 também se localiza no espaço intermembrana. No entanto, o papel dessa peroxidase nesse compartimento ainda não foi avaliado.

Outro grupo de peroxidases com atividade baseada em cisteína, as peroxirredoxinas (Prxs), catalisam a redução de diversas moléculas de peróxido, incluindo H₂O₂, peroxinitrito (OONO⁻) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) (NELSON et al., 2011). As Prxs são enzimas muito abundantes e possuem elevada eficiência catalítica apresentando constantes de velocidade de segunda ordem que variam entre 10^6 a 10^8 M⁻¹ s⁻¹ (OGUSUCU et al., 2007; PARSONAGE et al., 2005; PESKIN et al., 2007; TOLEDO et al., 2011; TRUJILLO et al., 2007). Além da abrangência de substratos, as Prxs estão presentes em diversos compartimentos celulares como mitocôndria, núcleo, retículo endoplasmático e citosol (PARK et al., 2000; RHEE et al., 2012). Tais propriedades indicam que as Prxs desempenham um importante papel na proteção das células contra os danos oxidativos gerados pelas EROs (SENA; CHANDEL, 2012).

Todas as peroxirredoxinas conhecidas possuem um resíduo de cisteína altamente conservado presente no sítio ativo da enzima. Este resíduo, denominado cisteína peroxidásica (C_P), reage diretamente com o substrato peróxido durante a catálise enzimática (CHAE et al., 1994a; CHOI et al., 1998; FLOHÉ et al., 2011; HALL et al., 2011; KIM et al., 1988; NELSON et al., 2011; RHEE; WOO, 2011).

No início do ciclo catalítico o resíduo de cisteína peroxidásica (C_P) encontra-se na forma desprotonada (RS^-), denominado tiolato. A catálise inicia-se com o ataque nucleofílico do tiolato da C_P à molécula de peróxido liberando o álcool correspondente (água no caso do

 H_2O_2), enquanto que a C_P torna-se oxidada para a forma de ácido sulfênico (C_P -SOH) (FLOHÉ et al., 2011; HALL et al., 2011) (Figura 12).



Figura 12. Representação esquemática do ciclo catalítico da peroxirredoxina Tsa1, um representante do grupo das 2-Cys-Prxs. A unidade catalítica da enzima é um homodímero organizado de forma anti-paralela. Cada monômero possui dois resíduos de cisteínas altamente conservados, denominados cisteína peroxidásica $S_{(P)}$ e cisteína de resolução $S_{(R)}$. No início do ciclo catalítico, a forma desprotonada do resíduo de cisteína peroxidásica $S_{(P)}^-$ de um dos monômeros reduz o H₂O₂ liberando uma molécula de água. Durante a reação, S⁻ é oxidada para forma de ácido sulfênico (Cys-SOH). O resíduo de cisteína de resolução $S_{(R)}$ do segundo monômero reage com o ácido sulfênico gerando uma ligação dissulfeto inter molecular entre os dois resíduos de cisteínas. A ligação dissulfeto é posteriormente reduzida pela proteína tiorredoxina 1 (Trx1). O ácido sulfênico também pode reagir com uma segunda molécula de peróxido originando o ácido sulfínico (SO₂H). Esta representa a forma superoxidada da enzima. O ácido sulfínico pode ser reduzido pela proteína sulferredoxina (Srx) em uma reação dependente de ATP ou ainda reagir com outra molécula de peróxido originando o acido sulfônico e assim, inativando completamente a enzima. FONTE: Adaptado de D'Autréaux e Toledano (2007).

O ácido sulfênico gerado é posteriormente reduzido e o mecanismo pelo qual isso ocorre diferencia as Prxs em dois grupos (NETTO et al., 2007; WOOD et al., 2003a, WOOD et al., 2003b). No grupo das 2-Cys-Prxs um segundo resíduo de cisteína presente na própria molécula de Prx, denominado cisteína de resolução (C_R), reage com o ácido sulfênico da C_P liberando uma molécula de água e originando uma ligação dissulfeto entre os dois resíduos de cisteínas (CHAE et al., 1994a; CHAE et al., 1994b; HALL et al., 2011; NETTO et al., 2007) (Figura 12). Já no grupo das 1-Cys-Prx uma segunda proteína ou até mesmo uma molécula de

baixo peso molecular é quem reage com o ácido sulfênico da C_P. Isto é decorrente do fato das 1-Cys-Prx não possuírem a cisteína de resolução (NETTO et al., 2007) (Figura 13).

Para o grupo das 2-Cys-Prxs, o dissulfeto formado entre os resíduos de C_P e C_R é posteriormente reduzido na maior parte dos casos por Trx. Fazendo isto, a Trx torna-se oxidada enquanto a Prx é reciclada para sua forma reduzida, podendo assim iniciar um novo ciclo catalítico (CHAE et al., 1994a) (Figura 12). O mecanismo de redução das 2-Cys-Prxs catalisado pela proteína Trx tem sido amplamente caracterizado (HALL et al., 2011; NETTO et al., 2007). Por outro lado, há grande discussão em relação ao mecanismo de redução das 1-Cys-Prx. A análise da literatura revela uma ampla variedade de mecanismos (ver texto a seguir para o caso de Prx1 de levedura).



Figura 13. Representação esquemática do ciclo catalítico da peroxirredoxina Prx1, um representante do grupo das 1-Cys-Prxs. Assim como Tsa1, a unidade catalítica básica da enzima é um homodímero organizado de forma anti-paralela. As enzimas do grupo 1-Cys-Prxs não possuem o resíduo de cisteína de resolução. Desta forma, o ácido sulfênico gerado após a reação da S⁻ (P) com o peróxido precisa ser diretamente reduzido através de um composto contendo um grupo tiol. Há grande discussão na literatura com relação à natureza do composto que reduz Prx1 de levedura (ver texto). Além de Trx3 e GSH que são compostos tiólicos, o ascorbato que não apresenta um grupo tiol têm sido apontados como possíveis redutores de Prx1. Em principio, Prx1 também poderia sofrer reação de superoxidação, porém os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo permanecem desconhecidos. FONTE: Adaptado de Wood et al. (2003b).

1.5 Prx1 de Saccharomyces cerevisiae

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui cinco peroxirredoxinas (Tsa1, Tsa2, Dot5, Ahp1 e Prx1) localizadas em diferentes compartimentos celulares (HERRERO et al., 2008; PARK et al., 2000; TOLEDANO et al., 2013). As enzimas Tsa1, Tsa2 e Ahp1 são citoplasmáticas e Dot5 é nuclear.

Prx1, alvo de estudo do presente trabalho, se localiza na mitocôndria e parece desempenhar importante papel na redução do H_2O_2 gerado no interior dessa organela (PEDRAJAS et al., 2000). Dentre as cinco Prxs de levedura ela é a única do grupo das 1-Cys-Prxs e, conforme salientado acima, o mecanismo envolvido na redução do ácido sulfênico, e consequente regeneração da enzima, permanece pouco entendido.

Segue-se a descrição dos mecanismos que atuam na redução de Prx1, propostos no decorrer dos anos, apresentando contradições entre si. Inicialmente, foi demonstrado que o sistema Trx mitocondrial pode reduzir Prx1 (PEDRAJAS et al., 2000). Neste caso, o ácido sulfênico de Prx1 é reduzido diretamente pela proteína Trx3. Trx3 por sua vez é reduzida pela Trr2 ao qual foi inicialmente reduzida pelo NADPH (Figura 11).

Posteriormente, Greetham e Grant (2009) demonstraram que o ácido sulfênico de Prx1 pode também reagir com a glutationa (glutationilação), originando um dissulfeto misto Prx1-GSH. Após a etapa de gluationilação, o dissulfeto misto seria reduzido pela enzima Trr2 formando um intermediário misto Prx1-Trr2. O intermediário seria posteriormente reduzido por uma segunda molécula de glutationa, levando a regeneração da enzima. Portanto, nesse modelo, Trx3 não desempenha nenhum papel no mecanismo de redução de Prx1.

O modelo apresentado acima foi contestado por Pedrajas et al. (2010) que salientaram que Trr2 não possui um motivo de ligação a glutationa. Neste segundo trabalho, os autores confirmaram que o ácido sulfenico de Prx1 inicialmente reage com a gluationa. No entanto, posteriormente, o dissulfeto misto de Prx1-GSH seria reduzido pela isoforma mitocondrial de Grx2 e não por Trr2. Nesse novo modelo, Grx2 suportaria a atividade catalítica de Prx1 em um sistema contendo NADPH, GSH e Glr1 (PEDRAJAS et al., 2010).

O modelo de Pedrajas et al. (2010) não exclui a possibilidade de que o sistema Trr2 e Tx3 também atue na redução de Prx1. Os autores demonstraram que as proteínas Trr2 e Trx3 funcionam melhor em pH próximo de 7. Por outro lado, o sistema GSH e Grx2 possui uma maior atividade em pH próximo de 8. Nesse contexto, o sistema GSH e Grx2 poderia operar em condições respiratórias (no qual o pH da matriz mitocondrial estaria mais alcalino em

decorrência da geração do potencial de membrana) enquanto o sistema Trx3 e Trr2 atuaria e condições fermentativas (PEDRAJAS et al., 2010).

Recentemente, Pedrajas et al. (2016) apresentaram novos mecanismos envolvidos na redução de Prx1, sem contextualizar com o modelo proposto anteriormente pelos próprios autores (PREDAJAS et al., 2010). Após Prx1 catalisar a redução do peróxido, o ácido sulfênico formado poderia ser reduzido de duas maneiras (Figura 14). Em uma delas, ele reagiria com a glutationa formando um dissulfeto misto Prx1-GSH, conforme anteriormente reportado (GREETHAM; GRANT, 2009; PEDRAJAS et al., 2010). A deglutationilação de Prx1 poderia ser então catalisada por Grx2 (PEDRAJAS et al., 2010) ou por Trx3 (PEDRAJAS et al., 2016). Os autores propõem que a etapa de deglutationilação de Prx1, catalisada por Trx3, ocorre através de um mecanismo ditiólico, com o envolvimento dos dois resíduos de cisteínas de Trx3.

O ácido sulfênico formado também poderia reagir com outra cisteína de Prx1 (Cys-91 catalítica), originando uma ligação dissulfeto intermolecular. Os autores propõem que a cisteína catalítica de um dos monômeros de um dímero de Prx1 forme uma ligação dissulfeto com outra cisteína catalítica de um monômero de um segundo dímero. As ligações dissulfetos poderiam ser formadas entre três dímeros de Prx1, originando uma estrutura hexamérica. Para os autores, as ligações dissulfetos seriam mais facilmente reduzidas por Trx3, do que o ácido sulfênico formado após a reação com o peróxido. Isto explicaria a atividade peroxidásica de Prx1 suportada pelo sistema Trr2 e Trx3 (PEDRAJAS et al., 2000), visto que o substrato preferível de Trx são ligações dissulfetos formadas nas Prxs. A formação das ligações dissulfetos poderia proteger a enzima de sofrer inativação através da superoxidação do ácido sulfênico para ácidos sulfínico e sulfônico (PEDRAJAS et al., 2016). Mais estudos são necessários para elucidar a catálise por Prx1 já que a Cp de 1-Cys Prx está bastante enterrada na cadeia polipeptídica (CHOI et al., 1998) e nunca foi reportada uma ligação dissulfeto desse tipo para essa classe de Prxs.

No decorrer dos trabalhos citados acima, Monteiro et al. (2007) propuseram que o composto não tiólico ascorbato (vitamina C) também é capaz de suportar a atividade peroxidásica de Prx1 *in vitro*. Este trabalho representou uma mudança de paradigma, demonstrando pela primeira vez a redução de uma peroxirredoxina através de um redutor não tiólico. *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza um composto semelhante ao ascorbato denominado eritroascorbato. A hipótese de que esse composto atua na redução de Prx1 *in vivo* ainda não foi avaliada (MONTEIRO et al., 2007). Entre outros aspectos, é necessário avaliar

os níveis de eritroascorbato em levedura em diferentes fases do ciclo de vida desse microorganismo.



Figura 14. Ciclo catalítico de Prx1 deduzido a partir dos dados apresentados no trabalho de Pedrajas et al. (2016). Cada monômero de Prx1 é representado pela letra P grande com a cisteína catalítica destacada nos diferentes estados de oxidação: forma sulfidrila reduzida SH, ácido sulfênico –SOH, ligação dissulfeto S–S e glutationilada –SSG. Cada etapa do ciclo catalítico é indicada com um número envolto em um círculo. As etapas com círculos destacados em cinza representam reações mais favoráveis de acontecerem sob condições fisiológicas, com a glutationa desempenhando um papel catalítico ou protetor durante a etapa de resolução do ácido sulfênico. O sistema Trx desempenharia um papel proeminente na etapa de reciclagem da enzima para sua forma reduzida. A reciclagem de Prx1 glutationilada catalisada por Trx3 ocorre pelo mecanismo ditiólico. Nesse mecanismo, Trx3 reduzida forma um dissulfeto misto com Prx1 ao qual é posteriormente resolvido pelo segundo resíduo de cisteína de Trx3. Trx3 oxidada é então reduzida por Trr2 através de elétrons fornecidos pelo NADPH.

Dada à profusão de mecanismos catalíticos propostos, uma caracterização cinética rigorosa faz-se necessária, além das determinações das concentrações dos possíveis redutores para melhor compreender as relevâncias de cada um deles.

Em relação ao padrão de expressão de Prx1, nosso grupo realizou uma caracterização detalhada sobre diferentes condições de crescimento (MONTEIRO et al., 2002, MONTEIRO et al., 2004). Na presença de uma fonte de carbono fermentável, tal como a glicose, a expressão de Prx1 é completamente inibida. O mecanismo pelo qual a glicose inibe a expressão de Prx1 é mediado pelos fatores de transcrição Msn2/Msn4, de uma maneira dependente das vias de sinalização compostas por RAS-cAMP-PKA e TOR quinase (MONTEIRO et al., 2002; MONTEIRO et al., 2004). Por outro lado, o crescimento sob uma fonte de carbono respiratória, como por exemplo, o etanol/glicerol, induz a expressão de Prx1. O mesmo ocorreu quando as células de levedura foram submetidas ao tratamento com H₂O₂, mesmo na presença de glicose como fonte de carbono (MONTEIRO et al., 2002; PEDRAJAS et al., 2000). Portanto, a indução por H₂O₂ sobrepõe-se a repressão por glicose. Estes resultados demonstram o envolvimento de Prx1 na proteção contra o estresse oxidativo, gerado através do metabolismo respiratório.

Conforme salientado acima, diversas proteínas envolvidas no metabolismo das EROs são direcionadas para os diferentes compartimentos da mitocôndria. No entanto, sabemos muito pouco sobre os mecanismos de importação dessas proteínas, bem como a regulação das suas atividades enzimáticas *in vivo*.

Especificamente, apesar dos estudos demonstrarem que Prx1, Trr2 e Trx3 são direcionadas para a mitocôndria (PEDRAJAS et al., 1999; PEDRAJAS et al., 2000), não existem informações sobre a localização dessas proteínas nos diferentes subcompartimentos mitocondriais. Para saber se, de fato, o sistema tiorredoxina mitocondrial está envolvido na redução de Prx1 *in vivo* é preciso determinar a localização e/ou o processamento dessas proteínas durante o processo de importação mitocondrial.

A localização celular de uma proteína fornece informações sobre o seu papel fisiológico *in vivo*. Há poucas informações sobre a função de Prx1 na manutenção da homeostase redox mitocondrial assim como na regulação de vias de sinalização redox.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização funcional de Prx1 na manutenção da atividade mitocondrial. Para isso, incialmente procurou-se determinar a localização submitocondrial de Prx1 assim como o seu mecanismo de importação mitocondrial. O mesmo foi feito para as enzimas Trx3 e Trr2, apontadas como possíveis redutores de Prx1 oxidada. Finalmente, o envolvimento de Prx1 na manutenção da homeostase redox mitocondrial foi avaliado através da deleção do gene *PRX1* em combinação com outras oxido-redutases mitocondriais.

A realização deste trabalho é justificada pelo fato de que a mitocôndria desempenha um papel central em diversos processos celulares e, portanto, a manutenção da atividade mitocondrial é fundamental para a homeostase celular. A disfunção mitocondrial tem sido relacionada com a progressão de diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas. Devido os danos oxidativos causados pelas EROs serem as principais causas da disfunção mitocondrial, é relevante aprofundar o conhecimento sobre o papel que as enzimas do metabolismo redox desempenham no controle dos níveis de EROs mitocondriais, assim como no estado de oxido-redução de compostos contendo grupos tiois.

Grandes avanços na compreensão da regulação do metabolismo das EROs foram adquiridos com a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. São diversas as vantagens de se utilizar *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo: baixo custo de cultivo, técnicas de manipulação genéticas amplamente padronizadas, (facilitando a construção de mutantes nulos), ciclo de vida curto com alternância de gerações (haplóide e diplóide) e genoma conhecido (GOFFEAU et al., 1996). Alia-se a essas características o fato da levedura ser um microrganismo aeróbico facultativo, bastando o seu metabolismo fermentativo para sobreviver (OHLMEIER et al., 2004). Desta forma, variando-se a fonte de carbono do meio de cultura entre não fermentável e fermentável é possível analisar e comparar células em processo respiratório ativo com células respirando menos e, consequentemente, sob uma menor produção de EROs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de Saccharomyces cerevisiae e Escherichia coli

Linhagem	Genótipo	Referência
BY4741	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
BY4741 <i>//PRX1</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
	PRX1::kanMX4	C
BY4741 <i>ΔTRR2</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
	TRR2::kanMX4	-
BY4741 <i>/ATRX3</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
	TRX3::kanMX4	
BY4741/20CT1	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
	OCT1::kanMX4	
BY4741 <i>ΔIMP1</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
	IMP1::kanMX4	
BY4741 <i>ΔIMP2</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Invitrogen
	IMP2::kanMX4	
BY4741/ <i>JTRR2/TRR2HA</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	TRR2::kanMX4; LEU2, TRR2HA	
BY4741 <i>/PRX1/PRX1WT</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	PRX1::kanMX4; LEU2, PRX1WT	
BY4741 <i>/PRX1/PRX1C38S</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	PRX1::kanMX4; LEU2, PRX1C38S	
BY4741 <i>/PRX1/PRX1C91S</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	PRX1::kanMX4; LEU2, PRX1C91S	
BY4741 <i>//PRX1/TEF1PRX16His</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	PRX1::kanMX4; LEU2, TEF1/PRX1-6His	
BY4741 <i>\DTRX3\DPRX1</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	TRX3::kanMX4; LEU2, PRX1	
BY4741 <i>\DTRR2\DPRX1</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	TRR2::kanMX4; LEU2, PRX1	
BY4741 <i>dOCT1dPRX1</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	OCT1::kanMX4; LEU2, PRX1	
BY4741 <i>△OCT1/OCT1WT</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	OCT1::kanMX4; HIS3, OCT1WT	
BY4741/PRX3	MATa; his3 \varDelta 1; leu2 \varDelta 0; met15 \varDelta 0; ura3 \varDelta 0; HIS3,	Este estudo
	PRX3	
BY4741 <i>AOCT1/PRX3</i>	MATa; his 3Δ 1; leu 2Δ 0; met 15Δ 0; ura 3Δ 0;	Este estudo
	OCT1::kanMX4; HIS3, PRX3	
BY4741 <i>AOCT1/PRX3/OCT1WT</i>	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0;	Este estudo
	OCT1::kanMX4; HIS3, PRX3; LEU2, OCT1	

(Duadro 1	- 1	Linhagens	de	S.	cerevisiae	utilizadas	neste	trabalho.
``	Juaul V I		unnazons	uv	$\boldsymbol{\nu}$		uuuuuuuuuuuu	neste	u avaino.

Linhagem	Genótipo	Referência
DH5a	[endA1, hsdR17 (rk- mk+), supE44, thi-1, recA1,	Novagen
	gyrA (Na 1r), relA1, Δ (lacZYA-argF)U169	
	$(m80lacZ\Delta M15)].$	
BL21(DE3)	[F, amp T, hsdSb(rB ⁻ mb ⁻), gal, dcm (DE3)	Novagen
XL1Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac	Agilent Technologies
	$[F' proAB \ lacIqZ\Delta M15Tn10]$	

Quadro 2 - Linhagens de E. coli utilizadas neste trabalho.

3.2 Meios de cultura dos microrganismos

Quadro 3 - Meios de cultura para o crescimento das células S. cerevisiae e E. coli utilizados neste trabalho.

Saccharomyces cerevisiae				
Tipo de meio	Composição			
YPD	1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose			
YPEG 1% extrato de levedura, 2% peptona, 3% glicerol e 2% etanol				
YPGal 1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% galactose				
YPL 1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% lactato (pH 5.5 ajustad				
	NaOH)			
Meio mínimo com	0,17% base nitrogenada, 0,5% sulfato de amônio, 2% glicose, suplementado,			
glicose (SD)	quando necessário, com os requerimentos auxotróficos: uracila 20 mg/L,			
histidina, metionina e leucina 10 mg/L				
Meio mínimo com 0,17% base nitrogenada, 0,5% sulfato de amônio, 2% galactose				
galactose (SGal) suplementado, quando necessário, com os requerimentos au				
	uracila 20 mg/L, histidina, metionina e leucina 10 mg/L			
Meio mínimo com	0,17% base nitrogenada, 0,5% sulfato de amônio, 3% glicerol, 2% etanol,			
glicerol e etanol (SEG)	suplementado, quando necessário, com os requerimentos auxotróficos:			
	uracila 20 mg/L, histidina, metionina e leucina 10 mg/L			
Escherichia coli				
Tipo de meio	Composição			
LB	0,5% extrato de levedura, 1% triptona e 1% NaCl			
ΤA	0,5% extrato de levedura, 1% triptona e 1% cloreto de sódio, suplementado			
LA	com 50 µg/mL de ampicilina			

Nota: Meios sólidos foram preparados através da adição de 2% de ágar bacteriológico.

3.3 Condições de cultivo dos microrganismos

As células de *S. cerevisiae* foram crescidas a 30 °C em incubadora operando sob constante agitação orbital a 180 rpm. Quando necessário, as células foram armazenadas em meio YPD líquido contendo 25% glicerol e estocadas a -80 °C.

As células de *E. coli* foram crescidas a 37 °C em incubadora operando sob constante agitação orbital a 200 rpm. Quando necessário, as células foram armazenadas em meio LB líquido contendo 8% glicerol e estocadas a -80 °C.

3.4 Métodos gerais para manipulação de DNA

As digestões enzimáticas das moléculas de DNA foram feitas com as enzimas de restrição obtidas do fornecedor *New England Biolabs*, conforme recomendações do fabricante.

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% com tampão TAE 1x. A purificação das moléculas de DNA do gel de agarose e/ou das reações de restrição foi feita utilizando o *Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme recomendações do fabricante.

A reação de ligação das moléculas de DNA foi feita a 4 °C por 16 horas em um volume final de reação de 20 μ L, contendo uma razão de 3:1 de fragmento/vetor, tampão da enzima 1x e 1U da enzima T4 ligase obtida do fornecedor Promega.

O isolamento dos plasmídeos das culturas bacterianas foi feito utilizando o *Kit QIAprep[®] Spin Miniprep* (Qiagen), conforme recomendações do fabricante. A concentração do DNA foi determinada pela absorbância em 260 nm em aparelho *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*.

As reações de amplificação de DNA (*polymerse chain reaction* - PCR) foram feitas em um volume final de 50 μ L, consistindo em: tampão 1x da *Taq* polimerase de alta fidelidade, 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTP *mix*, 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, cerca de 20 ng de DNA molde, 1 U da *Taq* polimerase de alta fidelidade (ThermoFicher Scientific) e H₂O ultrapura autoclavada para o volume final de 50 μ L. O programa de amplificação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação de 2 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação (30 seg a 94 °C), anelamento (30 seg a 55 °C) e extensão (68 °C com 1 min para cada 1 Kb do DNA amplificado). Para garantir a completa extensão do DNA sintetizado foi acrescentada uma etapa de extensão de 10 min a 68 °C ao final do programa.

As reações de mutagênese sítio-específica foram feitas utilizando o *Kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) conforme recomendações do fabricante.

As reações de sequenciamento de DNA foram feitas através do método de terminador marcado (*dye terminator*) utilizando ddNTPs marcados com fluoróforos e a DNA polimerase termoestável. A reação de sequenciamento foi feita em um volume final de reação de 10 μ L consistindo de: 200 ng do DNA plasmidial, 0,5 μ M do oligonucleotídeo iniciador, 1 μ L do *BigDye Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer* (Applied Biosystems), 2 μ L do *BigDye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems) e água

ultrapura autoclavada para o volume final de 10 µL. A reação de sequenciamento consistiu de um ciclo inicial de 96 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. O produto de sequenciamento foi purificado em resina *SephadexTM G-50 Fine* (GE Healthcare), utilizando microplacas de purificação *MultiScreen*[®]-*HV* (Millipore). Após a purificação, o material foi secado por 15 min a 95 °C e analisado no sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems) localizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (Instituto de Biociências IB – USP). As sequências de DNA foram salvas no formato *ab1*. E, foram analisadas e editadas por inspeção visual no módulo *Seqman* do programa *LaserGene v.7.1.0* (DNAStar, Inc.; EUA). Após a edição, as sequências foram salvas no formato *Fasta* e alinhadas com as sequências depositadas no banco de dados *Saccharomyces Genome DataBase* (SGD) (<u>http://www.yeastgenome.org</u>), utilizando o programa *Clustal W* (LARKIN et al., 2007).

3.5 Transformação Bacteriana

A transformação bacteriana foi feita através do método do choque elétrico (eletroporação) de células bacterianas previamente tornadas eletrocompetentes.

A eletroporação procedeu da seguinte maneira: Alíquotas de 50 μ L de células eletrocompetentes armazenadas a -80 °C foram descongeladas em banho de gelo seguido da adição do DNA plasmidial e/ou a reação de ligação. Após a leve homogeneização da mistura, essa foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um pulso elétrico de 2,5V em aparelho *Gene Pulser II Electroporation System* (Bio-Rad). Após a pulso de voltagem, as células foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio LB e incubadas a 37 °C por 1 h. Alíquotas de 100-200 μ L de células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados para a seleção das células transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C durante 16-24 horas.

3.6 Transformação de células de Saccharomyces cerevisiae

As células de *S. cerevisiae* foram transformadas através do método de acetato de lítio (SCHIESTL et al., 1989), com algumas modificações.

Células de uma cultura na fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 10 mL de uma cultura com O.D.₆₀₀ = 0,6-0,8) foram coletadas através de centrifugação a 2.000 x *g* (3.500 rpm em centrífuga Hitachi CR21E-rotor R20A), por 5 min, a 4 °C. As células foram ressuspensas em 1 mL de 100 mM acetato de lítio e transferidas para tubo de microcentrífuga

de 1,5 mL estéril. Após centrifugação a 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 15 seg, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células foram mantidas em banho de gelo durante o preparo da solução TRAFO mix. A solução TRAFO mix foi preparada em tubo separado de 1,5 mL através da adição de 240 µL de PEG 50% (PEG 3350 - Sigma Cat. No. 88276), 30 µL de 1 M acetato de lítio e 100 µL DNA carreador 2 mg/ml (Sperm Nuclei from Salmon - Sigma Cat. No. S3126), previamente aquecido por 5 min, a 95 °C, seguido de banho de gelo. A solução TRAFO mix foi agitada por 1 min em agitador Vortex-Genie (Scientific Industries) e adicionada sobre as células mantidas no gelo. As células foram ressuspensas na solução TRAFO mix através de leve homogeneização com auxilio da ponteira de 1000 µL. 200 µL da mistura foram aliquotados em tubos de 1,5 mL novos seguido da adição de ~1-2 µg do DNA plasmidial. Após leve homogeneização com auxílio da ponteira de 200 µL, a mistura foi incubada em banho-maria a 42 °C por 45 min. A amostra foi centrifugada a 3.000 x g (6.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 15 seg, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 1 mL de meio YPD 2% seguido de incubação por 3 h a 30 °C. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g (6.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 15 seg, em temperatura ambiente, e em seguida plaqueadas em meio sintético com glicose (SD) seletivo. Para plasmídeos epissomais e centroméricos, aos quais possuem uma elevada eficiência de transformação, apenas 50-100 µL das células incubadas por 3 h a 30 °C foram plaqueadas diretamente em meio seletivo. As placas foram incubadas por 3 dias a 30 °C e as colônias resultantes foram reinoculadas em meio liquido seletivo para a marca auxotrófica do plasmídeo.

3.7 Extração do DNA genômico de S. cerevisiae

O isolamento do DNA genômico de *S. cerevisiae* foi feito a partir de uma cultura celular crescida em 10 mL de meio YPD, a 30 °C, por um período de 16 h. As células foram coletadas através de centrifugação a 2.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Hitachi CR21E-rotor R20A), por 5 min, a 4 °C, lavadas com 1 mL de água ultrapura e transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Após centrifugação a 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 15 seg, a 25 °C, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas com 1 mL de 1% β-mercaptoetanol seguido de incubação por 10 min em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 30 seg, a 25 °C e as células foram

ressuspensas com 0,5 mL de solução 1 (1 M de sorbitol, 3,5 mM EDTA, 20 mM fosfato de potássio pH = 6,5 e 20 U de Zymoliase 20 T [from Arthrobacter luteus, 20.000 units.g⁻¹, MP Biomedicals]). Após incubação por 30 min a 37 °C, foram adicionados 0,3 mL de solução 2 (2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH = 8.0 e 1 mM EDTA). A mistura foi homogeneizada por inversão 5 vezes e incubada por 20 min a 65 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1), homogeneizado por inversão 5 vezes e centrifugado a 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionado 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), homogeneizado por inversão 5 vezes e centrifugado a 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante contendo o DNA genômico foi transferido para um tubo novo de microcentrífuga de 1,5 mL e o DNA foi precipitado através da adição de 1/20 volume de 5 M NaCl seguido de 2,5 volumes de 100 % etanol. A amostra foi centrifugada a 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 10 min, a 4 °C, lavada duas vezes com etanol 80%, e secada a 37 °C. O DNA genômico foi ressuspenso em ~100 µL de água ultrapura e estocado a -20 °C.

3.8 Isolamento de mitocôndrias com membrana externa intacta

O isolamento de mitocôndrias com a membrana externa intacta foi feito conforme descrito em Glick (1995). As mitocôndrias isoladas por este método foram utilizadas no subfracionamento mitocondrial.

Células de *S. cerevisiae* foram pré-cultivadas até a fase estacionária de crescimento através do inóculo de uma alçada de células em 100 mL de meio YPGal e/ou YPEG e posterior agitação por 18 horas, a 30 °C, a 180 rpm. A cultura foi transferida para um inóculo de 900 mL do respectivo meio seguido de agitação por 18 horas, a 30 °C, a 180 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x *g* (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C, lavadas com solução de 1,2 M sorbitol e novamente centrifugadas a 3.000 x *g* (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C, lavadas com solução de 1,2 M sorbitol e novamente centrifugadas a 3.000 x *g* (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão de digestão (1,2 M sorbitol, 60 mM tampão fosfato de sódio pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% β-mercaptoetanol e 1 mg/mL de Zymoliase 20 T [*from Arthrobacter luteus*, 20.000 units.g⁻¹, MP Biomedicals]) na proporção de 3 mL de tampão/g (peso seco) de células. A mistura foi incubada por 2 horas a 37 °C, 70

rpm, para a digestão da parede celular e geração dos esferoplastos. Os esferoplastos foram lavados com tampão A (1,2 M sorbitol, 20 mM fosfato de potássio pH 7.5) e centrifugados a 4.500 x g (5.000 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 10 min, a 4 °C. A etapa de lavagem dos esferoplastos com tampão A foi repetida duas vezes. Os esferoplastos foram ressuspensos em tampão SHE (0,6 M sorbitol, 20 mM HEPES pH 6.0, 1 mM EDTA e 0,5 mM PMSF) na proporção de 3 mL de tampão/g (peso seco) de células. A membrana plasmática foi rompida através de 30 ciclos de homogeneização em banho de gelo em um homogeneizador do tipo potter (ice glass homogenizer). A suspensão foi centrifugada a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Hitachi CR20B2-rotor RPR20), por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de centrífuga do tipo falcon de 50 mL previamente gelados e novamente centrifugado a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Hitachi CR20B2rotor RPR20), por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de centrifugação de 25 mL previamente gelados e centrifugado a 15.000 x g (12.000 rpm em centrífuga Hitachi CR20B2-rotor RPR20), por 10 min, a 4 °C. O pellet resultante, representando a fração mitocondrial enriquecida, foi ressuspenso com 20 mL de tampão SH (0,6 M sorbitol e 20 mM HEPES pH 7.4) e em seguida centrifugado a 15.000 x g (12.000 rpm em centrífuga Hitachi CR20B2-rotor RPR20), por 10 min, a 4 °C. A fração mitocondrial enriquecida foi ressuspensa em ~500 µL de tampão SH e mantidas no gelo durante as posteriores etapas de purificação, quantificação e subfracionamento mitocondrial.

3.9 Purificação das mitocôndrias em gradiente de densidade de sacarose

A purificação das mitocôndrias em gradiente de densidade de sacarose foi realizada conforme descrito em Gregg et al. (2009). Esta etapa permite a obtenção de uma fração mitocondrial com elevado grau de pureza desprovida de contaminações com outras organelas.

O gradiente de sacarose foi feito em tubos de ultracentrifuga de 13,5 mL (Beckman Coulter, 16 x 76 mm, Part Number: 326814) através da adição de diferentes concentrações de sacarose, conforme demonstrado na Figura 15.



Figura 15. Purificação das mitocôndrias em gradiente de densidade de sacarose. O gradiente de sacarose foi preparado através da adição de diferentes concentrações de sacarose em tubos de ultracentrifugação. As frações mitocondriais enriquecidas foram adicionadas no topo do gradiente e a amostra foi submetida a uma etapa de ultracentrifugação. Após a ultracentrifugação, as mitocôndrias formaram uma nítida banda marrom na interface das concentrações de sacarose de 60%/30%. FONTE: Adaptado de: Meisinger et al. (2000).

As diferentes concentrações de sacarose foram preparadas em tampão EM (10 mM MOPS/KOH pH 7.2 e 1 mM EDTA) e adicionadas no tubo de ultracentrifuga com auxílio da micropipeta de 1000 μ L. Após a preparação do gradiente, as frações mitocondriais enriquecidas (1 ml na concentração de 5 mg/mL) foram adicionadas cuidadosamente no topo do gradiente. Os tubos foram submetidos à ultracentrifugação a 134.000 x *g* (33.000 rpm em centrífuga Sorvall Ultra-rotor AH-629), por 1 h, a 4 °C. Após esta etapa, uma banda nítida de coloração marrom representando as mitocôndrias intactas pode ser observada na interface das concentrações de sacarose de 60%/30%. As mitocôndrias foram coletadas com auxílio da micropipeta de 200 μ L e ponteiras tendo as pontas cortadas para evitar o rompimento das membranas mitocondriais. As mitocôndrias foram diluídas com dois volumes de tampão SEM (10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 250 mM sacarose, 1 mM EDTA) e a suspensão foi centrifugada a 16.000 x *g* (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as mitocôndrias foram ressuspensas com ~500 μ L de tampão SEM.

3.10 Quantificação das proteínas mitocondriais

A quantificação de proteínas mitocondriais foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este é um método colorimétrico baseado na ligação da molécula *Brilliant Blue* G-250 nas proteínas, apresentando um espectro de absorção máximo em 695 nm. As proteínas mitocondriais foram quantificadas em microplacas de *ELISA* de 96 poços utilizando o reagente *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad Laboratories, Inc) e a proteína

soro albumina bovina (BSA) como padrão externo, conforme recomendações do fabricante. As leituras foram feitas a 595 nm em leitora de microplacas.

3.11 Subfracionamento mitocondrial

O subfracionamento mitocondrial foi feito conforme descrito em Glick (1995). As mitocôndrias purificadas através do gradiente de densidade de sacarose foram quantificadas e ajustadas para a concentração de 10 mg/mL. Em seguida, as mitocôndrias foram submetidas a diversos tratamentos conforme descrito no quadro abaixo:

Fração 1 Fração 2 Fração 3 Fração 4 Mitocôndria - 10 mg/mL 40 µL 40 µL 40 µL 40 µL 0,6 M Sorbitol + 10 mM HEPES pH 7,5 210 µL 210 µL 10 mM HEPES pH 7,5 210 µL 210 µL Proteinase K 10 mg/mL 2,5 µL 2,5 µL _ -

Quadro 4 – Subfracionamento mitocondrial.

Os diferentes tratamentos foram feitos em banho de gelo por 60 minutos. Após o período de incubação, a atividade da proteinase K foi bloqueada através da adição de 2 μ L de 200 mM de PMSF e em seguida as amostras foram centrifugadas a 16.000 x *g* (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 25 min, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o *pellet* foi ressuspenso em 100 μ L de tampão SH (0,6 M sorbitol, 20 mM HEPES pH 7.4). As proteínas do sobrenadante e do *pellet* foram precipitadas através da adição de 10 μ L de ácido tricloroacético 50%. As misturas foram centrifugadas a 16.000 x *g* (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11), por 5 min, a 4 °C e o *pellet* resultante foi ressuspenso em 110 μ L de tampão de amostra Laemmli 1x (o tampão 1x foi feito através da adiluição do tampão Laemmli 5x [60 mM Tris-HCL pH 6.8, 25% glicerol, 2%; SDS, 0,1% azul de bromofenol]), acrescidos de 1 μ L de 1 M Tris-HCL pH 9 e 1 μ L de 200 mM PMSF. As amostras foram estocadas a -80 °C para posteriores análises de *western-blot*.

3.12 Solubilidade das proteínas mitocondriais

A solubilidade das proteínas mitocondriais foi verificada conforme descrito em Boldogh e Pon (2007), com algumas modificações. As mitocôndrias foram isoladas conforme descrito no item 3.8 e diluídas em tampão SH (0,6 M sorbitol e 20 mM HEPES pH 7.4) para a concentração final de 10 mg/mL. 200 µL da suspensão mitocondrial (2 mg de mitocôndrias) foram sonicados por 10 seg, com amplitude de 80%, em sonicador *Sonics Vibra-Cell VCX* 130 e imediatamente adicionadas em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 30.000 x g (45.00 rpm em centrífuga Hitachi CS100-rotor RP100AT-262), por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e mantido em banho de gelo. O *pellet* foi ressuspenso em ~150 μ L de tampão SH e uma pequena fração do mesmo (~50 μ L) foi coletado e mantido em banho de gelo. O restante da amostra foi misturada com 1 volume de solução de 0,2 M carbonato de sódio e mantido em banho de gelo por 30 min. A amostra foi centrifugada a 30.000 x g (45.00 rpm em centrífuga Hitachi CS100-rotor RP100AT-262), por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e mantido em banho de gelo. O *pellet* foi ressuspenso em ~150 μ L de tampão SH. Todas as frações obtidas foram estocadas a -80 °C para posteriores análises de SDS-PAGE e *western-blot*.

3.13 Análise da estabilidade proteica in organello

A estabilidade das proteínas mitocondriais foi avaliada conforme descrito em Vögtle et al. (2009). As mitocôndrias foram isoladas conforme descrito no item 3.8. Após a quantificação das proteínas mitocondriais, 200 µg de mitocôndrias foram diluídas em 200 µL de tampão SEM (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.2) em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estéreis. As amostras foram incubadas a 37 °C nos seguintes períodos de tempo: 0 h, 24 h, 48 h, e 65 h. Após o período de incubação as mitocôndrias foram centrifugadas a 16.000 x g (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11) por 15 min a 4 °C, ressuspensas em tampão Laemmli 5x e analisadas através de SDS-PAGE e *western-blot*.

3.14 Extratos proteicos de células de S. cerevisiae

Um volume de cultura equivalente a 3 x O.D.₆₀₀ unidades de células (1 O.D.₆₀₀ unidade de célula = 1 mL de uma cultura com O.D.₆₀₀ = 1) foi centrifugado a 16.000 x *g* (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11) por 1 min a 4 °C. As células foram ressuspensas com 1 mL de água ultrapura acrescidos de 160 µL de 1,85 M NaOH e 7.4 % de β-mercaptoetanol. A suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 min seguido da adição de 160 µL de 50% ácido tricloroacético e posterior incubação em banho de gelo por 10 min. A amostra foi centrifugada a 16.000 x *g* (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415Rrotor FA-45-24-11) por 2 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de 1 M Tris-Base, evitando a solubilização do *pellet*. A amostra foi centrifugada a 16.000 x *g* (13.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415R-rotor FA-45-24-11) por 30 seg a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 150 μ L de tampão de amostra Laemmli 5x. A amostra foi fervida por 5 min a 95 °C e estocada a -80 °C para posteriores análises de SDS-PAGE e *western-blot*.

3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas em condição desnaturante foi feita conforme descrito em Laemmli (1970), utilizando o sistema de minigéis da BioRad. A percentagem de poliacrilamida no gel de separação dependeu da massa molecular das proteínas que foram analisadas. O quadro abaixo descreve a composição dos géis utilizados nesse trabalho:

Soluções	G	el de Separaç	Gel de	
bonições	12%	14%	15%	Empilhamento
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	2,8 mL	2,8 mL	2,8 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	-	-	-	0,4 mL
Acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8	2,12 mL	2,5 mL	2,65 mL	0,5 mL
Persulfato de Amônio 10% (p/v)	50 µL	50 µL	50 µL	15 μL
TEMED 100%	10 µL	10 µL	10 µL	5 µL
Água	0,38 mL	-	0,15 mL	2,3 mL
Volume Final	5,3 mL	5,3 mL	5,3 mL	3,2 mL

Quadro 5 – Composição dos géis de separação e de empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE.

Antes de serem aplicadas no gel, as proteínas foram misturadas com tampão de amostra Laemmli 5x acrescido de 1 μ L de 1M DTT. A mistura foi fervida por 5 min a 95 °C. Posteriormente realizou-se a corrida eletroforética a 200 V em tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de azul de Coomassie e descorados com solução descorante. Alternativamente, os géis foram submetidos a análises de *western-blot*.

3.16 Western-blot

Após a corrida eletroforética de SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose $Amersham^{TM} Protran^{TM} Premium 0,45 \ \mu M NC$ (GE Healthcare), utilizando o sistema de transferência semi-seco *Lightning Blotter*TM (PerkinElmer[®]). A montagem do sistema de transferência consistiu em colocar o gel de poliacrilamida em contato com a membrana de nitrocelulose envoltos com três folhas de papel absorvente

Chromatography paper 3 mm Chr (WhatmanTM), todos previamente umedecidos em solução de tampão de transferência (39 mM glicina, 49 mM Tris-HCl pH 8,3, 20% metanol, 0,04% SDS). A transferência foi realizada sob uma voltagem contínua de 24 V, durante 30 min. A eficiência da transferência foi avaliada através da coloração da membrana de nitrocelulose com solução Ponceau (0,2% Ponceau S, 3% ácido tricloroacético, 3% ácido sulfosalicílico). A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com solução de leite 5% (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk – BioRad) preparado em solução TBST 1x (10 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20). O bloqueio foi feito por 1 h, em temperatura ambiente, sob leve agitação. Em algumas ocasiões, o bloqueio também foi feito por 16 h a 4 °C.

As proteínas de interesse foram detectadas através da incubação da membrana com anticorpos primários e secundários conforme o quadro abaixo.

Anticorpo	Solução de Preparo	Tempo de Incubação	Diluição	Secundário	Fonte
Anti-αKGD	Leite 5%	1 h T.A.	1:200	Rabbit	Dr. Mário H. de Barros ICB- USP
Anti-Cyt.b2	Leite 5%	1 h T.A.	1:200	Rabbit	Dr. Mário H. de Barros ICB-USP
Anti-ScoI	Leite 5%	1 h T.A.	1:200	Rabbit	Dr. Mário H. de Barros ICB-USP
Anti-Prx1	Leite 5%	1 h T.A.	1:2000	Rabbit	Este estudo
Anti-Trx3	Leite 5%	1 h T.A.	1:1000	Rabbit	Dr. Marilene Demasi Instituto Butantan
Anti-Trr2	Leite 5%	1 h T.A.	1:1000	Rabbit	Dr. Marilene Demasi Instituto Butantan
Anti-HA	Leite 5%	1 h T.A.	1:2000	Rabbit	Sigma Aldrich H6908
Anti-Prx3	TBST 1x	1 h T.A.	1:4000	Mouse	AbFrontier LF MA0044
Anti-Porina	Leite 5%	1 h T.A.	1:10000	Mouse	ThermoFicher Scientific 16G9E6BC4
Anti-Pgk1	Leite 5%	1 h T.A.	1:10000	Rabbit	Nordic Immunology NE130/7S
Anti-Dpm1	Leite 5%	1 h T.A.	1:1000	Mouse	ThermoFicher Scientific 5C5A7
Anti-Vma2	Leite 5%	1 h T.A.	1:1000	Mouse	ThermoFicher Scientific 11D11B2
Anti-Pep12	Leite 5%	1 h T.A.	1:1000	Mouse	ThermoFicher Scientific 2C3G4
Anti-CoxIV	Leite 5%	1 h T.A.	1:2000	Mouse	Abcam 20E8
Anti-rabbit IgG HRP- linked	Leite 5%	1 h T.A.	1:10000	-	Cell Signaling Technology
Anti-mouse IgG HRP- linked	Leite 5%	1 h T.A.	1:10000	-	Cell Signaling Technology

Quadro 6 - Lista de anticorpos utilizados neste trabalho.

Nota: T.A. - temperatura embiente. Leite 5% - *Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk* (BioRad) preparado em solução de TBST 1x.

A visualização dos complexos antígeno-anticorpo foi feita através da lavagem da membrana com solução 1:1 de *ECL*TM *Prime Western Blotting Detection Reagente* (GE Healthcare) seguido da exposição da mesma em filmes de raio-X *High performance chemiluminescence film* (GE Healthcare). Os filmes de raio-X foram sucessivamente banhados em solução reveladora por 1 min, água por 1 min e solução fixadora por 1 min. Finalmente, os filmes de raio X foram lavados em água corrente e secados para posterior documentação em *scanner* (Epson L365).

3.17 Isolamento de mitocôndrias para a quantificação da liberação de H2O2

O isolamento de mitocôndrias para a quantificação da H_2O_2 de hidrogênio foi feito conforme descrito em Meisinger et al. (2006). A principal diferença em relação ao método descrito anteriormente (item 3.8) é a etapa de digestão da parede celular. Neste protocolo, a digestão da parede celular foi feita a 30 °C, enquanto no protocolo anterior essa etapa foi realizada a 37 °C. O aumento da temperatura tem sido demonstrado induzir a geração de EROs o que poderia influenciar a homeostase redox mitocondrial.

Células de S. cerevisiae foram pré-cultivadas até a fase estacionária de crescimento através do inóculo de uma alçada de células em 50 mL de meio YPGal e posterior agitação por 18 horas, a 30 °C, a 180 rpm. A cultura foi diluída em 800 mL de meio YPGal fresco para uma O.D.₆₀₀ final de 0,03. Prosseguiu-se o crescimento a 30 °C, a 180 rpm até a cultura atingir um O.D.₆₀₀ final de no máximo 2. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C, lavadas com água destilada e novamente centrifugadas a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão DTT (100 mM Tris-H₂SO₄ pH 9.4, 10 mM DTT pré-aquecido a 30 °C) na proporção de 2 ml de tampão/g (peso seco) de células. A mistura foi incubada a 30 °C, por 20 min, 70 rpm, para a redução das ligações dissulfetos da parede celular. A suspensão foi centrifugada a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 23 °C, e as células foram ressuspensas em tampão Zymolyase (1,2 M sorbitol, 20 mM tampão fosfato de potássio pH 7.4) na proporção de 7 ml de tampão/g (peso seco) de células. A suspensão foi centrifugada a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 23 °C. A lavagem com o tampão Zymolyase foi repetida mais uma vez. As células foram ressuspensas em tampão Zymolyase na proporção de 7 ml de tampão/g (peso seco) de células, contendo 3 mg de Zy,olyase 20 T (from Arthrobacter luteus, 20.000 units.g⁻¹, MP Biomedicals) para cada g (peso seco) de células. A mistura foi incubada a 30 °C, por 30 min,

70 rpm, para a digestão da parede celular. Os esferoplastos foram centrifugados a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 8 min, a 4 °C e ressspensos em tampão de homogeneização (0,6 M sorbitol, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) na proporção de 6,5 ml de tampão/g (peso seco) de células. A suspensão foi centrifugada a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 8 min, a 23 °C. Os esferoplastos foram lavados mais uma vez com tampão de homogeneização e ressuspensos novamente nesse tampão contendo 1 mM de PMSF. A membrana plasmática foi rompida através de 20 ciclos de homogeneização em banho de gelo em um homogeneizador do tipo potter (ice glass homogenizer). O lisado foi diluído com 1 volume de tampão de homogeneização e centrifugado a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de centrífuga do tipo falcon de 50 mL previamente gelados e novamente centrifugado a 3.000 x g (3.500 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de centrifugação de 25 mL previamente gelados e centrifugado a 15.000 x g (12.000 rpm em centrífuga Hitachi CR20B2-rotor RPR20), por 10 min, a 4 °C. O pellet resultante, representando a fração mitocondrial enriquecida, foi ressuspenso com ~500 µL de tampão SEM (10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 250 mM sacarose, 1 mM EDTA). As mitocôndrias foram mantidas no gelo durante as etapas de quantificação proteica e quantificação da liberação de H₂O₂.

3.18 Quantificação da liberação de H2O2 mitocondrial

A liberação de H_2O_2 a partir de mitocôndrias isoladas de células de *S. cerevisiae* foi monitorada por 10 minutos com o uso de um espectrofotômetro de fluorescência operando a 570 nm de excitação e 585 nm de emissão, com agitação constante, a 30 °C. As reações foram feitas em um volume final de 3 mL de tampão 0,6 M sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM fosfato de potássio pH 7.4 e 2 mM MgCl₂, contendo 50 µg de proteínas mitocondriais, 50 µM de AmplexTM Red (Molecular Probes®) e 1 U/mL de peroxidase de raiz forte (Sigma®). A respiração mitocondrial foi induzida através da adição de 1% etanol. Quando necessário, a inibição da cadeia respiratória foi feita através da adição de Antimicina A, em uma concentração final de 0,5 µg/mL. A curva de calibração foi feita utilizando concentrações conhecidas de H₂O₂.

3.19 Sensibilidade ao estresse oxidativo exógeno

A sensibilidade ao estresse oxidativo exógeno das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foi verificada através da capacidade de crescimento em meio mínimo sólido contendo diferentes concentrações de H₂O₂. As diferentes linhagens foram crescidas até a fase estacionária de crescimento através do inóculo de uma colônia de células em 10 mL de meio mínimo, seguido de crescimento por 16 h, a 30 °C, a 180 rpm. As células foram diluídas em água ultrapura estéril para uma O.D₆₀₀ final = 1. A suspenção celular foi posteriormente diluída para 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Em seguida, 3 µL das diferentes diluições foram sequencialmente adicionadas em placas de meio sólido contendo concentrações crescentes de H₂O₂. As placas foram incubadas por 3 dias a 30 °C.

3.20 Clonagens gênicas

A construção da linhagem expressando a proteína Trr2 fusionada com o epítopo HA na região C-terminal foi feita da seguinte maneira. A região codificadora do gene *TRR2* juntamente com sua região promotora foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae*, utilizando os oligonucleotídeos Trr2-F e Trr2-HA (Quadro 7). O produto de amplificação foi clonado no vetor centromérico Ycplac111 (gentilmente cedido pelo professor Dr. José Ribamar Ferreira-Júnior, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, USP). A região codificadora da cauda HA (epítopo da hemaglutinina A – HA) presente no oligonucleotídeo de amplificação reverso (oligonucleotídeo Trr2-HA) (Quadro 7) possibilitou a inserção da cauda HA imediatamente a montante do códon de terminação do gene *TRR2*. O plasmídeo recombinante foi posteriormente utilizado para a transformação de células de *S. cerevisiae* BY4741*Δ1TRR2*. A seleção das células transformantes foi feita através da recuperação da auxotrofia de leucina conferida pelo plasmídeo Ycplac111.

A construção de linhagens mutantes $\Delta PRX1$ reexpressando o gene PRX1 selvagem e/o PRX1C91S e PRX1C38S mutantes foram feitas da seguinte maneira. A região codificadora do gene PRX1 juntamente com sua região promotora foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae*, utilizando os oligonucleotídeos Prx1-F e Prx1-R (Quadro 7). O produto de amplificação foi clonado no vetor centromérico Ycplac111 utilizando os sítios de restrição SacI e PstI. O plasmídeo recombinante, contendo o gene PRX1 selvagem foi utilizado como DNA molde nas reações de mutagênese sítio específica (item 3.4) para a inserção das mutações C38S e C91S. As mutações foram inseridas utilizando os oligonucleotídeos descritos no Quadro 7. Após confirmar as mutações por sequenciamento, os plasmídeos recombinantes Ycplac111+*PRX1*, Ycplac111+*PRX1C38S* e Ycplac111+*PRX1C91S*, foram transformados na linhagem BY4741*ΔPRX1*.

A construção da linhagem mutante $\triangle OCT1$ reexpressando o gene OCT1 selvagem foi feita da seguinte maneira. A linhagem $\triangle OCT1$ foi transformada com o plasmídeo centromérico pRS413 contendo o gene OCT1 selvagem e promotor próprio. Esse plasmídeo foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Chris Meisinger (Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University Freiburg, Germany). O plasmídeo recombinante foi posteriormente utilizado para a transformação de células de *S. cerevisiae* BY4741 $\triangle OCT1$.

A construção da linhagem expressando a proteína Prx1 com cauda de histidina na região C-termminal foi feita da seguinte maneira. Inicialmente foi feita a construção do plasmídeo epissomal Yep351TEF, ao qual contem o promotor constitutivo do gene TEF1. A construção desse plasmídeo foi feita através da amplificação da região promotora do gene TEF1 presente no plasmídeo pUG6 (Euroscarf) utilizando os oligonucleotídeos TEF-F e TEF-R (Quadro 7). O produto de amplificação foi clonado no plasmídeo Yep351 (gentilmente cedido pelo professor Dr. Mário H. de Barros, Universidade de São Paulo, USP) nos sítios de restrição SacI e BamHI. Em seguida, a região codificadora do gene *PRX1* foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico da linhagem BY4741 de S. cerevisiae, utilizando os oligonucleotídeos Prx1-6His-F e Prx1-6His-R (Quadro 7). O produto de amplificação foi clonado no vetor epissomal Yep351TEF1 utilizando os sítios de restrição BamHI e SalI. A região codificadora da cauda de seis resíduos de histidina presente no oligonucleotídeo de amplificação reverso (oligonucleotídeo Prx1-6His-R) (Quadro 7) possibilitou a inserção da cauda imediatamente a montante do códon de terminação do gene PRX1. O plasmídeo recombinante foi posteriormente utilizado para a transformação de células de S. cerevisiae BY4741*APRX1*. A expressão do gene *PRX1* foi regulada pelo promotor constitutivo *TEF* presente no plasmídeo Yep351.

A construção de linhagens expressando a proteína Prx3 humana foi feita da seguinte maneira. Incialmente o gene codificador da proteína Prx3 humana foi sintetizado quimicamente pela empresa FastBio (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Durante a síntese gênica realizou-se a otimização dos códons utilizados por *S. cerevisiae*. O gene foi clonado no vetor centromérico pRS413 nos sítios de restrição BamHI e SalI. A expressão do gene *PRDX3* no plasmídeo pRS413 é regulada pelas regiões promotora e terminadora do gene *TEF1*, aos quais foram sintetizados em conjunto com o gene *PRDX3*. Esse plasmídeo foi utilizado na transformação das linhagens BY4741WT e BY4741 $\Delta OCT1$.

A construção das proteínas Prx1 recombinantes (Prx1F31 e Prx1K39) com cauda de histidina na região C-terminal foi feita da seguinte maneira. As regiões codificadoras correspondente as duas isoformas de Prx1 foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae*, utilizando os oligonucleotídeos Prx1F31 e Prx1-R2 (para a isoforma Prx1F31) ou Prx1K39 e Prx1-R2 (para a isoforma Prx1F31) ou Prx1K39 e Prx1-R2 (para a isoforma Prx1K39). Os produtos de amplificação foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e KpnI e posteriormente ligados no vetor de expressão pET29b (Novagen) previamente digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos recombinantes foram então transformados na linhagem de *E. coli DH5a* ao qual produziu grandes quantidades de cópias do mesmos. Após extração dos plasmídeos a partir das células de *E. coli DH5a*, realizou-se o sequenciamento destes a fim de confirmar a integridade das sequências codificadoras. Por fim, os plasmídeos foram transformados na linhagem de *E. coli* de expressão *BL21*, ao qual foi utilizada para produzir grandes quantidades das proteínas recombinantes.

Nome	Sequência				
PRX1-F31	5' CCTATT <u>CATATG</u> AAACAATTCAAACAAGTGATCAAC 3'(NdeI)				
PRX1-K39	5' CCTATT <u>CATATG</u> TTTAGTAGAATTTGTAGCGCTCA 3' (NdeI)				
PRX1-R2	5' AA <u>GGTACC</u> TTTCGACTTGGTGAATCTTAA 3' (KpnI)				
TRR2-F	5' T <u>GGATCC</u> TATTTCTTGAACCCAACTTGAAGGC 3' (BamHI)				
TRR2-HA	5'TTA <u>AAGCTT</u> TCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACTCTTGGG				
	CACTTAGGTACCGTTC 3' (HindIII)				
PRX1rec-F	5'CTTCTAGATTCTCGCAGTAGGATGAGATAAATTTCAAAGAAGCAGG				
	AAGCAAAGGCAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'				
PRX1rec-R	5'TTTAGTTAGAGATACTTCATATACCTGTATATAGTAAAGTCGTTTAT				
	TTCAAAGCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'				
Prx1-6His-F	5'TCA <u>GGATCC</u> ATGTTTAGTAGAATTTGTAGC 3' (BamHI)				
Prx1-6His-R	5'TCA <u>GTCGAC</u> TTAATGGTGATGGTGATGGTGACCACCACCTTTCGACT				
	TGGTGAATCTTAA 3' (Sall)				
PRX1-F	5' T <u>GAGCTCT</u> CAAAGAAGAAGAATTATGGGCAT 3' (SacI)				
PRX1-R	5' GGC <u>CTGCAG</u> AGTTTATTACATGCATTTTCATAT 3' (PstI)				
PRX1C91S-F	5' TTCACCCCTGTCTCCACCACCGAAGTC 3'				
PRX1C91S-R	5' GACTTCGGTGGTGGAGACAGGGGTGAA 3'				
PRX1C38S-F	5' GCACCTATTCTGTCCAAACAATTCAAA 3'				
PRX1C38S-F	5' TTTGAATTGTTTGGACAGAATAGGTGC 3'				
TEF-F	5'T <u>GAGCTC</u> GTTTAGCTTGCCTCGTCC 3' (SacI)				
TEF-R	5'T <u>GGATCC</u> TTGTTTATGTTCGGATGTGATGTGAGA 3' (BamHI)				

Quadro 7 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nota: A região sublinhada denota a sequência de nucleotídeos reconhecida pelas enzimas de restrição demonstradas entre parênteses.

3.21 Construção de mutantes duplos de S. cerevisiae

A construção de mutantes duplos de S. cerevisiae foi feita através da deleção do gene PRX1 nas linhagens mutantes BY4741∆TRX3, BY4741∆TRR2 e/ou BY4741∆OCT1. A deleção do gene *PRX1* foi feita através da técnica de interrupção gênica em etapa única, conforme descrito em Johnston et al. (2002).

Os oligonucleotídeos iniciadores Prx1rec-F e Prx1rec-R foram utilizados para a amplificação da região codificadora do gene HIS3 de S. pombe, juntamente com suas regiões promotora e terminadora, utilizando o plasmídeo pUG27 (Euroscarf) como DNA molde. Além da região complementar ao plasmídeo pUG27, os oligonucleotídeos possuem 45 pares de bases de homologia com a região imediatamente a montante do códon iniciador ATG e a jusante do códon terminador (stop codon) do gene PRX1. Portanto, o produto de amplificação contem o gene HIS3 flanqueado por 45 pares de bases em cada uma de suas extremidades. O produto de amplificação foi purificado conforme descrito no item 3.4, e ~2 µg de DNA foi utilizado na transformação das células de S. cerevisiae, conforme descrito no item 3.6. Através do mecanismo de recombinação homóloga, o fragmento de DNA transformado se recombina com a região cromossômica complementar aos 45 pares de bases presentes nas suas extremidades. Dessa forma, ocorre a substituição do gene PRX1 selvagem do cromossomo de S. cerevisiae pelo gene HIS3 presente no DNA transformado. A seleção das colônias transformantes foi feita através da marca auxotrófica HIS3. A confirmação da interrupção do gene PRX1 pelo gene HIS3 foi feita através de PCR utilizando os oligonucleotídeos PRX1-F e PRX1-R (Quadro 7) e o DNA genômico purificado a partir das colônias transformantes.

3.22 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Células de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinante foram pré-cultivadas em 50 mL de meio LB contendo kanamicina (50 µg/mL) por 16 horas a 37 °C. A cultura foi então diluída para uma $OD_{600} = 0,2$ em 1 L de meio LB contendo kanamicina (50 µg/mL) e, após atingir $OD_{600} = 0,6$, adicionou-se 1 mM de IPTG seguido de posterior crescimento a 37 °C por 3 horas. Durante este período, ocorre forte indução da expressão da proteína recombinante. Após a indução, as células foram coletadas por meio de centrifugação 5.000 x *g* (6.000 rpm em centrífuga Sorvall RC2-B-rotor GSAHB4), por 5 min, a 4 °C e posteriormente estocadas a -20 °C.

Para a purificação da proteína, inicialmente foi realizado a lise das células através da sonicação do *pellet* celular em sonicador *Digital Sonifier*® *Cell Disruptor*. Células derivadas de 1 L de cultura foram ressuspensas em ~20 mL do tampão Start Buffer (20 mM fosfato de sódio pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol) na presença do inibidor de protease 1 mM PMSF. O programa de sonicação compreendeu 15 ciclos de 20 seg *ON* e 50 seg *OFF*. Após a

sonicação, o extrato celular foi tratado com 1 % de sulfato de estreptomicina (com agitação) por 20 min no gelo. Após centrifugação a 18.000 x *g* (15.000 rpm em centrífuga Hitachi CR20B2-rotor RPR20), por 45 min, a 4 °C, o sobrenadente foi filtrado em membrana de 0,45 μ m (Millipore).

A proteína recombinante foi purificada em coluna de afinidade a níquel com volume de 5 mL (Ni-NTA Superflow Cartridges - Qiagen), seguindo o protocolo descrito a seguir:

- 1) 50 mL água ultrapura;
- 2) 10 mL NiSO₄ 0,1M;
- 3) 50 mL água ultrapura;
- 4) 50 mL Fosfato de Sódio 20 mM pH 7.4/ NaCl 500 mM/ imidazol 20 mM;
- 5) Extrato celular (preparado como descrito anteriormente)
- 6) 50 mL Fosfato de Sódio 20 mM pH 7.4/ NaCl 500 mM/ imidazol 50 mM;
- 7) 50 mL Fosfato de Sódio 20 mM pH 7.4/ NaCl 500 mM/ imidazol 100 mM;
- 8) 50 mL Fosfato de Sódio 20 mM pH 7.4/ NaCl 500 mM/ imidazol 500 mM;
- 9) 50 mL Fosfato de Sódio 20 mM pH 7.4/ NaCl 300 mM/ EDTA 100 mM;

10) 50 mL água ultrapura.

A proteína de interesse foi eluída com 500 mM de imidazol (etapa 8) e coletadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. O grau de pureza das proteínas purificadas foi verificado através da aplicação das amostras coletadas na etapa 8 em gel de SDS-PAGE seguido de coloração com *coomassie blue*.

3.23 Atividade peroxidásica dependente de tiorredoxina

A atividade peroxidásica dependente de tiorredoxina das isoformas de Prx1 recombinantes foi avaliada conforme descrito em Pedrajas et al. (2000), com algumas adaptações. O ensaio consistiu em uma mistura de reação contendo 200 μ M NADPH, 0,1 μ M de tiorredoxina redutase 2 (Trr2), 5 μ M de tiorredoxina 3 (Tx3), 5 μ M de peroxirredoxina 1 (Prx1F31 ou Prx1K39) e 100 mM de DTPA, em tampão 50 mM HEPES pH 7.4. A reação foi iniciada com a adição de diferentes quantidades de H₂O₂ e o consumo do NADPH (ϵ_{340nm} = 6200 M⁻¹ cm⁻¹) foi monitorado espectrofotômetricamente no comprimento de onda de 340 nm a 37 °C por aproximadamente 5 min. As velocidades foram calculadas a partir da inclinação máxima resultante da diminuição da absorbância a 340 nm (oxidação do NADPH presente na reação) em função do tempo.

3.24 Purificação da proteína Prx1 da mitocôndria

As mitocôndrias foram isoladas da linhagem BY4741 expressando a proteína Prx1 com cauda de histidina na região C-terminal. Cerca de 2 mg de mitocôndrias (200 μ L de mitocôndrias na concentração de 10 mg/mL) foram solubilizadas em tampão de lise (2.4% Triton X-100, 50 mM cloreto de sódio, 50 mM Imidazol/HCl pH 7,0, 2 mM 6-ácido amino capróico e 1 mM EDTA (WITTIG et al., 2006). A amostra foi incubada em banho de gelo por 10 min seguido de uma centrifugação a 30.000 x *g* (45.00 rpm em centrífuga Hitachi CS100-rotor RP100AT-262), por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a proteína Prx1 foi purificada em coluna de afinidade a níquel com volume de 1 mL (Ni-NTA Superflow Cartridges - Qiagen), de acordo com o protocolo descrito no item 3.22.

4. RESULTADOS

4.1 Produção de anticorpos e testes de sua especificidade contra as proteínas Prx1, Trr2 e Trx3.

Inicialmente foram produzidos anticorpos policionais que reconhecem especificamente Prx1 de *S. cerevisiae*. Isto foi feito através de injeções subcutâneas da proteína Prx1 recombinante em coelhos fornecidos pela professora Dr. Marilene Demasi (Instituto Butantã – Laboratório de Bioquímica e Biofísica).

Após a obtenção dos anticorpos foram realizados ensaios de *western-blot* para avaliar sua especificidade frente à proteína Prx1 de *S. cerevisiae*. Para este fim, foi utilizada uma fração mitocondrial enriquecida obtida através de centrifugação diferencial (item 3.8). O anticorpo anti-Prx1 reconheceu uma banda de aproximadamente 25 KDa, representando a proteína Prx1 madura importada para a mitocôndria (Figura 16A). Como esperado, o anticorpo não reagiu com a fração mitocondrial obtida da linhagem mutante $\Delta PRXI$, confirmando a especificidade do anticorpo frente Prx1 selvagem.



Figura 16. Teste dos anticorpos anti-Prx1, anti-Trr2 e anti-Trx3 contra as proteínas mitocondriais de *S. cerevisiae*. *Western-blot* da fração mitocondrial obtida a partir das linhagens selvagem (WT); mutante nulo de *PRX1* ($\Delta PRX1$); mutante nulo de *TRR2* ($\Delta TRR2$) e mutante nulo de *TRX3* ($\Delta TRX3$). Foram aplicados 20 µg de proteínas mitocondriais totais em cada canaleta. A seta no *western-blot* relativo à Trr2 indica proteína que reage de forma cruzada com anti-Trr2.

Além de Prx1 foram avaliados a especificidade dos anticorpos contra proteínas do sistema tiorredoxina mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*, composto pelas enzimas tiorredoxina 3 (Trx3) e tiorredoxina redutase 2 (Trr2). Os anticorpos anti-Trr2 e anti-Trx3 já estavam disponíveis em nosso laboratório, porém suas especificidades não tinham sido avaliadas. O sistema tiorredoxina mitocondrial é apontado como um dos possíveis sistemas enzimáticos envolvidos na redução de Prx1 oxidada (PEDRAJAS et al., 2000). Assim como Prx1, não há estudos sobre a localização dessas proteínas em subcompartimentos da mitocôndria.

Semelhante à proteína Prx1, os anticorpos anti-Trr2 e anti-Trx3 reconheceram bandas correspondentes ao peso molecular das respectivas proteínas apenas na linhagem selvagem (Figura 16B e 16C, respectivamente). No entanto, anti-Trr2 também reconheceu uma banda inespecífica em ambas as linhagens, representando uma provável reação cruzada do anticorpo com outra proteína (Figura 16B, seta). Além disso, no decorrer dos resultados apresentados a seguir, o anticorpo anti-Trr2 apresentou elevada inespecificidade, muitas vezes reagindo com outras proteínas mitocondriais.

4.2 Localização e solubilidade das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nos subcompartimentos mitocondriais

A localização das proteínas Prx1, Trr2 e Trx3 nos subcompartimentos mitocondriais foi feita através do isolamento das mitocôndrias (item 3.8) seguido do protocolo de subfracionamento mitocondrial (item 3.11).

Para o isolamento das mitocôndrias, as leveduras foram crescidas em meio contendo glicerol como fonte de carbono, uma condição que promove indução da biogênese de mitocôndrias (ZAMAN et al., 2008). Antes de iniciar o protocolo de subfracionamento, a integridade e a pureza das mitocôndrias foram avaliadas através de *western-blot*, utilizando proteínas marcadoras de diferentes compartimentos subcelulares (Figura 17).

O isolamento das mitocôndrias foi feito através de centrifugação diferencial. O *pellet* obtido após centrifugação a 12.000 x *g* resultou em forte marcação da proteína mitocondrial porina, indicando um enriquecimento mitocondrial nessa fração (Figura 17A). Entretanto, essa fração se mostrou contaminada com outros constituintes celulares, conforme evidenciado pela marcação das proteínas Pgk1 (citoplasma), Dpm1 (retículo endoplasmático), Vma2 (vacúolo) e Pep12 (endossomo). Este problema foi resolvido através de posterior purificação das mitocôndrias em gradiente de densidade de sacarose (item 3.9). Após esta etapa adicional de purificação, as contaminações com citoplasma, retículo endoplasmático, endossomo e
vacúolo reduziram significativamente. Por outro lado, não houve redução da proteína mitocondrial porina, chegando até mesmo aumentar sua marcação. Estes resultados demonstram a eficiente obtenção de uma fração constituída somente de mitocôndrias.



Figura 17. Purificação da fração mitocondrial enriquecida através de gradiente de densidade de sacarose. (A) Células da linhagem selvagem (WT) foram crescidas em meio contendo glicerol como fonte de carbono. As células foram rompidas através de lise mecânica (extrato total) e o lisado foi centrifugado a 3000 x g para remover as células não lisadas e o núcleo. O sobrenadante dessa centrifugação foi posteriormente centrifugado a 12000 x g para a obtenção de uma fração mitocondrial enriquecida (*pellet* - 12000 x g). O sobrenadante dessa centrifugação foi submedida a uma posterior purificação através de gradiente de densidade de sacarose (mitocôndrias purificadas). Proteínas totais das diferentes frações (5 μ g) foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando anticorpos indicados na figura.

As proteínas Prx1, Trr2 e Trx3 apresentaram um perfil de marcação semelhante à proteína mitocondrial porina (Figura 17A), indicando que essas proteínas são de fato

mitocondriais (PEDRAJAS et al. 1999; 2000), e excluindo a possibilidade de que estejam em outros compartimentos celulares.

Além da sua pureza, a integridade da fração mitocondrial também foi avaliada. Não houve marcação da proteína porina no sobrenadante obtido após centrifugação a 12.000 x g (Figura 17B), indicando que não houve rompimento das membranas mitocondriais durante a execução do protocolo, confirmando a integridade das mitocôndrias.

Posteriormente, os estudos de solubilidade e localização submitocondrial das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 foram iniciados. A solubilidade foi avaliada através da sonicação das mitocôndrias seguido do tratamento com solução alcalina (carbonato de sódio) (Figura 18 A). Durante a sonicação das mitocôndrias, ocorre o rompimento das membranas mitocondriais e, dessa forma, proteínas solúveis aparecem na fração sobrenadante após ultracentrifugação. O *pellet* oriundo dessa ultracentrifugação é posteriormente tratado com solução de carbonato de sódio, ao qual irá extrair proteínas fracamente associadas às membranas (proteínas associadas perifericamente a membranas). Proteínas integrais não são extraídas com carbonato de sódio.

A eficiência do protocolo de solubilização foi avaliada através da marcação de proteínas mitocondriais de localização conhecida (Figura 18B). A sonicação das mitocôndrias promoveu a liberação da proteína solúvel de matriz mitocondrial α -KGD para o sobrenadante (S). Essa liberação não ocorreu totalmente devido à formação de partículas sub-mitocondriais (porções da matriz mitocondrial envoltas pela membrana interna) durante o protocolo de sonicação. Tais partículas são sedimentadas durante a ultracentrifugação e, portanto, aparecem no *pellet* (P). Por outro lado, não houve liberação das proteínas membranares porina e Cyt.*b2* para o sobrenadante (S). No entanto, após o tratamento do *pellet* (P) com solução de carbonato de sódio, a proteína Cyt.*b2* foi totalmente liberada para o sobrenadante (CS), visto que a mesma é uma proteína associada fracamente a membrana interna. Já a proteína porina, associada integralmente na membrana externa, permaneceu na fração do *pellet* (P). Finalmente, a proteína de matriz mitocondrial α -KGD, que tinha permanecido no *pellet* (P) após a sonicação, foi totalmente liberada para o sobrenadante (CS).

As proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 apresentaram um perfil de marcação semelhante à proteína associada fracamente a membrana mitocondrial (Cyt.b2). Para estas proteínas, a sonicação não foi suficiente em liberá-las para a fração sobrenadante. No entanto, o tratamento com carbonato de sódio foi eficiente nesse processo. Estes resultados indicam que as proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 se associam fracamente (perifericamente) com as membranas mitocondriais.



Figura 18. Solubilidade mitocondrial das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1. (A) Representação esquemática do prototoco de solubilidade das proteínas mitocondriais. As mitocôndrias (Mit) foram sonicadas e separadas nas frações proteicas do sobrenadante (S) e partículas submitocondriais (P) através de centrifugação a 30000 x g. A fração P foi posteriormente submetida ao tratamento com solução alcalina de carbonato de sódio Na₂CO₃ em uma concentração final de 200 mM. A mistura foi centrifugada a 30000 x g, resultando em uma fração solúvel (CS) e outra membranar (CP). (B) Quantidades equivalentes de cada fração foram separadas através de SDS-PAGE e analisadas através de *western-blot* utilizando os anticorpos indicados na figura.

Em seguida, avaliou-se a localização das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nos subcompartimentos mitocondriais. Nesta etapa, as mitocôndrias são colocadas na presença de uma solução hipotônica induzindo o rompimento da membrana externa e consequente conversão da mitocôndria em mitoplasto (frações 3 e 4 na figura 19A). Desta forma, proteínas presentes no espaço intermembrana são liberadas para o sobrenadante e, portanto, deixam de aparecer nas frações 3 e 4. A geração dos mitoplastos é posteriormente confirmada através da sensibilidade da proteína marcadora de membrana interna com face voltada para o espaço intermembrana ScoI ao tratamento com proteinase K (fração 4).



Figura 19. Localização das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nas células crescidas em glicerol. (A) Resumo da metodologia do subfracionamento mitocondrial. As esferas coloridas demonstram proteínas localizadas nos diferentes compartimentos mitocondriais: esfera vermelha = membrana externa com face voltada para o citosol; esfera verde = espaço intermembrana, esfera roxa = membrana interna com face voltada para o espaço intermembrana; esfera azul clara = matriz mitocondrial. (B) O conteúdo do pellet obtido após a centrifugação das diferentes frações do subfracionamento mitocondrial foi separado em gel de SDS-PAGE seguido de western-blot utilizando anticorpos indicados na figura. Mit - mitocôndria; Mpl - mitoplasto. Os mitoplastos referem-se às membranas frações mitocondriais, rompidas osmótico (Swelling). cujas externas foram choque por

Novamente, através da utilização de anticorpos que reconhecem proteínas marcadoras específicas de cada um dos sub-compartimentos mitocondriais, a localização de proteínas alvo pode ser determinada através de análises de *western-blot* comparativas.

As análises de *western-blot* utilizando proteínas marcadoras do espaço intermembrana (Cyt.b2), membrana interna com face voltada para o espaço intermembrana (ScoI) e matriz mitocondrial (α -KGD) demonstraram a eficiente conversão das mitocôndrias em mitoplastos. Houve uma redução substancial de marcação de Cyb.b2 nas frações 3 e 4 e a proteína ScoI foi degradada pela ação da proteinase K na fração 4. Finalmente, a integridade dos mitoplastos foi confirmada através da marcação de α -KGD em todas as frações (Figura 19B).

A comparação do perfil de marcação de Prx1 com os marcadores mitocondriais possibilitou concluir que Prx1 se localiza preferencialmente na matriz mitocondrial, pois apresentou marcação semelhante à proteína α -KGD, presente neste compartimento (Figura 19B). As proteínas Trr2 e Trx3 também apresentaram marcação semelhante a α -KGD, indicando uma co-localização dessas proteínas, juntamente com Prx1, na matriz mitocondrial.

O subfracionamento também foi feito em meio contendo galactose como fonte de carbono, uma condição fermentativa em que, diferentemente da glicose, não promove a inibição da biogênese de mitocôndrias (ZAMAN, et al., 2008). Apesar de ocorrer biogênese mitocondrial em meio contendo galactose, a atividade mitocondrial é significativamente menor em relação às células cultivadas em glicerol.

Novamente, utilizando as proteínas marcadoras foi possível confirmar a eficiente conversão de mitocôndrias em mitoplastos como evidenciado pelo padrão de marcação das proteínas marcadoras Cyt-b2, ScoI e α -KGD (Figura 20). Semelhante ao fracionamento em glicerol, Prx1 e Trx3 apresentaram forte marcação em todas as frações, indicando que estas proteínas se localizam predominantemente na matriz mitocondrial em meio contendo galactose como fonte de carbono. Devido o anticorpo anti-Trr2 não ser totalmente específico, o epítopo da hemaglutina A (HA) foi fusionado na região C-terminal da proteína Trr2 (item 3.20). Dessa forma, as analises de *western-blot* das diferentes frações submitocondriais puderam ser feitas com anticorpos monoclonais que reconhecem unicamente o epítopo HA.

Com esta abordagem foi possível confirmar que Trr2 também se localiza na matriz mitocondrial, pois houve forte marcação da proteína nas quatro frações submitocondriais (Figura 20).



Figura 20. Localização submitocondrial das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 nas células crescidas em galactose. As diferentes frações do subfracionamento mitocondrial foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando anticorpos indicados na figura. Mit – mitocôndria; Mpl – mitoplasto.

Uma forma adicional de corroborar os experimentos de subfracionamento mitocondrial é a realização de *western-blot*, analizando o conteúdo do sobrenadante obtido no protocolo demonstrado na figura 19A. Dessa forma, proteínas sabidamente conhecidas por pertencerem ao espaço intermembrana deverão aparecer no sobrenadante da fração 3 (não aparecem no sobrenadante da fração 4 devido a ação da proteinase K).

Houve marcação da proteína de espaço intermembrana Cyt.b2 na fração 3 do sobrenadante, sendo posteriormente degradada pela atividade da proteinase K na fração 4 (Figura 21). A proteína de matriz α -KGD apresentou marcação apenas no *pellet*, demonstrando a integridade da membrana interna dos mitoplastos. Estes dados novamente demonstram a eficiente conversão das mitocôndrias (Mit) em mitoplastos (Mpl).



Figura 21. Western blot das frações do pellet e do sobrenadante do protocolo de subfracionamento mitocondrial. Amostras do pellet e do sobrenadante (40 µg de proteínas totais) derivadas do protocolo de sub-fracionamento mitocondrial foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando anticorpos indicados na figura. Mit – mitocôndria; Mpl – mitoplasto.

Curiosamente, a proteína Prx1 apresentou forte marcação nas frações 3 e 4 do sobrenadante (Figura 21). No entanto, não houve degradação dessa proteína por proteinase K (fração 4), conforme observado para a proteína Cyt.b2. Apesar de haver uma pequena marcação de Trx3 nas frações 3 e 4 do sobrenadante, o nível de marcação foi significativamente menor quando comparado com Prx1. Estes resultados indicam que apesar de Prx1 estar localizada na matriz mitocondrial, existe uma porção significativa dessa proteína no espaço intermembrana. Porém, de forma inesperada, Prx1 mostra-se resistente frente à degradação por proteinase K (comportamento distinto do observado para Cyt.b2, proteína marcadora do espaço intermembrana).

Em resumo, combinando os dados de solubilidade com o subfracionamento mitocondrial, é possível concluir que as proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 estão localizadas na matriz mitocondrial associadas fracamente com a membrana mitocondrial interna. A orientação das proteínas é tal que as mesmas ficam voltadas para o lado da matriz mitocondrial, visto que elas não foram degradas pela proteinase K (comparar com a proteína ScoI que se localiza na membrana interna com face voltada para o espaço intermembrana). Entretanto, a proteína Prx1 também se localiza no espaço intermembrana uma vez que houve forte marcação dessa proteína nas frações 3 e 4 do sobrenadante. A próxima etapa foi à investigação dos processos envolvidos na importação das proteínas para a mitocondria.

4.3 Investigação dos mecanismos de importação mitocondrial das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1

Vögtle et al. (2009) apresentaram evidências *in silico* de que Prx1 é clivada pela protease octapeptidil aminopeptidase, Oct1. Segundos os autores durante a importação de Prx1 para o interior da mitocôndria a proteína sofreria duas clivagens: inicialmente ela seria clivada pela protease MPP entre os resíduos de treonina 30 e fenilalanina 31. Em seguida, Oct1 catalisaria o segundo evento de clivagem retirando oito aminoácidos a partir da extremidade N-terminal. Portanto, a proteína Prx1 madura (totalmente processada) iniciaria a partir do resíduo de lisina 39 (K39) (Figura 22A). Anteriormente a esses estudos era considerado que Prx1 madura era processada somente por MPP, e a predição *in silico* indicava erroneamente que a sequencia se iniciaria no aminoácido L17.

Para confirmar se Prx1 é um substrato da protease Oct1 *in vivo*, mitocôndrias isoladas das linhagens WT e $\triangle OCT1$ foram analisadas através de *western-blot*, utilizando anticorpos anti-Prx1. Na linhagem $\triangle OCT1$, Prx1 apresentou uma banda com um tamanho ligeiramente maior comparado à linhagem WT (Figura 22B canaleta 2), consistente com a presença dos oito aminoácidos que são clivados pela protease Oct1 na linhagem selvagem. Portanto, Prx1 é um substrato de Oct1 *in vivo* (comparar canaletas 1 e 2 figura 22B).

Para avaliar o envolvimento dos resíduos de cisteínas de Prx1 nos processos de importação e processamento mitocondrial, as cisteínas C38 (presente no interior do ocatapetídeo) e C91 (resíduo de cisteína catalítico situado no sítio ativo de Prx1) foram substituídas por serina. Os genes contendo as mutações sítio específicas *PRX1C38S* e *PRX1C91S* foram expressos na linhagem $\Delta PRX1$ e as mitocôndrias isoladas dessas linhagens foram analisadas através de *western-blot* utilizando anticorpos anti-Prx1. Ambas as mutações

C38S e C91S não afetaram a importação da proteína para o interior da mitocôndria assim como não interferiram na clivagem catalisada por Oct1 (Figura 22B).

A MPP													Oct1																										
1					р	res	sse	equ	lên	ncia	a d	e	en	de	reg	çar	ne	nte	o n	nite	000	one	dri	al					30	,	0	cta	ipe	pti	íde	90	38 \	,	
Prx1p M	F	s	R	I	С	S	A	Q	L	ĸ	R	т	A	W	т	L	Ρ	K	Q	A	H	L	Q	S	Q	т	I	K	т	F	A	т	A	Ρ	I	L	С	ĸ	Q
F	к	Q	S	D	Q	P	R	L	R	I	N	s	D	A	P	N	F	D	A	D	т	т	v	G	ĸ	I	N	F	Y	D	Y	L	G	D	s	W	G	v	L
F	s	H	P	A	D	F	т	P	v	91 C	т	т	Е	V	S	A	F	A	K	L	ĸ	P	E	F	D	K	R	N	v	K	L	I	G	L	S	v	Е	D	v
E	s	H	Е	ĸ	W	I	Q	D	I	ĸ	Е	I	A	ĸ	v	к	N	v	G	F	P	I	I	G	D	т	F	R	N	v	A	F	L	Y	D	м	v	D	A
E	G	F	ĸ	N	I	N	D	G	s	L	K	т	v	R	s	v	F	v	I	D	P	ĸ	K	K	I	R	L	I	F	т	Y	P	s	т	v	G	R	N	т
S	Е	v	L	R	v	I	D	A	L	Q	L	т	D	ĸ	Е	G	v	V	т	P	I	N	W	Q	Ρ	A	D	D	v	I	I	Ρ	Ρ	s	v	s	N	D	Е
A	к	A	K	F	G	Q	F	N	E	I	K	P	Y	L	R	F	т	K	s	261 K																			
																			6		6	3																	
																2		30.	þ	e	5																		
						F	3					b	4		ĉ		t	2	2	F		1g		a	/														
						•			K	D	a_	h	-	7	7	Ġ	E.	20	2ª	Ś	V	Ĩ	414	1	_														
									2	6-	_	_	-	-	-	-	-	-	-				-	•	2														
			ar	nti	-P	rx	1																																
									2	6-	_			-	-	-								-															
											Contraction of the local distance																												

Figura 22. Importação de Prx1 em linhagens de levedura modificadas geneticamente. (A) Sequência de aminoácidos da proteína Prx1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Os possíveis sítios de clivagem das enzimas MPP e Oct1 baseados no estudo de Vögtle et al. (2011) estão indicados com setas. (B) *Western blot* de frações mitocondriais utilizando o anticorpo anti-Prx1. As linhagens analisadas foram: selvagem (WT), mutante nulo para a protease Oct1 ($\Delta OCT1$), mutante nulo $\Delta PRX1$ reexpressando o gene *PRX1* com a mutação pontual C38S (PRX1C38S), mutante nulo $\Delta PRX1$ reexpressando o gene *PRX1* com a mutação pontual C91S (PRX1C91S), mutante nulo da subunidade Imp1 do complexo IMP presente na membrana mitocondrial interna ($\Delta IMP1$) e mutante nulo da subunidade Imp2 do complexo IMP ($\Delta IMP2$). A linha vermelha foi adicionada com o objetivo de auxiliar a visualização da mudança de tamanho da proteína Prx1.

1

2 3

4

5 6

Um possível mecanismo pelo qual Prx1 ganha acesso ao espaço intermembrana seria através do mecanismo de liberação das proteínas na membrana interna, seguido de posterior clivagem pelo complexo IMP (Figura 6). O complexo IMP é composto por duas proteases (Imp1 e Imp2) localizadas na membrana interna (JAN et al., 2000; NUNNARI et al., 1993; SCHNEIDER et al., 1994). Os sítios catalíticos dessas proteases são expostos para o espaço intermembrana e atuam na clivagem da região hidrofóbica de proteínas precursoras que foram

lateralmente liberadas na bicamada lipídica da membrana interna. Portanto, a clivagem feita pelo complexo IMP libera as proteínas maduras no espaço intermembrana (BAUER et al., 1994; JAN et al., 2000; NUNNARI et al., 1993; SCHMIDT et al., 2010; SCHNEIDER et al., 1994).

Não há um consenso entre os sítios de clivagem das proteases Imp1 e Imp2, principalmente devido ao pequeno número de substratos dessas proteases descritos até o momento. Imp1 parece requerer um aminoácido acídico (D ou E) na posição -1 em relação ao sítio de clivagem e um aminoácido hidrofóbico não aromático na posição -3. Imp2 requer um resíduo de alanina nas posições -1 e -3 (LUO et al., 2006; NUNNARI et al., 1993; POVEDA-HUERTES et al., 2016; TEIXEIRA e GLASER, 2013). A análise da sequência de endereçamento de Prx1 demonstra a presença de um possível sítio de clivagem de Imp2 presente no interior do octapeptídeo clivado por Oct1 (aminoácidos destacados em vermelho na figura 22A). Consistente com essa predição, houve uma pequena diferença no tamanho da proteína Prx1 na linhagem $\Delta IMP2$ comparado com a linhagem WT (comparar canaletas 1 e 6 da figura 22B). Essa hipótese foi posteriormente confirmada pela ausência de marcação de Prx1 nas frações 3 e 4 do sobrenadante de um subfracionamento da linhagem mutante para a protease Imp2 (Figura 23). Estes resultados demosntram que a importação de Prx1 para o espaço inetermembrana é dependendete da clivagem catalisada pela protease Imp2.

A inativação da protease Oct1 não alterou a importação de Prx1 para a matriz mitocondrial (Figura 24). Novamente, a banda proteica referente à Prx1 no mutante $\triangle OCT1$ apresentou um tamanho ligeiramente maior em relação à linhagem WT, porém a proteína continuou sendo direcionada para a matriz mitocondrial. Portanto, a clivagem de Prx1 por Oct1 não interfere na importação e ou direcionamento de Prx1 para a matriz mitocondrial.

De acordo com as análises *in silico* feitas por Vögtle et al. (2009), as proteínas Trr2 e Trx3 não são substratos de Oct1 (Figura 25). Consistentemente com essas predições, ambas as proteínas não apresentaram diferenças de migração nas linhagens WT e *△OCT1* (Figura 24).

Para validar predições geradas por algoritmos, Vögtle et al. (2009) realizaram análises em escala proteômica de sequenciamento N-terminal das proteínas mitocondriais, porém algumas incertezas persistiram.

Especificamente, as proteínas Trr2 e Trx3 não tiveram boa representatividade nas análises proteômicas, enquanto Prx1 foi identificada 86 vezes. Dessa forma, houve maior confiabilidade em relação ao aminoácido da região N-terminal de Prx1 em relação às proteínas Trr2 e Trx3 que foram identificadas apenas 2 e 4 vezes, respectivamente. Isto pode ter causado incongruências como, por exemplo, o fato de que uma das versões de Trx3

identificadas (três vezes) inicia no resíduo de lisina 67 (Figura 25A). Isto parece pouco provável pelo fato de que aminoácidos essenciais para a atividade dessa enzima (cisteínas C55 e C58) estariam ausentes.



Figura 23. Subfracionamento mitocondrial da linhagem $\Delta IMP2$. As mitocôndrias foram isoladas da linhagem mutante nulo de IMP2 ($\Delta IMP2$) crescidas em meio fermentativo contendo galactose como fonte de carbono. As diferentes frações do subfracionamento mitocondrial foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando anticorpos indicados na figura. Mit – mitocôndria; Mpl – mitoplasto.

Análises preditivas utilizando o programa MitoProt II (CLAROS; VINCENS, 1996), indicaram um possível sítio de clivagem catalisado pela protease MPP entre os aminoácidos F20 e Q21 de Trx3p (Figura 25A). De fato, no estudo de Vögtle et al. (2011), uma das versões de Trx3 foi identificada iniciando no aminoácido de glutamina 21.

Não foi possível predizer o sítio de clivagem da pressequencia da proteína Trr2 utilizando o programa MitoProt II. O sítio de clivagem demonstrado na Figura 25B é apenas uma dedução feita manualmente com base na conservação da arginina na posição -2 em relação à proteína madura teórica e também no peso molecular observado nas análises de *western-blot*. Nesse caso, a massa molecular teórica da proteína Trr2, correspondente a uma sequência iniciando a partir da isoleucina 26 é 34,4 KDa. Isto condiz com o tamanho da banda identificada nas análises de *western-blot* (Figuras 21 e 24).



Figura 24. Subfracionamento mitocondrial das linhagens WT e $\Delta OCT1$. As mitocôndrias foram isoladas das linhagens selvagem (WT) e mutante nulo de *OCT1* ($\Delta OCT1$) crescidas em meio fermentativo contendo galactose como fonte de carbono. As diferentes frações do subfracionamento mitocondrial foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando anticorpos indicados na figura. Mit – mitocôndria; Mpl – mitoplasto.

A ausência de Oct1 também não alterou a importação das proteínas Trr2 e Trx3 para a matriz mitocondrial (Figura 24), o que já era esperado visto que essas proteínas não são substratos de Oct1.

Outra incerteza que persistiu mesmo depois do sequenciamento em escala proteômica de regiões N-terminais das proteínas está relacionada ao fato da sequencia de Prx1 madura se iniciar a partir da lisina 39, portanto, o resíduo de cisteína 38 não faz parte da proteína totalmente processada localizada na matriz. Isto contradiz o estudo realizado por Greetham e Grant (2009), no qual os autores propõem um importante papel desse resíduo de cisteína na formação de uma ligação dissulfeto entre dois monômeros da proteína.





Figura 25. Possíveis sítios de clivagem das proteínas Trr2 e Trx3 catalisado pela protease MPP. Sequência de aminoácidos das proteínas Trx3 (A) e Trr2 (B). O sítio de clivagem de Trx3 foi predito através do programa MitoProt II (CLAROS; VINCENS, 1996). O programa não foi capaz de predizer o sítio de clivagem de Trr2. O sítio indicado é uma dedução feita manualmente de acordo com a conservação do resíduo de arginina localizado na posição -2 em relação ao N-terminal da proteína.

Para obter maior confiabilidade em relação ao exato local onde Prx1 é clivada, complementando as análises globais feitas por Vögtle et al. (2009), a massa total de Prx1 purificada da mitocôndria foi avaliada. Para isto, uma versão recombinante de Prx1 fusionada com seis resíduos de histidina na região C-terminal foi expressa na levedura. Em seguida, as mitocôndrias foram isoladas e, após o rompimento das membranas mitocondriais, o sobrenadante obtido após ultracentrifugação foi submetido à cromatografia de afinidade a níquel. Análises de SDS-PAGE demonstraram que Prx1 foi eficientemente purificada a partir da fração mitocondrial (Figura 26A).



Figura 26. Purificação da proteína Prx1 da mitocôndria através de cromatografia de afinidade a níquel seguido de análise de espectrometria de massas. (A) As mitocôndrias foram purificadas a partir de células da linhagem WT crescidas em meio contendo glicerol como fonte de carbono. As mitocôndrias (2 mg) foram lisadas através da adição do detergente não iônico digitonina para uma concentração final de 1,2%. A mistura foi centrifugada a 40000 x g e o sobrenadante dessa centrifugação foi aplicado em coluna de cromatografia de afinidade a níquel de 1 mL. A purificação foi feita conforme recomendações do fabricante. Amostras de proteínas das diferentes etapas do protocolo foram separadas através de gel SDS-PAGE e coradas com comassie *blue*. Lane 1: proteínas mitocondriais totais, lane 2: lisado mitocondrial obtido após centrifugação a $30.000 \times g$, lane 3: proteína eluida da coluna de cromatografia a níquel. A seta indica a proteína obtida após a purificação. (B) Cromatograma da análise de espectrometria de massas referente à proteína Prx1 purificada da mitocôndria.

A proteína purificada foi submetida à análise de espectrometria de massas. A metodologia utilizada foi a ionização da proteína inteira, sem a necessidade de digestão peptídica. A análise de espectrometria de massas demonstrou a presença de um pico com razão massa/carga (m/z) de 26273,8 (Figura 26B). A massa teórica calculada para Prx1 iniciando no aminoácido K39 é de 26216,7. Estes resultados indicam que Prx1 totalmente processada inicia no resíduo de K39, corroborando os dados globais de Vögtle et al. (2009). Porém, a diferença entre o valor experimental e o teórico é relativamente alta (57,1 unidades de massa) e a natureza do aminoácido N-terminal deverá ser confirmada através de sequenciamento de Edman.

4.4 Papel funcional da clivagem de Prx1 catalisada pela protease Oct1

Na sessão anterior foi demonstrado que Prx1 é clivada pela protease Oct1 in *vivo*. A seguir, o papel funcional desse processamento foi investigado.

Vögtle et al. (2011) demonstraram que a clivagem de Oct1 promove um aumento da estabilidade proteica, convertendo os intermediários gerados por MPP em polipeptídeos mais estáveis. Entretanto, neste estudo, os autores avaliaram a estabilidade de apenas três substratos de Oct1, não incluindo Prx1.

Para investigar se a estabilidade de Prx1 é afetada devido à clivagem de Oct1, a meia vida das proteínas foram monitoradas *in organello*. Neste ensaio, mitocôndrias isoladas das linhagens WT, $\triangle OCT1$ e $\triangle OCT1+OCT1$ (mutante nulo de OCT1 reexpressando o gene OCT1) foram incubadas a 37 °C por diferentes períodos de tempo e os níveis de Prx1 foram avaliados através de *western-blot*.

De fato, os ensaios indicaram que a clivagem catalisada por Oct1 aumenta a estabilidade de Prx1 *in organello* (Figura 27). Os níveis proteicos de Prx1 com o decorrer do tempo foram significativamente menores na linhagem $\triangle OCT1$ comparado com a linhagem WT. Como controle do experimento, os níveis proteicos de CoxIV (componente do complexo respiratório IV) e porina (proteína de membrana externa) também foram monitorados. A proteína CoxIV também é substrato da protease Oct1 (BRANDA; ISAYA, 1995) e assim como Prx1, seus níveis proteicos foram significativamente reduzidos na linhagem $\triangle OCT1$. Por outro lado, os níveis da proteína porina, que não é substrato de Oct1, não foram alterados.



Figura 27. Ensaio de estabilidade das proteínas *in organello.* As mitocôndrias foram isoladas das linhagens WT, $\triangle OCT1 \in \triangle OCT1 + OCT1$ (mutante nulo de OCT1 reexpressando o gene OCT1) cultivadas em meio fermentativo contendo galactose como fonte de carbono. Após a quantificação, quantidades equivalentes de mitocôndrias foram incubadas em tampão SEM estéril a 37 °C por diferentes períodos de tempo. As mitocôndrias foram re-isoladas através de centrifugação a 13.000 x g por 20 minutos e ressuspendidas em tampão de amostra. Alíquotas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando anticorpos indicados na figura. O tempo 0, indica as amostras mitocondriais que não foram incubadas a 37 °C, sendo imediatamente misturadas com tampão de amostra.

O mutante nulo $\triangle OCT1$ apresenta um fenótipo de perda total do DNA mitocondrial, resultando em deficiência respiratória mitocondrial (ISAYA et al., 1994). Para discriminar se a redução dos níveis de Prx1 decorre unicamente da ausência da protease Oct1 e não do fenótipo de deficiência respiratória, o gene *OCT1* foi reexpresso no mutante nulo $\triangle OCT1$. A reexpressão de Oct1 restaurou os níveis de Prx1 semelhante à linhagem selvagem, indicando que a instabilidade de Prx1 decorre unicamente da ausência da clivagem catalisada pela protease Oct1. O mesmo ocorreu para CoxIV que, conforme mencionado anteriormente, também é substrato de Oct1 (Figura 27).

Apesar das proteínas Trx3 e Trr2 não serem clivadas por Oct1, suas estabilidades também foram avaliadas. Curiosamente, Trx3 e Trr2 apresentaram uma redução dos níveis proteicos na linhagem $\triangle OCT1$ comparado às linhagens WT e $\triangle OCT1+OCT1$ (Figura 27), mesmo não sendo substratos dessa protease (Figuras 23, 24 e VÖGTLE et al., 2011).

Possivelmente, algum efeito indireto associado a instabilidade de algum substrato de Oct1 na linhagem $\triangle OCT1$ deve estar associada a perda de estabilidade de Trx3 e Trr2.

As proteases MPP e Oct1 são altamente conservadas ao longo da evolução. Dessa forma, com o objetivo de verificar se Oct1 catalisa a clivagem de Prxs mitocondriais de mamíferos, inicialmente foi feito um alinhamento do sítio de clivagem das proteínas substratos de Oct1 descritas até o momento. Usando informações do banco de dados de proteases MEROPS (RAWLINGS et al., 2014) e dos trabalhos citados no Quadro 8 foi possível criar um consenso dos aminoácidos presentes nos sítios de clivagem de Oct1(Figura 28A).

Conforme demonstrado na Figura 28A, o sítio de clivagem da protease MPP possui uma arginina altamente conservada na posição -10 em relação ao N-terminal maduro das proteínas (aminoácido +1). No entanto, tomando como referência o sítio de clivagem de MPP, a arginina está presente na posição -2, condizente com os dados da literatura (BRANDA; ISAYA, 1995; MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2009, VÖGTLE et al., 2011). Atualmente, há apenas duas variações nessa posição, com Prx1 tendo uma lisina e Imu32 uma cisteína (Quadro 8).

A posição -8 do sítio de clivagem de Oct1 também se mostrou altamente conservada contendo aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, leucina e isoleucina. Estes dados demonstram o elevado nível de conservação dos sítios de clivagem das proteases MPP e Oct1, uma vez que o motivo de aminoácidos consenso foi feito com sequencias de proteínas que vão da levedura ao homem.

A geração de um motivo de clivagem consenso permitiu fazer a predição se as peroxirredoxinas mitocondriais humanas podem ser clivadas por Oct1. Células humanas expressam duas peroxirredoxinas mitocondrias, denominadas Prx3 e Prx5. Ambas apresentam mecanismo de catálise do tipo 2-Cys-Prxs e os respectivos aminoácidos N-terminal dessas enzimas foram determinados experimentalmente (COX, et al., 2010; VACA JACOME et al., 2015).

Conforme demonstrado na figura 28B, apenas Prx3 possui uma elevada possibilidade de ser clivada por Oct1. Prx3 possui um resíduo hidrofóbico na posição -8 (fenilalanina) e apesar de não possuir uma arginina na posição -10, possui uma lisina, aminoácido este, aceitável nessa posição. Curiosamente, a peroxirredoxina de levedura Prx1 também possui uma lisina na posição -10.

	Sítios de Clivagem							
Proteína	MPP Oct1	Organismo	Fonte					
Cox4	₁₆ RTLCSSRYLL <mark>Q</mark> 26	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Cpr3	11 RLFSNSASRL<mark>G</mark>21	Saccharomyces cerevisiae	Vögtle et al. (2009)					
Lpd1	12 RAFSSTVRTL<mark>T</mark>22	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Mdh1	₈ RAFSSTVANP <mark>Y</mark> ₁₈	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Mrp21	15 RGFTTIDCLR<mark>Q</mark>25	Saccharomyces cerevisiae	Vögtle et al. (2009)					
Mrps28	24 RSFVSSPVSN<mark>S</mark>34	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Prx1	29 KTFATAPILC<mark>K</mark>39	Saccharomyces cerevisiae	Vögtle et al. (2009)					
Rim1	₈ RFFHATTKKM <mark>D</mark> 18	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Rip1	21 RLI SQSLLAS <mark>K</mark> 31	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Rsm24	21 RVLTMSRCLN<mark>S</mark>31	Saccharomyces cerevisiae	Vögtle et al. (2009)					
Sdh1	19 RTFTSSALVR<mark>Q</mark>29	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Tuf1	₂₉ RTFSQTTTSY <mark>A</mark> 39	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Ysa1	₁₅ RLFRTMSTVK <mark>G</mark> 25	Saccharomyces cerevisiae	Vögtle et al. (2009)					
Imo32	₃₇ CAFHSLAKVL <mark>Q</mark> 47	Saccharomyces cerevisiae	Vögtle et al. (2011)					
Hem15	₂₂ RSFSVTFNMQ <mark>N</mark> 23	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Idp1	7 RLFSTSRLAA<mark>F</mark>18	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Pet122	16 RILLSSLNGK<mark>M</mark>27	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
Mrpl120	₉ RSFHTAGSAW <mark>K</mark> 20	Saccharomyces cerevisiae	Branda e Isaya (1995)					
csr-1	₃₅ RAFSQTSSIM <mark>S</mark> 46	Neurospora crassa	Hendrick et al. (1989)					
NCU06606	23 RALTTSTALQ<mark>G</mark>34	Neurospora crassa	Hendrick et al. (1989)					
OTC	₂₃ RNFRYGKPVQ <mark>S</mark> 34	Rattus norvegicus	Sztul et al. (1987)					
MDH1	₁₅ RSFSTSAQNN <mark>A</mark> 26	Rattus norvegicus	Hendrick et al. (1989)					
OTC	₂₃ RHFWCGKPVQ <mark>S</mark> 34	Mus musculus	Hendrick et al. (1989)					
MDH2	₁₅ RSFSTSAQNN <mark>A</mark> 26	Mus musculus	Hendrick et al. (1989)					
ATP5A1	₃₄ RNFHASNTHL <mark>Q</mark> 45	Homo sapiens	Gevaert et al. (2003)					
ATP5O	14 RCFSTSVVRP<mark>F</mark>25	Homo sapiens	VanDamme et al. (2005)					
ATP5J	23 RNIGVTAVAFN 34	Homo sapiens	VanDamme et al. (2005)					
NDUFV2	23 RNLHKTVMQNG34	Homo sapiens	VanDamme et al. (2005)					
OTC	23 RNFRCGQPLQN34	Homo sapiens	Hendrick et al. (1989)					
HSPD1	16 RVLAPHLTRA<mark>Y</mark>27	Homo sapiens	Gevaert et al. (2003)					

Quadro 8 - Proteínas clivadas pela protease Oct1 descritas até o momento

Nota: As setas representam os sítios de clivagem das proteases MPP e Oct1. Os aminoácidos destacados em cinza representam aminoácidos altamente conservados localizados nos sítios de clivagem de MPP. Para simplificação apenas a região dos sítios de clivagens das proteases MPP e Oct1 está sendo demonstrada. O número a esquerda da sequência subscrito indica o posição da arginina altamente conservada em relação à sequência precursora. O número a direita subscrito indica a posição do aminoácido N-terminal (destacados em azul claro) em relação à sequência precursora.



Figura 28. Aminoácidos presentes nos sítios de clivagem das proteases mitocondriais MPP e OCT1.(A) Sequencia consenso dos aminoácidos dos sítios de clivagem das proteases mitocondriais MPP e Oct1. As sequências de aminoácidos das proteínas substratos de Oct1 descritas no Quadro 8 foram utilizadas para a geração do motivo consenso através do programa weblogo (logo@compbio.berkeley.edu). (B) Esquema dos aminoácidos localizados próximos da região N-terminal das peroxirredoxinas mitocondriais humanas Prx3 e Prx5. A indicação da região N-terminal madura é baseada no trabalho de Vaca Jacome et al., (2015). Um possível octapeptídeo que seria clivado pela protease Oct1 está realçado por um retângulo. Os aminoácidos localizados a montante do N-terminal maduro estão identificados com números negativos.

O alinhamento da sequencia de endereçamento mitocondrial de diversas peroxirredoxinas 3 de mamíferos revelou a presença de aminoácidos conservados nas possíveis regiões de clivagem das proteases MPP e Oct1 (Figura 29). Os aminoácidos presentes no interior do possível octapeptídeo removido por Oct1 se mostraram serem mais conservados em relação ao restante da sequencia de endereçamento. A fenilalanina presente na posição -8 em relação ao sítio de clivagem de Oct1 se mostrou conservada em todas as sequências analisadas. Além disso, os aminoácidos serina ou treonina se mostraram dominantes nas posições -5, -6 e -7. Estes resultados indicam que muito provavelmente as peroxirredoxinas 3 mitocondriais de mamíferos são clivadas por Oct1.



Figura 29. Alinhamento da sequência de aminoácidos presentes na região de endereçamento mitocondrial das peroxirredoxinas 3 de
mamíferos. As sequências foram obtidas do banco de dados UniProt (http://www.uniprot.org/). As sequências de aminoácidos de Prx3 de Homo
sapiens, Gorilla gorilla gorilla, Pan troglodytes, Pongo abelli, Nomascus leucogenys, Papio anubis, Chlorocebus sabaeus, Macaca mulata,
Callithrix jacchus, Boris taurus, Ovis aries, Felis catus, Ailuropoda melanoleuca, Canis lupus familiares, Equus caballus, Sus scrofa, Myotis
lucifugus, Ictidomys tridecemlineatus, Loxodonta africana, cavia porcelus, Rattus novergicus, Mus musculus, Sarcophilus harrisii foram
alinhadas usando o programa Jalview (Waterhouse et al., 2009).

Para confirmar se Prx3 humana é clivada pela protease Oct1 *in vivo*, células da levedura selvagem (WT) e mutante nulo de *OCT1* ($\Delta OCT1$) foram transformadas com um plasmídeo expressando Prx3 humana. O anticorpo anti-Prx3 reconheceu uma banda apenas nas frações mitocondriais das linhagens de levedura que expressam Prx3 (Figura 30). Isto indica que a proteína humana está sendo corretamente direcionada para a mitocôndria da levedura.



Figura 30. A peroxirredoxina humana Prx3 é clivada pela protease Oct1 de levedura. *Western blot* de frações mitocondriais utilizando o anticorpo anti-Prx3 humana. As linhagens analisadas foram: selvagem expressando o gene *PRX3* humano (WT +PRX3), mutante nulo para a protease Oct1 expressando o gene *PRX3* humano ($\Delta OCT1 + PRX3$) e selvagem carregando o plasmídeo vazio (WT).

Ao comparar o tamanho da banda de Prx3 nas linhagens WT e $\triangle OCT1$ observa-se um tamanho ligeiramente maior na linhagem $\triangle OCT1$ (Figura 30), provavelmente decorrente da ausência da clivagem de oito aminoácidos por Oct1. Portanto, Prx3 humana é clivada por Oct1 de levedura, confirmando o elevado nível de conservação desse mecanismo de processamento mitocondrial. Essa é a primeira evidência apresentada para o processamento de Prxs humanas por Oct1.

Assim como determinado para Prx1, a estabilidade de Prx3 foi avaliada *in organello* nas linhagens WT+*PRX3* e $\triangle OCT1+PRX3$ (Figura 31). Curiosamente, a estabilidade de Prx3 na linhagem $\triangle OCT1$ foi maior do que na linhagem WT. A reexpressão de Oct1 na linhagem $\triangle OCT1+PRX3+OCT1$ não alteou os níveis de Prx3 comparado à linhagem $\triangle OCT1+PRX3$. Estes resultados são distintos aos observados para a proteína Prx1 de levedura, onde os níveis proteicos foram significativamente menores na linhagem $\Delta OCTI$. Além disso, a estabilidade de Prx3 humana foi significativamente menor na linhagem WT comparado às demais linhagens. Estes resultados indicam que Prx3 humana possui curto tempo de meia vida quando expressa em células de levedura. O aumento de sua estabilidade nas linhagens $\Delta OCTI+PRX3$ e $\Delta OCTI+PRX3+OCTI$ possivelmente é decorrente do fenótipo de perda do mtDNA dessas linhagens. A clivagem de Prx3 humana por Oct1 de levedura não alterou sua estabilidade.



Figura 31. Ensaio de estabilidade de Prx3 *in organello.* As mitocôndrias foram isoladas das linhagens WT + Prx3 e $\triangle OCT1$ + Prx3 cultivadas em meio fermentativo contendo galactose como fonte de carbono. Após a quantificação, quantidades equivalentes de mitocôndrias foram incubadas em tampão SEM estéril a 37 °C por diferentes períodos de tempo. As mitocôndrias foram re-isoladas através de centrifugação a 13000 x g por 20 minutos e ressuspendidas em tampão de amostra. Alíquotas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando o anticorpo anti-Prx3.

Mais estudos são necessários para entender essa estabilidade advinda do processamento por Oct1. Entre outros aspectos, a identificação de proteases envolvidas na degradação de proteínas não processadas por Oct1 é desejável.

4.5 Efeitos da clivagem de Oct1 sobre a atividade peroxidásica de Prx1

Para investigar se a clivagem catalisada por Oct1 afeta a atividade peroxidásica de Prx1, proteínas Prx1 recombinantes foram produzidas em *Escherichia coli*, representando a forma clivada e não clivada por Oct1. Para a versão de Prx1 clivada por Oct1, a proteína foi construída a partir da lisina 39 e será denominada Prx1-K39. Para a versão não clivada por Oct1, Prx1 foi construída a partir da fenilalanina 31 (sítio de clivagem catalisada por MPP) e

será denominada Prx1-F31. Ambas as proteínas foram produzidas em fusão com cauda de histidina na região C-terminal o que auxilia sua purificação em coluna cromatográfica de afinidade a metais. A construção dessas proteínas recombinantes foi feita em colaboração com o aluno de iniciação científica Eduardo Tassoni (IB-USP).

A atividade peroxidásica de Prx1 foi monitorada através do decaimento da absorbância do NADPH a 340 nm, em ensaio acoplado ao sistema Trx mitocondrial. Nesse ensaio, a atividade peroxidásica de Prx1 é suportada por elétrons fornecidos por Trx3. Trx3 por sua vez é reduzida pela tiorredoxina redutase 2 (Trr2) que inicialmente foi reduzida pelo NADPH.

As purificações das enzimas recombinantes produziram grandes quantidades de proteínas com elevado grau de pureza (Figura 32).



Figura 32. Purificação das proteínas recombinantes. Gel de SDS-PAGE corado com *comassie* blue demonstrando as purificações das enzimas utilizadas nos ensaios de atividade peroxidásica *in* vitro.

Utilizando diferentes concentrações de H_2O_2 foi possível determinar os parâmetros cinéticos para as duas isoformas de Prx1 (Tabela 1). Ambas as enzimas apresentaram valores similares de eficiência catalítica (k_{cat} / K_m) para o H_2O_2 . No entanto, a isoforma curta apresentou valores significativamente maiores, especialmente relacionados ao "*turnover*" (k_{cat}). Porém as diferenças nas propriedades enzimáticas foram muito pequenas e provavelmente não interferem com a função de Prx1. Possivelmente, a forma de Prx1 não

processada por Oct1 apresenta uma instabilidade advinda de outras proteases mitocondriais ainda não identificadas.

Substrato	Prx1-K39								
Substrato	K _m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/\mathbf{K}_m					
	μM	$mmol min^{-1}$	min^{-1}	M^{-1} min ⁻¹					
H_2O_2	5.2 ± 0.4	9.9 ± 0.1	1.98 ± 0.02	3,8 . (± 0.3) 10 ⁵					
Substrato		Prx	:1-F31						
Substrato	K _m	Prx V _{max}	k 1-F31	k_{cat}/\mathbf{K}_m					
Substrato .	K_m μM	Prx V _{max} mmol min ⁻¹	1 -F31 k _{cat} min ⁻¹	k_{cat}/\mathbf{K}_m $M^{-1}min^{-1}$					

Tabela	1 –	Propriedades	cinéticas	das	proteínas	Prx1	processada	(Prx1-K39)	e	não
processa	nda (Prx1-F31) pela	a protease	Oct	1.					

4.6 A função de Prx1 na manutenção da atividade mitocondrial

Com o intuito de elucidar o papel de Prx1 na manutenção da função mitocondrial, os níveis de expressão dessa peroxidase foram avaliados em diferentes condições de crescimento. Trabalhos anteriores demonstraram através de *Northern blotting* que a expressão do gene *PRX1* é fortemente reprimida por glicose (MONTEIRO; NETTO, 2004; MONTEIRO et al., 2002). Para ampliar estes estudos, os níveis proteicos de Prx1 foram monitorados em diferentes situações metabólicas, incluindo: 4 diferentes fontes de carbono (glicose, galactose, glicerol/etanol e lactato), três fases distintas de crescimento (fase fermentativa inicial, fase fermentativa tardia e fase estacionária) e exposição ao H₂O₂ exógeno.

Como esperado, a glicose inibiu fortemente a expressão de Prx1 nas fases iniciais de crescimento (Figura 33, canaletas 1 e 2). O mesmo ocorreu com a proteína porina, utilizada como marcador da biogênese mitocondrial. Estes resultados corroboram os dados da literatura demonstrando que a glicose é um forte repressor da biogênese mitocondrial (ZAMAN et al., 2008). Por outro lado, ocorreu forte expressão de porina na fase estacionária de crescimento em glicose (canaleta 3), indicando que o etanol acumulado durante a fermentação da glicose é

utilizado no metabolismo respiratório mitocondrial. Os níveis de Prx1 aumentaram paralelamente aos níveis de porina, indicando que esta enzima é sintetizada durante a biogênese de mitocôndrias. A proteína Pgk1, uma enzima da via glicolítica, foi utilizada como controle de carregamento das proteínas no gel.



Figura 33. Expressão de Prx1 em diferentes fontes de carbono e fases de crescimento. As células foram crescidas em diferentes períodos de tempo e após atingir a Abs_{600} desejada, extratos proteicos totais foram preparados utilizando quantidades equivalentes de células. As proteínas foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando os anticorpos indicados na figura. a: fase inicial de crescimento exponencial ($Abs_{600} = 1$), b: fase intermediária de crescimento exponencial ($Abs_{600} = 2$) e c: fase de crescimento estacionaria ($Abs_{600} > 2$). Para o tratamento com H₂O₂, culturas celulares com uma $Abs_{600} = 1$ foram cultivadas por 1 hora na presença de 0,5 mM de H₂O₂.

Na presença de galactose, etanol/glicerol e ou lactato como fontes de carbono, Prx1 foi expressa em todas as fases de crescimento apresentado um leve aumento de expressão na fase estacionária de crescimento. Nessas fontes de carbono, houve elevada expressão de porina indicando um aumento da biogênese mitocondrial (canaletas 4 à 12).

A exposição das células com 0,5 mM de H_2O_2 na fase fermentativa inicial de crescimento resultou na indução da expressão de Prx1 na presença de glicose (canaleta 13). Nas outras fontes de carbono não houve um aumento significativo da expressão de Prx1 após a exposição ao H_2O_2 . Além disso, não houve um aumento da expressão de Prx1 em células desprovidas de DNA mitocondrial (*rho^o*) na fase fermentativa inicial de crescimento em

glicose (canaleta 17). Os resultados descritos acima indicam que Prx1 é expressa paralelamente com a biogênese mitocondrial ou durante a exposição das células ao H_2O_2 . Em outras palavras, a indução de Prx1 por H_2O_2 se sobrepõe a repressão por glicose.

Após verificar em quais condições metabólicas Prx1 é expressa, procurou-se avaliar o envolvimento de Prx1 na resposta ao estresse oxidativo exógeno. Para isto, células WT e $\Delta PRX1$ foram pré-cultivadas até a fase estacionária de crescimento nos meios contendo glicose ou etanol/glicerol como fontes de carbono. Em seguida, as células foram crescidas em placas de meio sólido contendo glicose ou etanol/glicerol como fonte de carbono e concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (Figura 34). Contrário a trabalhos anteriores (GREETHAM; GRANT, 2009; PEDRAJAS et al., 2000) que utilizaram meio rico YPD para o crescimento das células, nesse trabalho utilizou-se o meio sintético completo (SD). A ressalva frente ao meio rico YPD decorre de que este contem grandes quantidades de peróxidos e glutationa (GSH) os quais poderiam interferir no fenótipo de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio.

A - glicose





Figura 34. Sensibilidade dos mutantes nulos $\Delta PRX1$, $\Delta TRR2$ e $\Delta TRX3$ ao estresse oxidativo exógeno causado pelo peroxido de hidrogênio. A tolerância ao estrese oxidativo exógeno foi verificada através da capacidade de crescimento em meio mínimo suplementado com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As células foram pré-cultivadas até a fase de crescimento estacionaria em meio mínimo contendo fonte de carbono fermentável (glicose) ou respiratória (etanol/glicerol). Em seguida, as culturas foram diluídas em agua estéril para uma O.D.₆₀₀ final = 1 e submetidas a posteriores diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴. Um volume de 3 µL das diferentes diluições foi adicionado nas placas de meio sólido contendo concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio. As células foram crescidas por 3 dias a 30 °C e posteriormente documentadas.

Em meio fermentativo contendo glicose como fonte de carbono, o mutante $\Delta PRXI$ apresentou severo defeito de crescimento na presença de 2 mM de H₂O₂ quando comparado com a linhagem WT. Já em meio respiratório, a concentração de 1 mM de H₂O₂ foi suficiente para causar elevado defeito de crescimento. Dessa forma, conclui-se que o mutante $\Delta PRXI$ apresenta defeitos de crescimento somente quando desafiado com concentrações elevadas de H₂O₂, sendo esse fenótipo mais proeminente quando as células são crescidas em meio respiratório (Figura 34).

Em relação às deleções individuais dos genes *TRR2* e *TRX3*, o fenótipo de sensibilidade ao H₂O₂ foi observado somente para a linhagem mutante $\Delta TRR2$. Em meio contendo glicose, o defeito de crescimento do mutante $\Delta TRR2$ foi ligeiramente menor em comparação com $\Delta PRX1$. Por outro lado, em meio respiratório (etanol/glicerol) os dois mutantes ($\Delta PRX1$ e $\Delta TRR2$) apresentaram um fenótipo muito semelhante. A deleção de *TRX3* não causou nenhuma deficiência de crescimento.

Em adição aos mutantes simples ($\Delta PRX1$, $\Delta TRR2$ e $\Delta TRX3$), foram construídos mutantes duplos através da deleção do gene *PRX1* nos mutantes $\Delta TRR2$ e $\Delta TRX3$. A deleção do gene *PRX1* foi verificada através de *western-blot* utilizando extratos proteicos dos diferentes mutantes (Figura 35). Em seguida foram realizados novos ensaios de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio utilizando os mutantes simples e duplos (Figura 36).



Figura 35. Confirmação da construção dos duplos mutantes. Extratos proteicos totais foram preparados utilizando quantidades equivalentes de células. As proteínas foram separadas em gel de SDS-PAGE seguido de *western-blot* utilizando o anticorpo anti-Prx1.





Novamente, o mutante simples $\Delta PRX1$ demonstrou um severo defeito de crescimento na presença de 2 mM H₂O₂ em ambos os meios de cultivo. Nesse segundo experimento, o mutante $\Delta TRR2$ apresentou um crescimento semelhante ao mutante $\Delta PRX1$ em meio contendo glicose (no primeiro experimento, $\Delta PRX1$ foi ligeiramente mais sensível em relação à $\Delta TRR2$). Já em meio respiratório, ambos os mutantes $\Delta TRR2$ e $\Delta PRX1$ tiveram um crescimento muito parecido na presença de 1 mM de H₂O₂. No entanto, em elevadas concentrações de H₂O₂ (2 mM – não testado no experimento anterior) o mutante $\Delta TRR2$ demonstrou uma menor viabilidade em relação ao mutante $\Delta PRX1$. Isto ficou mais evidente após deixar as placas crescendo por dois dias adicionais (Figura 36C).

Em ambos os meios de cultivo, o duplo mutante $\Delta PRX1\Delta TRX3$ apresentou um fenótipo semelhante ao mutante simples $\Delta PRX1$, indicando que a ausência de TRX3 não intensifica o defeito de crescimento do mutante simples $\Delta PRX1$. Por outro lado, o duplo mutante $\Delta PRX1\Delta TRR2$ se mostrou significativamente mais sensível em relação aos mutantes simples $\Delta PRX1$ e $\Delta TRR2$, indicando um efeito sinérgico das proteínas Trr2 e Prx1 na tolerância ao estresse oxidativo.

Em meio contendo glicose, o duplo mutante $\triangle OCT1 \triangle PRX1$ apresentou um crescimento semelhante ao mutante simples $\triangle OCT1$ ($\triangle OCT1$ é incapaz de crescer em meio respiratório devido à perda completa do DNA mitocondrial (ISAYA et al., 1994). Isto indica que a ausência de Prx1 não intensificou o defeito de crescimento do mutante simples $\triangle OCT1$.

Em resumo, é possível concluir que as proteínas Trr2 e Prx1 desempenham um importante papel na manutenção da homeostase redox mitocondrial. Em condições de crescimento respiratório e elevadas concentrações de H_2O_2 , Trr2 se mostrou ainda mais necessária do que Prx1.

Como demonstrado anteriormente, a inativação de Prx1 não prejudica o crescimento das células em condições basais de crescimento. Portanto, a inativação isolada dessa peroxidase, em princípio, não causaria nenhum prejuízo para a função da mitocôndria. Por outro lado, estudos tem reportado que esta enzima atua eficientemente na redução do H₂O₂ (GREETHAM; GRANT, 2009; PEDRAJAS et al., 2000; 2010; 2016). Sendo assim, procurou-se determinar a produção de H₂O₂ em suspensões de mitocôndrias isoladas das linhagens WT e $\Delta PRX1$.

A produção de H_2O_2 em suspensões mitocondriais foi monitorada fluorometricamente através da oxidação da sonda Amplex Red, ao qual, na presença da proteína peroxidase de raiz forte (HRP), reage com o H_2O_2 em uma estequiometria de 1:1, produzindo um composto altamente fluorescente, a resorufina. A respiração mitocondrial foi induzida através da adição de etanol 1%. O etanol é oxidado a acetaldeído através da enzima álcool desidrogenase Adh, localizada na matriz mitocondrial, gerando a coenzima reduzida NADH. O NADH transfere os elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial através da NADH desidrogenase interna.

A taxa de liberação de H_2O_2 nas suspensões mitocondriais da linhagem mutante $\Delta PRXI$ foi significativamente maior em relação à linhagem selvagem WT (Figura 37). Por outro lado, apesar do mutante $\Delta OCTI$ ter liberado mais peróxido que a linhagem WT, sua produção foi menor em relação ao mutante $\Delta PRXI$. Conforme citado anteriormente, o mutante $\Delta OCTI$ possui um fenótipo de deficiência respiratória devido à perda completa do DNA mitocondrial. Portanto, a produção de H_2O_2 nesse mutante parece ser independente da cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que quatro subunidades da cadeia respiratória (Cox1, Cox2, Cox3 e Cob1) são codificadas pelo mtDNA. Por outro lado, os genes nucleares que codificam compontes da cadeia respiratória contem cofatores com propriedades redox (como flavinas e centros ferro-enxofre), portanto, capazes de gerar H_2O_2 .



Figura 37. Liberação de H_2O_2 em suspensões mitocôndrias. A determinação da liberação de H_2O_2 em suspensões mitocondriais (20 µg/mL) das linhagens indicadas na figura foi feita através de medições fluorométricas (λ_{ex} 570 nm, λ_{em} 585 nm) da oxidação da sonda AmplexRed. A respiração mitocondrial foi induzida através da adição de etanol 1%. A parte de cima da figura representação gráfica da produção do H_2O_2 ao longo do tempo.

Alternativamente, a flavoenzima dihidrolipoil desidrogenase poderia ser responsável pela geração de quantidades significativas de EROs mitocondriais (TAHARA et al., 2007). A ausência de Prx1 no duplo mutante $\triangle OCT1 \triangle PRX1$ desencadeou um aumento na produção de H₂O₂ comparado ao mutante simples $\triangle OCT1$. Por outro lado, o fato da geração de H₂O₂ no duplo mutante $\triangle OCT1 \triangle PRX1$ ser menor do que no mutante simples $\triangle PRX1$ pode ser devido a algum efeito compensatório ainda não compreendido. De qualquer forma, os resultados apresentados acima indicam que Prx1 é responsável pela redução de grandes quantidades do H₂O₂ mitocondrial.

5. DISCUSSÃO

A mitocôndria desempenha um papel central na manutenção da homeostase celular, possuindo funções bioenergéticas, biossintéticas e sinalizadoras (CHANDEL, 2014; 2015). Por outro lado, o metabolismo energético mitocondrial é considerado a principal fonte intracelular de EROs das células eucarióticas (BALABAN et al., 2005; FIGUEIRA et al., 2013; FISCHER et al., 2012; HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; KOWALTOWSKI et al., 2009; MURPHY, 2009). A oxidação de biomoléculas devido a ação das EROs tem sido apontado como uma das principais causas da disfunção mitocondrial. A perda da atividade mitocondrial, por sua vez, está diretamente relacionada com a progressão de inúmeros quadros patológicos, incluindo doenças neurodegenerativas e o próprio envelhecimento (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012).

Apesar dos efeitos "maléficos" das EROs existe uma crescente apreciação de que estas moléculas, especificamente o H₂O₂, possuem funções "benéficas", atuando como mediadores da sinalização intracelular (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014). De fato, existem complexos proteicos celulares que catalisam a síntese do O_2^{-7} , conhecidos como NADPH oxidases ou simplesmente NOX (AGUIRRE; LAMBETH, 2010). NOX1, por exemplo, é ativada como parte de diversas vias de sinalização, incluindo citocinas como o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BAE et al., 1997; SUNDARESAN et al., 1995). O H₂O₂ derivado da dismutação do O₂⁻⁻ produzido por NOX1, atua diretamente na regulação da atividade de componentes da via de sinalização do EGF e PDGF (MENG et al., 2002).

Dessa forma, O_2^{-} e H₂O₂ produzido pelas NADPH oxidases desempenham um importante papel na sinalização celular. Por outro lado, existem evidências de que as EROs geradas na mitocôndria (mtEROs) não são apenas deletérias, podendo também atuar na sinalização celular (HAMANAKA; CHANDEL, 2010; MURPHY et al., 2011; SENA;CHANDEL, 2012). Especificamente a produção do O₂⁻⁻ pelo complexo respiratório III parece atuar na sinalização da resposta a adaptação a hipóxia (BELL et al., 2007; CHANDEL et al., 1998; CHANDEL et al., 2000; EMERLING et al., 2009; GUZY; SCHUMACKER, 2006; WAYPA et al., 2006). Portanto, a regulação dos níveis de mtEROs é de fundamental importância para o funcionamento adequado da mitocôndria assim como sua capacidade de atuar na sinalização celular. Em principio, os níveis de mtEROs podem ser regulados de três maneiras: 1) regulação da produção; 2) regulação da eliminação e 3) regulação da localização (SENA; CHANDEL, 2012). A eliminação das mtEROs é catalisada por elaborados sistemas enzimáticos presentes nos diferentes compartimentos mitocondriais (HERRERO et al., 2008; MORANO et al., 2012; MURPHY, 2012; TOLEDANO et al., 2013). Nos últimos anos, enzimas antioxidantes mitocondriais de diversos organismos foram extensivamente estudas e caracterizadas *in vitro*. No entanto, há um limitado conhecimento sobre os mecanismos de importação e regulação das atividades enzimáticas *in vivo*.

Este trabalho apresenta uma caracterização detalhada dos mecanismos de importação mitocondrial das enzimas Trr2, Trr3 e Prx1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os ensaios de solubilidade das proteínas mitocondriais demonstram que essas enzimas se associam fracamente com as membranas mitocondriais, sendo extraídas com solução alcalina de carbonato de sódio (Figura 18). Por outro lado, os experimentos de sub-fracionamento mitocondrial indicam um perfil de distribuição submitocondrial específico para cada uma das três enzimas. Ambas as enzimas apresentaram marcação nas quatro frações do *pellet* obtido durante o protocolo de sub-fracionamento (Figuras 19, 20 e 21). Isto é condizente com o perfil de marcação de uma proteína de matriz mitocondrial. No entanto, a enzima Prx1 também apresentou marcação nas frações 3 e 4 do sobrenadante (Figura 21). A marcação na fração 3 do sobrenadante é consistente para proteínas solúveis localizadas no espaço intermembrana, como é o caso do citocromo b2 (Cyt. b2). Tal marcação deveria desaparecer na fração 4 devido a ação da proteinase K. Porém, de maneira inesperada, a proteína Prx1 apresentou marcação na fração 4 do sobrenadante, indicando que a mesma é resistente à ação da proteinase K.

Com base nos experimentos citados acima podemos concluir:

a) Trx3 e Trr2 estão localizadas na matriz mitocondrial associadas fracamente com a membrana mitocondrial interna.

b) Prx1 apresenta dupla localização. A enzima se associa fracamente com a membrana mitocondrial interna com face voltada para a matriz mitocondrial e também está presente no espaço intermembrana, como uma proteína solúvel.

A resistência à degradação frente à proteinase K da enzima Prx1 (Figura 21) não está totalmente entendida. Uma possível explicação é a possibilidade de Prx1 assumir uma estrutura quaternária hexamérica. Recentemente, Pedrajas et al. (2016) propuseram que a cisteína catalítica de um dos monômeros de um dímero de Prx1 forma uma ligação dissulfeto com outra cisteína catalítica de um monômero de um segundo dímero. As ligações dissulfetos poderiam ser formadas entre três dímeros de Prx1, originando uma estrutura hexamérica (Figura 14). Tal estrutura poderia representar uma barreira estrutural contra a ação da

proteinase K. Porém até o momento nenhuma abordagem estrutural como espectrometria de massas ou cristalografia de raio X produziu evidencias da formação de uma ponte dissulfeto entre duas C_P em 1-Cys Prx que sem encontram enterradas na cadeia polipeptídica (CHOI et al., 1998).

A associação das enzimas Prx1, Trr2 e Trx3 com a membrana mitocondrial interna poderia garantir a eficiente redução do H_2O_2 produzido pela cadeia respiratória mitocondrial (Figura 10). Nesse sentido, o H_2O_2 gerado nas proximidades da membrana interna seria rapidamente reduzido por Prx1, evitando assim a geração do radical hidroxila e, consequentemente, os danos à membrana interna.

Ukai et al. (2011) demonstraram que a glutationa peroxidase 2 (Gpx2) apresenta dupla localização, sendo encontrada no citoplasma e na mitocôndria. Na mitocôndria a enzima encontra-se associada com a membrana externa (com face voltada para o citoplasma) e interna (com face voltada para a matriz). Porém os autores não investigaram o papel fisiológico de Gpx2 na manutenção da homeostase redox mitocondrial.

Prx1, Gpx2 e Ccp1 parecem desempenhar um importante papel na manutenção dos níveis de EROs mitocondriais. No compartimento da matriz, a ação das enzimas Prx1 e Gpx2 poderia garantir a eficiente redução de hidroperóxidos gerados próximos à membrana interna, evitando assim a oxidação de lipídeos. A cardiolipina é um fosfolipídio específico da membrana mitocondrial interna que possui uma função central na organização estrutural dos componentes proteicos inseridos na membrana (REN et al., 2014). A oxidação desse lipídeo tem sido apontada como uma das principais causas da disfunção mitocondrial (LUÉVANO-MARTÍNEZ et al., 2015; SHI, 2010; YIN; ZHU, 2012).

No espaço intermembrana, Ccp1 e Prx1 poderiam reduzir o H₂O₂ gerado nesse compartimento. Recentemente, Ccp1 foi demonstrada ser essencial para o crescimento de uma linhagem $\Delta 8$ de *S. cerevisiae*, ao qual não possui as cinco peroxirredoxinas e as três glutationa peroxidases (KAYA et al., 2015). A ausência das oito peroxidases (incluindo Prx1) desencadeou uma aneuploidia (segunda cópia) do cromossomo XI e consequente superexpressão do gene *CCP1* presente nesse cromossomo. A superexpressão de Ccp1 suportou a atividade removedora de peróxido permitindo o crescimento da linhagem $\Delta 8$ (KAYA et al., 2015). Prx1 e Ccp1 poderiam desempenhar um importante papel na redução do H₂O₂ gerado pela atividade da cadeia respiratória e pela ação de Ero1 (componente da via de importação acoplado a processo oxidativo) (Figuras 9 e 10).

A co-localização das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 em associação com a membrana mitocondrial interna indica uma possível interação entre elas *in vivo* durante o processo de

redução do H_2O_2 , conforme evidenciado em estudos anteriores (GREETHAM; GRANT, 2009; GREETHAM et al., 2013; PEDRAJAS et al., 2000).

O mecanismo de redução do ácido sulfênico de Prx1 permanece pouco entendido. Diversos mecanismos têm sido propostos baseados em estudos *in vitro* utilizando preparações proteicas puras obtidas de culturas bacterianas (Figura 14 ilustra o mecanismo proposto recentemente). No entanto, tem sido postulado que as reações redox *in vitro* possuem certas "promiscuidades" gerando informações que muitas vezes não demonstram o que ocorre *in vivo* (PEDRAJAS et al., 2010). Desta forma há a necessidade de por um lado de se aprofundar os estudos *in vivo*, procurando entender as interações proteicas que ocorrem no interior da mitocôndria. Por outro lado, uma caracterização cinética rigorosa e quantitativa das reações postuladas faz-se necessária.

Até o momento, há apenas um único estudo demonstrando uma interação proteica *in vivo* entre as proteínas Trx3 e Prx1 (GREETHAM et al., 2013). Essa interação só foi detectada após a mutação da cisteína de resolução da tiorredoxina (Cys 58 no motivo CxxC). De fato, interações entre a tiorredoxina e seus parceiros ocorrem através de ligações dissulfetos, que são transitórias e que podem ser detectadas mais facilmente através da mutação da cisteína de resolução de Trx.

Uma maneira de estudar o envolvimento de proteínas em um processo bioquímico comum é a construção de duplos mutantes seguido da observação dos fenótipos resultantes. Nesse sentido, neste trabalho foram construídos duplos mutantes entre *PRX1* e os genes *TRR2* e *TRX3* (Figura 35). Experimentos de sensibilidade ao H₂O₂ exógeno indicaram que a deleção individual de *TRX3* não causou nenhum defeito de crescimento em meios suplementados com concentrações crescentes de H₂O₂ (Figura 34). Este resultado corrobora estudos anteriores (PEDRAJAS et al., 1999; TROTTER; GRANT, 2005) sugerindo que Trx3 parece não atuar na proteção contra as EROs geradas pelo metabolismo respiratório mitocondrial, já que o defeito de crescimento do duplo mutante $\Delta PRX1\Delta TRX3$ foi semelhante ao mutante simples $\Delta PRX1$ (Figura 36).

Tem sido demonstrado que a deleção de ambas as tiorredoxinas citosólicas (Trx1 e Trx2) causam uma profunda sensibilidade a hidropeóxidos em decorrência da não redução de importantes enzimas antioxidantes citoplasmáticas, como por exemplo, as peroxirredoxinas Tsa1, Tsa2 e Ahp1 (GARRIDO; GRANT, 2002; KUGE; JONES, 1994). Por outro lado, a ausência de um fenótipo de sensibilidade ao H₂O₂ do mutante $\Delta TRX3$ indica que a redução de Prx1 não se dá exclusivamente por meio de Trx3, visto que o mutante $\Delta PRX1$ se mostrou

sensível ao tratamento com peróxido. De fato, a isoforma mitocondrial da glutarredoxina 2 Grx2 (PEDRAJAS et al., 2010) e até mesmo a tiorredoxina redutase 2 Trr2 (GREETHAM; GRANT, 2009) poderiam atuar nesse processo, independentemente de Trx3.

A ausência de um fenótipo de sensibilidade ao H_2O_2 exógeno do mutante $\Delta TRX3$ não exclui o envolvimento dessa enzima na regulação da homeostase redox mitocondrial. Greethan e Grant et al. (2013) reportaram que o estado de oxidação de Trx3 é um sinalizador da morte celular programada na levedura. Na sua forma oxidada, Trx3 induz a morte celular programada de maneira dependente da metacaspase Yca1. Neste modelo, Prx1 e Trr2 teriam um papel central na regulação do estado de oxidação de Trx3, por mecanismos opostos. Enquanto Prx1 oxida Trx3, Trr2 reduz essa oxidorredutase.

Em condições de crescimento normal, Prx1 oxidada poderia ser regenerada através de um mecanismo envolvendo Trr2 e GSH (GREETHAN e GRANT, 2009). Por outro lado, a produção aumentada de H₂O₂ desencadearia um acúmulo de Prx1 oxidada no interior da mitocôndria. Esta poderia reagir com Trx3 resultando na geração de Trx3 oxidada, ao qual induziria a morte celular programada através de Yca1. Neste cenário, Prx1 poderia funcionar como uma molécula sinalizadora que oxida Trx3 induzindo a morte celular por apoptose. De acordo com o modelo descrito acima, a deleção de Trx3 poderia diminuir a taxa de morte celular causado pelo estresse oxidativo exógeno. De fato, Greethan e Grant, (2013) observaram que a elevada taxa de morte celular do duplo mutante $\Delta GLR1 \Delta TRR2$ foi atenuada após a deleção de Trx3 e ou Prx1. De qualquer forma, não podemos descartar a possibilidade de que efeitos compensatórios podem ocorrer na linhagem $\Delta TRX3$ com a indução de alguma outra oxido-redutase, resultando em uma capacidade aumentada de detoxificação do H₂O₂.

Ambos os mutantes simples $\Delta PRX1$ e $\Delta TRR2$ apresentaram um fenótipo de sensibilidade ao H₂O₂ exógeno comparado à linhagem WT (Figura 34). Curiosamente, em meio respiratório contendo elevadas concentrações de peróxido, o mutante $\Delta TRR2$ apresentou um defeito de crescimento mais acentuado que o mutante $\Delta PRX1$, sugerindo que além de participar na redução de Prx1, Trr2 poderia ter funções mitocondriais adicionais. Alternativamente, a deleção do gene para Trr2 aumentaria a geração de Trx3 oxidada, levando a ativação de Yca1 e de morte celular programada como descrito acima. Porém, essa hipótese não é consistente com o fato do duplo mutante $\Delta PRX1\Delta TRR2$ ter apresentado um severo defeito de crescimento (Figura 36), maior que os mutantes simples. Nesse duplo mutante, a ausência do gene para Prx1 deveria gerar menos Trx3 oxidada do que o no mutante simples $\Delta TRR2$.
A co-localização das proteínas Trr2, Trx3 e Prx1 em associação com a membrana mitocondrial interna também indica que elas são importadas através do mecanismo de pressequencia (Figuras 5 e 6). Após alcançarem a matriz mitocondrial a grande maioria das pressequencias são removidas através da ação da peptidase de processamento mitocondrial, MPP (CHACINSKA et al., 2009).

Utilizando programas de predição, Pedrajas et al. (2000) propuseram que Prx1p seria clivada por MPP entre os aminoácidos 16 e 17. Posteriormente, Vögtle et al. (2009) determinaram experimentalmente a região N-terminal de grande parte das proteínas mitocondriais maduras e, dessa forma, propuseram que Prx1 totalmente processada inicia no aminoácido de lisina 39 (Figura 22A).

Analisando a pressequencia de Prx1 a clivagem entre os aminoácidos 38 e 39 não representa um bom sitio de clivagem para MPP. A peptidase MPP cliva após um resíduo de arginina altamente conservado presente na posição -2 em relação ao N-terminal (MOSSMANN et al., 2012) (Figura 7A). Este fato, levou Vögtle et al. (2009) a proporem que Prx1 poderia ser processada em duas etapas. Inicialmente, Prx1 seria clivada entre os aminoácidos 30 e 31 pela peptidase MPP sendo em seguida clivada entre os aminoácidos 38 e 39 pela protease Oct1 (VÖGTLE et al., 2009; VÖGTLE et al., 2011) (Figura 38).

A clivagem entre os aminoácidos 38 e 39 indica que Prx1 madura não possui o resíduo de cisteína C38. Isto contradiz trabalhos anteriores demonstrando que a Cys38 é necessária para a formação de um dímero unido por uma ligação dissulfeto intermolecular *in vitro* (PEDRAJAS et al., 2000) e *in vivo* (GREETHAM; GRANT, 2009).

Os ensaios de *western-blot* realizados neste trabalho confirmam que Prx1 é clivada por Oct1 in *vivo*, pois houve uma diferença de tamanho da proteína Prx1 na linhagem $\triangle OCT1$ comparado com a linhagem WT (Figura 22B). Por outro lado, as proteínas Trr2 e Trx3 não são substratos de Oct1 (Figura 24). O fato de Oct1 ser uma protease solúvel da matriz mitocondrial (KALOUSEK et al., 1992; ISAYA et al., 1994) corrobora os resultados demonstrando que Prx1 está presente na matriz mitocondrial associada perifericamente com a membrana mitocondrial interna. Nesse modelo, Prx1 seria incialmente translocada para o interior da matriz mitocondrial onde em seguida MPP catalisa a clivagem da pressequencia. Oct1 então remove o octapeptídeo convertendo Prx1 na sua forma madura, ao qual finalmente se associa com a membrana mitocondrial interna (Figura 38).

Além de estar presente na matriz mitocondrial, foi demonstrado que Prx1 também se localiza no espaço intermembrana. A via de importação para este compartimento não envolve a clivagem por Oct1 e sim o processamento pelo complexo IMP. Proteínas que utilizam esta via de importação possuem um segmento hidrofóbico localizado após a pressequencia. Este segmento bloqueia a translocação através do complexo TIM23 induzindo a liberação da proteína precursora para o interior da bicamada lipídica da membrana interna. Algumas dessas proteínas são posteriormente clivadas pelo complexo IMP liberando as mesmas no espaço intermembrana (GLICK et al., 1992; JAN et al., 2000; GAKH et al., 2002).



Figura 38. Mecanismo proposto de importação mitocondrial da peroxirredoxina Prx1 de *S. cerevisiae*. A forma precurosa de Prx1 é sintetizada no citoplasma e posteriormente translocada para o interior da mitocôndria. Prx1 apresenta dupla localização sendo direcionada para a matriz mitocondrial e o espaço intermembrana. A maturação de Prx1 na matriz mitocondrial envolve duas clivagens proteolíticas catalisadas pelas proteases MPP e Oct1. MPP remove a pressequência enquanto Oct1 catalisa a clivagem de oito (octapeptídeo) aminoácidos da região N-terminal processada por MPP. A clivagem do octapeptídeo aumenta a estabilidade de Prx1 na matriz mitocondrial. Prx1 madura se associa perifericamente na membrana interna onde catalisa a redução do H₂O₂ geradado pela atividade da cadeia respiratória mitocondrial (não demonstrado). Durante sua translocação pelo complexo TIM23, Prx1 pode ser liberada lateralmente para o interior da bicamada lipídica da membrana interna. Após a remoção da pressequencia pela protease MPP, a subunidade IMP2 do complexo IMP catalisa a clivagem da região hidrofóbica presente após a pressequência liberando Prx1 madura no espaço intermembrana. Os aminoácidos F, A, T, A, P, I e L presentes no interior do octapepídeo compoem a região hidrofóbica responsável pela liberação de algumas moléculas de Prx1 para a membran interna.

Até o momento seis proteínas foram caracterizadas como substratos do complexo IMP. Cox2, Mcr1, Gut2, Cyb2 e Ptc5 são clivadas pela subunidade Imp1 enquanto Cyc1 é clivada por Imp2. Em termos de especificade dos sítios de clivagem, Imp1 requer um resíduo acídico na posição -1 (D ou E) e um resíduo hidrofóbico não aromático na posição -3 em relação ao local da clivagem. Por outro lado, Imp2 requer um resíduo de alanina nas posições -1 e -3 (GASSER et al., 1982; HARTL et al., 1987; NUNNARI et al., 1993; ESSER et al., 2004; LUO et al., 2006). A anáilise da sequência de endereçamento mitocondrial de Prx1 revela a presença dos aminoácidos de alanina 34 e prolina 35 (Figura 38). Os aminoácidos F, A, T, A, T, P, I e L presentes no interior do octapeptídeo parecem compor a região hidrofóbica responsável pela liberação de algumas moléculas de Prx1 deixa de ser direcionada para o espaço intermembrana mitocondrial, confirmando que Prx1 é clivada por Imp2 (Figura 23).

Oct1 é uma protease que catalisa a remoção de oito (octapeptídeo) resíduos de aminoácidos dos intermediários gerados por MPP (BRANDA; ISAYA, 1995; BRANDA et al., 1999; MOSSMANN et al., 2012; VÖGTLE et al., 2009, VÖGTLE et al., 2011) (Figura 6). O papel funcional dessa segunda clivagem não está completamente entendido. No entanto, Vögtle et al. (2011) propuseram um mecanismo comum para a clivagem de todas as proteínas substratos de Oct1. Baseado na regra N-terminal (*N-end role*) da degradação de proteínas citosólicas (Figura 8), os autores propuseram que a clivagem de Oct1 promove um aumento da estabilidade proteica para proteínas da matriz mitocondrial frente a proteases ainda não identificadas.

Os resultados apresentados nesse trabalho suportam o modelo de Vögtle et al. (2011), pois a estabilidade de Prx1 foi significativamente menor na ausência da protease Oct1 (Figura 27). Por outro lado, a ausência dessa segunda clivagem não alterou a importação de Prx1 para a matriz mitocondrial nem sua atividade peroxidásica *in vitro* (Figura 24 e Tabela 1, respectivamente). Portanto, a clivagem de Prx1 representa um mecanismo de controle de qualidade proteico pós-traducional envolvido na regulação do tempo de meia vida (*turnover*) da proteína.

Permanecem desconhecidos os sistemas proteolíticos responsáveis pela degradação dos intermediários instáveis gerados por MPP que não são processados por Oct1. A degradação poderia ser feita por uma protease específica (ex: LON protease) ou até mesmo pelo sistema ubiquitina proteassomo (TEIXEIRA; GLASER, 2013). Apesar de algumas proteínas mitocondriais serem ubiquitinadas e degradas pelo proteassomo, há grande controvérsia se tal processo ocorre na matriz mitocondrial.

Outra interessante questão é o destino celular do octapeptídeo removido por Oct1. Os octapeptídeos produzidos foram demonstrados inibirem a atividade de Oct1 e, portanto, precisam ser removidos (ISAYA et al., 1992). Esses peptídeos poderiam ser exportados da mitocôndria e atuarem como moléculas sinalizadoras da função mitocondrial (TEIXEIRA e GLASER, 2013).

Apesar das proteínas Trx3 e Trr2 não serem clivadas por Oct1 (Figura 24), houve uma elevada instabilidades dessas proteínas no mutante $\triangle OCT1$ (Figura 27). Uma hipótese para explicar esse fenômeno é que a instabilidade de Trx3 e Trr2 seria consequência da degradação de uma proteína alvo de Oct1. Por exemplo, a degradação de Prx1 poderia predispor a mitocôndria a situações de estresse oxidativo que levariam secundariamente a degradação de Trx3 e Trr2. A instabilidade também poderia ser decorrente do fenótipo de perda do mtDNA causado pela deleção de OCT1. Mais estudos são necessários para entender esse fenômeno.

As proteínas substratos de Oct1 (Quadro 8) se localizam na matriz mitocondrial e na membrana interna e possuem uma variedade de funções metabólicas, tais como, componentes da cadeia respiratória, o ciclo do ácido cítrico, manutenção do genoma mitocondrial, ciclo da ureia e respostas a condições de estresse (VÖGTLE et al., 2011). A ausência de uma correlação funcional entre essas proteínas representa um desafio no entendimento da função de Oct1.

A deleção do gene *OCT1* em levedura causa um fenótipo pleiotrópico que resulta na perda total do genoma mitocondrial (ISAYA et al., 1994). No entanto, apesar da deleção de *OCT1* causar a inativação da fosforilação oxidativa em decorrência da perda do mtDNA, ela não afeta a viabilidade celular (ISAYA et al., 1994).

Branda et al. (1999) demonstraram uma interação funcional entre os lócus OCT1 e *YFH1* em levedura. *YFH1* é homologo do gene humano *FRDA*, que codifica a proteína denominada frataxina (CAMPUZANO et al., 1996). Pacientes com deficiências nessa proteína desenvolvem a doença denominada ataxia de Friedreich's, uma doença autossômica recessiva caracterizada pela perda progressiva dos movimentos dos membros, cardiomiopatia e diabetes (HARDING, 1981). Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença incluem acúmulo de ferro mitocondrial, acompanhado por elevados níveis de estresse oxidativo causado pela constante geração de radicais hidroxila devido a reação de Fenton. Curiosamnete, o mutante $\Delta OCT1$ apresentou uma redução de 60% nos níveis de ferro mitocondrial comparado com a linhagem selvagem (BRANDA et al., 1999). Devido Oct1 ser necessária para a maturação da principal enzima utilizadora de ferro (ferroquelatase codificada pelo gene *HEM15*), além de outras enzimas que possuem ferro, foi proposto que a atividade de Oct1 aumenta a demanda de ferro mitocondrial e, portanto, estimula a absorção de ferro pela organela. Apesar de não haver indícios do envolvimento de Oct1 com a patologia da ataxia de Friedreich's, será interessante investigar o papel dessa protease na manutenção do severo estresse oxidativo detectado nos pacientes com a doença.

Os estudos do papel funcional de Oct1 na manutenção da atividade mitocondrial poderão contribuir para o entendimento da função dessa protease em mamíferos, visto que essas enzimas apresentam 31% de identidade e 54% de similaridade entre si. De fato, o gene humano homólogo de *OCT1* foi capaz de complementar o fenótipo de deficiência respiratória do mutante $\triangle OCT1$ de levedura (CHEW et al., 2000). Além disso, este estudo demonstrou que Oct1 de levedura foi capaz de processar a peroxirredoxina mitocondrial 3 humana *in vivo* (Figuras 30 e 31), indicando o elevado grau de conservação desse mecanismo de controle de qualidade pós-traducional existente no interior da mitocôndria.

Os resultados apresentados nessa tese apontam como desdobramento natural a investigação de aspectos funcionais relacionados à importação de Prxs mitocondriais de mamíferos, bem como da clivagem dessas peroxidases pela protease Oct1 da matriz.

6. CONCLUSÕES

- A peroxirredoxina Prx1, assim como o sistema tiorredoxina mitocondrial composto pelas enzimas Trx3 e Trr2, se localizam no compartimento da matriz mitocondrial. Ambas as enzimas se associam fracamente com a membrana mitocondrial interna com face voltada para a matriz mitocondrial.
- Prx1 apresenta dupla localização estando presente também no espaço intermembrana mitocondrial possivelmente na forma solúvel.
- Durante a importação para a matriz mitocondrial, Prx1 é inicialmente clivada pela peptidase de processamento mitocondrial (MPP), ao qual remove a sequência de endereçamento mitocondrial ou pressequencia. Após este primeiro evento de clivagem, a protease octapeptidil aminopeptidase Oct1 remove oito aminoácidos adicionais (octapeptídeo) da região N-terminal de Prx1.
- A importação de Prx1 para o espaço intermembrana envolve a liberação da proteína precursora na bicamada lipídica da membrana interna devido à presença de uma região hidrofóbica localizada no interior do octapeptídeo clivado por Oct1. Em seguida, Prx1 é clivada pela subunidade Imp2 do complexo IMP liberando a proteína madura no espaço intermembrana mitocondrial.
- A clivagem de Prx1 por Oct1 não interfere na importação de Prx1 para o compartimento da matriz mitocondrial nem a atividade peroxidásica de Prx1 *in vitro*.
 Por outro lado, a clivagem aumenta a estabilidade de Prx1 no interior da mitocôndria.
- Apsear de Trr2 e Trx3 não serem clivadas por Oct1, houve uma diminuição significaiva na estabilidade dessas proteínas na ausência da protease. Os mecanismos envolvidos nessa instabilidade permanecem desconhecidos.
- A clivagem de peroxirredoxinas por Oct1 parece ser um mecanismo conservado, visto que Oct1 de *S. cerevisiae* é capaz de clivar a peroxirredoxina mitocondrial humana Prx3 *in vivo*. No entanto, a clivagem de Prx3 humana por Oct1 de levedura não interfere na estabilidade de Prx3.

As enzimas Prx1 e Trr2 desempenham um papel proeminente na proteção das células de *S. cerevisiae* contra o estresse oxidativo exógeno. A linhagem mutante Δ*PRX1* libera quantidades significativamente maiores de H₂O₂ mitocondrial comparado à linhagem selvagem WT, indicando que Prx1 é responsável pela redução de quantidades significativas de H₂O₂ gerado no interior da mitocôndria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; SHODAI, T.; MUTO, T.; MIHARA, K.; TORII, H.; NISHIKAWA, S.; ENDO, T.; KOHDA, D. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. **Cell**., v. 100, p. 551-560, 2000.

ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 27, p. 639-645, 2006.

AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 49, p. 1342-1353, 2010.

ALIKHANI, N.; BERGLUND, A. K.; ENGMANN, T.; SPÅNNING, E.; VÖGTLE, F. N.; PAVLOV, P.; MEISINGER, C.; LANGER, T.; GLASER, E. Targeting capacity and conservation of PreP homologues localization in mitochondria of different species. **J. Mol. Biol.**, v. 410, p. 400-410, 2011.

ANDERSSON, S.G.; KURLAND, C.G.; Reductive evolution of resident genomes. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 263-268, 1998.

AVERY, A. M.; AVERY, S. V. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. J. Biol Chem., v. 276, p. 33730-33735, 2001.

AVERY, A. M.; WILLETTS, S. A.; AVERY, S. V. Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast gpx3 reveals its functional importance. **J. Biol Chem.**, v. 279, p. 46652-46658, 2004.

BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science**, v. 234, p. 179-186, 1986.

BACHMAIR, A.; VARSHAVSKY, A. The degradation signal in a short-lived protein. **Cell.**, v. 56, p. 1019-1032, 1989.

BAE, Y. S.; KANG, S. W.; SEO, M. S.; BAINES, I. C.; TEKLE, E.; CHOCK, P. B.; RHEE, S. G. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. **J. Biol.Chem.**, v. 272, p. 217-221, 1997.

BAKER, R. T.; VARSHAVSKY, A. Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway. J. Biol. Chem., v. 270, p. 12065-12074, 1995.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTICK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microb. Rev.**, v. 25, p.15-37, 2001.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell, v. 120, 483-495, 2005.

BALZI, E.; CHODER, M.; CHEN, W. N.; VARSHAVSKY, A.; GOFFEAU, A. Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 7464-7471, 1990.

BANCI, L.; BERTINI, I.; CEFARO, C.; CENACCHI, L.; CIOFI-BAFFONI, S.; FELLI, I. C.; GALLO, A.; GONNELLI, L.; LUCHINAT, E.; SIDERIS, D.; TOKATLIDIS, K. Molecular chaperone function of Mia40 triggers consecutive induced folding steps of the substrate in mitochondrial protein import. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 107, p. 20190-20195, 2010.

BARTEL, B.; WUNNING, I.; VARSHAVSKY, A. The recognition component of the N-end rule pathway. **EMBO J**., v. 9, p. 3179-3189, 1990.

BASU, U.; SOUTHRON, J. L.; STEPHENS, J. L.; TAYLOR, G. J. Reverse genetic analysis of the glutathione metabolic pathway suggests a novel role of PHGPX and URE2 genes in aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Genet. Genomics.**, v. 271, p. 627-637, 2004.

BAUER, M.; BEHRENS, M.; ESSER, K.; MICHAELIS, G.; PRATJE, E. PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 272-278, 1994.

BECKER, T.; BÖTTINGER, L.; PFANNER, N. Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. **Trends Biochem. Sci.**, v. 37, p. 85-91. 2012.

BECKMANN, J. D.; LJUNGDAHL, P. O.; TRUMPOWER, B. L. Mutational analysis of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Construction of a RIP1 deletion strain and isolation of temperature-sensitive mutants. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 3713-3722, 1989.

BELL, E. L.; KLIMOVA, T. A.; EISENBART, J.; MORAES, C. T.; MURPHY, M. P.; BUDINGER, G. R. S.; CHANDEL, N. S. The Q_0 site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signal-ing via reactive oxygen species production. **J. Cell Biol.**, v. 177, p. 1029-1036, 2007.

BIEN, M.; LONGEN, S.; WAGENER, N.; CHWALLA, I.; HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Mitochondrial Disulfide Bond Formation Is Driven by Intersubunit Electron Transfer in Erv1 and Proofread by Glutathione. **Mol. Cell.**, v. 37, p. 516-528, 2010.

BIHLMAIER, K.; MESECKE, N.; TERZIYSKA, N.; BIEN, M.; HELL, K.; HERRMANN, J. M. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. **J. Cell Biol.**, v. 179, p. 389-395, 2007.

BLEIER, L.; WITTIG, I.; HEIDE, H.; STEGER, M.; BRANDT, U.; DROSE, S. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 78, p. 1-10, 2015.

BOHNERT, M.; PFANNER, N.; van der LAAN M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 33, p. 92-102, 2015.

BOLDOGH, I. R.; PON, L. A. Purification and subfractionation of mitochondrial from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Methods in Cell Biol., v. 80, p. 45-64, 2007.

BOLENDER, N.; SICKMANN, A.; WAGNER, R.; MEISINGER, C.; PFANNER N. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. **EMBO Rep.**, v. 9, p 42-49, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGOSZEWSKI, P.; WASILEWSKI, M.; SAKOWSKA, P.; GORNICKA, A.; BÖTTINGER, L.; QIU, J.; WIEDEMANN, N.; CHACINSKA, A. Retro-translocation of mitochondrial intermembrane space proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 112, p. 7713-7718, 2015.

BRAND, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Exp. Gerontol.**, v. 45, p. 466-472, 2010.

BRANDA, S. S.; ISAYA, G. Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase. J. Biol. Chem., v. 270, p. 27366-27373, 1995.

BRANDA, S. S.; YANG, Z. Y.; CHEW, A.; ISAYA, G. Mitochondrial intermediate peptidase and the yeast frataxin homolog together maintain mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Hum. Mol. Genetics.**, v. 8, p. 1099-1110, 1999.

BRAUN, N. A.; MORGAN, B.; DICK, T. P.; SCHWAPPACH, B. The yeast CLC protein counteracts vesicular acidification during iron starvation. J. Cell. Sci., v., 123, p. 2342-2350, 2010.

BYRD, C.; TURNER, G. C.; VARSHAVSKY, A. The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. **EMBO J.**, v. 17, p. 269–277, 1998.

CAMIER, S.; MA, E.; LEROY C.; PRUVOST, A.; TOLEDANO, M.; MARSOLIER-KERGOAT, M. C. Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, p. 1008-1016, 2007.

CAMPUZANO, V.; MONTERMINI, L.; MOLTÒ, M. D.; PIANESE, L.; COSSÈE, M.; CAVALCANTI, F.; MONROS, E.; RODIUS, F.; DUCLOS, F.; MONTICELLI, A.; ZARA, F.; CAÑIZARES, J.; KOUTNIKOVA, H.; BIDICHANDANI, S. I.; GELLERA, C.; BRICE, A.; TROUILLAS, P.; MICHELE, G. D.; FILLA, A.; FRUTOS, R. D.; PALAU, F.; PATEL, P. I.; DONATO, S. D.; MANDEL, J.-L.; COCOZZA, S.; KOENIG, M.; PANDOLFO. M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. **Science**, v. 271, p.1423-1427, 1996.

CARMEL-HAREL, O.; STORZ, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 439-461, 2000.

CHACINSKA, A.; PFANNSCHMIDT, S.; WIEDEMANN, N.; KOZJAK, V.; SANJUÁN SZKLARZ, L.K.; SCHULZE-SPECKING, A.; TRUSCOTT, K. N.; GUIARD, B.; MEISINGER, C.; PFANNER, N. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. **EMBO J.**, v. 23, p. 3735-46, 2004.

CHACINSKA, A.; LIND, M.; FRAZIER, A. E.; DUDEK, J.; MEISINGER, C.; GEISSLER, A.; SICK-MANN, A.; MEYER, H. E.; TRUSCOTT, K. N.; GUIARD, B.; PFANNER, N.; REHLING, P. Mitochondrial pre-sequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. **Cell.**, v. 120, p. 817–829, 2005.

CHACINSKA, A.; KOEHLER, C. M.; MILENKOVIC, D.; LITHGOW, T.; PFANNER, N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. **Cell.**, v. 138, p. 628-644, 2009.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J. Biol. Chem., v. 269, p. 27670-27678, 1994a.

CHAE, H. Z.; UHM. T. B.; RHEE, S. G. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, p. 7022-7026, 1994b.

CHANDEL, N. S.; MALTEPE, E.; GOLDWASSER, E.; MATHIEU, C. E.; SIMON, M. C.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**., v. 95, p. 11715-11720, 1998.

CHANDEL, N. S.; McCLINTOCK, D. S.; FELICIANO, C. E.; WOOD, T. M.; MELENDEZ, J. A.; RODRIGUEZ, A. M.; SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial

complex III stabilize hypoxia-inducible factor- 1α during hypoxia. A mechanism of O₂ sensing. J. Biol. Chem., v. 275, 25130-25138, 2000.

CHANDEL, N. S. Mitochondria as signaling organelles. BMC Biol., v. 12, p. 34-40, 2014.

CHANDEL, N. S. Evolution of mitochondria as signaling organelles. Cell Metab., v. 22, p. 204-206, 2015.

CHAUWIN, J. F.; OSTER, G.; GLICK, B. S. Strong precursor-pore interactions constrain models for mitochondrial protein import. **Biophys J.**, v. 74, p. 1732–1743, 1998.

CHEW, A.; ROLLINS, R. A.; SAKATI, W. R.; ISAYA, G. Mutations in a putative zinc binding domain inactivate the mitochondrial intermediate peptidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 226, p. 822-829, 1996.

CHOI, H. J.; KANG, S. W.; YANG, C. H.; RHEE, S. G.; RYU, S. E. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 A resolution. **Nat. Struct. Biol.**, v. 5, p. 400-406, 1998.

CLAROS, M. G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **Eur. J. Biochem**., v. 241, p. 779–786, 1996.

COPPOCK, D. L.; THORPE, C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. Antiox. Redox Signal., v. 8, p. 300-311, 2005.

COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochem J**. v. 425, p. 313-325, 2010.

CULOTTA, V. C.; YANG, M.; O'HALLORAN, T. V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1763, p. 747-758, 2006.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 813-824, 2007.

DELAUNAY, A.; PFLIEGER, D.; BARRAULT, M. B.; VINH, J.; TOLEDANO, M. B. A thiol peroxidase is an H2O2 receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell.**, v. 111, p. 471-481, 2002.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1830, p. 3217-3266, 2013.

de WINDE, J. H.; GRIVELL, L. A. Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Progres. Nucleic Acid Res. Mol. Biol**., v. 46, p. 51-9, 1993.

DIENHART, M. K.; STUART, R. A. The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome *bc*1–COX supercomplex and the TIM23 machinery. **Mol. Biol. Cell.**, v. 19, p. 3934–3943, 2008.

DISCOLA, K. F.; de OLIVEIRA, M. A.; ROSA, CUSSIOL, J. R.; MONTEIRO, G.; BÁRCENA, J. A.; PORRAS, P.; PADILLA, C. A.; GUIMARÃES, B. G; NETTO, L. E. Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol., v. 385, p. 889-901, 2009.

DOHMEN, R. J.; MADURA, K.; BARTEL, B.; VARSHAVSKY, A. The N-end rule is mediated by the UBC2 (RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 7351-7355, 1991.

DOLEZAL, P.; LIKIC, V.; TACHEZY, J.; LITHGOW, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. **Science**, v. 313, p. 314-318, 2006.

DOUGAN, D. A.; MICEVSKI, D.; TRUSCOTT, K. N. The N-end rule pathway: from recognition by N-recognins, to destruction by AAA+proteases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1823, p. 83-91, 2012.

DOWHAN, W.; BIBUS, C. R.; SCHATZ, G. The cytoplasmically-made subunit IV is necessary for assembly of cytochrome c oxidase in yeast. **EMBO J**., v. 4, p. 179-184, 1985.

DRÖSE, S.; BRANDT, U.; WITTIG, I. Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1844, p. 1344–1354, 2014.

DU, F.; NAVARRO-GARCIA, F.; XIA, Z.; TASAKI, T.; VARSHAVSKY, A. Pairs of dipeptides synergistically activate the binding of substrate by ubiquitin ligase through dissociation of its autoinhibitory domain. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**., v. 99, p. 14110–14115, 2002.

DUDEK, J.; REHLING, P.; van der LAAN, M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 1833, p. 274-285, 2013.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nat. Protocols.**, v. 2, p. 953–971, 2007.

EMERLING, B. M.; WEINBERG, F.; SNYDER, C.; BURGESS, Z.; MUTLU, G. M.; VIOLLET, B.; BUDINGER, G. R.; CHANDEL, N. S. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. **Free Radic. Biol. Med**, v. 46, p. 1386-1391, 2009.

ENDO, T.; YAMANO, K.; KAWANO, S. Structural insight into the mitochondrial protein import system. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1808, p. 955-970, 2011.

ESSER, K.; JAN, P. S.; PRATJE, E.; MICHAELIS, G. The mitochondrial IMP peptidase of yeast: functional analysis of domains and identification of Gut2 as a new natural substrate. **Mol. Genet. Genomics.**, v. 271, p. 616-626, 2004.

FANG, J.; BEATTIE, D.S. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, p. 478-488, 2003.

FASS, D. The Erv family of sulfhydryl oxidases. Biochim. Biophys. Acta., v. 1783, p. 557-566, 2008.

FERNANDES, A. P.; HOLMGREN, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 6, p. 63-74, 2004.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid. Redox Signal., v. 18, p. 2029-2074, 2013.

FISCHER, F.; HAMANN, A.; OSIEWACZ, H. D. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. **Trends Biochem Sci.**, v. 37, p. 284-292, 2012.

FISCHER, M.; RIEMER, J. The mitochondrial disulfide relay system: roles in oxidative protein folding and beyond. **Int. J.Cell Biol.**, v. 2013, p. 742923, 2013.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS** Lett., v. 32, p. 132-134, 1973.

FLOHÉ, L.; TOPPO, S.; COZZA, G.; URSINI, F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. Antioxid. Redox Signal., v. 15, p. 763-780, 2011.

FORMAN, H. J.; AUGUSTO, O.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; DENNERY, P. A.; KALYANARAMAN, B.; ISCHIROPOULOS, H.; MANN, G. E.; RADI, R.; ROBERTS, L. J 2nd, VINA, J.; DAVIES, K. J. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 78, p. 233-235, 2015.

FOURY, F.; ROGANTI, T.; LECRENIER, N.; PURNELLE, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**., v. 440, p. 325-331, 1998.

FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, p. 319-324, 2000.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. J. Biol. Chem., v. 264, p. 7761-7764, 1989.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem., v.64, p. 97-112, 1995.

GAKH, O.; CAVADINI, P.; ISAYA, G. Mitochondrial processing peptidases. **Biochim. Biophys.** Acta., v. 1592, p. 63-77, 2002.

GAN, Z. R. Yeast thioredoxin genes. J. Biol. Chem., v. 266, p. 1692-1696, 1991.

GASSER, S. M.; OHASHI, A.; DAUM, G.; BOHNI, P. C.; GIBSON, J.; REID, G. A.; YONETANI, T.; SCHATZ, G. Imported mitochondrial proteins cytochrome b2 and cytochrome c1 are processed in two steps. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 79, p. 267-271, 1982.

GAVEL, Y.; von HEIJNE, G. Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. **Protein Eng.**, v. 4, p. 33-37, 1990.

GEISSLER, A.; CHACINSKA, A.; TRUSCOTT, K. N.; WIEDEMANN, N.; BRANDNER, K.; SICKMANN, A.; MEYER, H. E.; MEISINGER, C.; PFANNER, N.; REHLING, P. The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. **Cell.**, v. 111, p. 507–518, 2002.

GEVAERT, K.; GOETHALS, M.; MARTENS, L.; VAN DAMME, J.; STAES, A.; THOMAS, G. R.; VANDEKERCKHOVE, J. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, p. 566-569, 2003.

GLICK, B. S.; BRANDT, A.; CUNNINGHAM, K.; MÜLLER, S.; HALLBERG, R. L.; SCHATZ, G. Cytochromes c_1 and b_2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. **Cell.**, v. 69, p. 809–822, 1992.

GLICK, B. S. Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Enzymol**, v. 260, p. 224-31, 1995.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 563-567, 1996.

GOMES, F.; TAHARA, E. B.; BUSSO, C.; KOWALTOWSKI, A. J.; BARROS, M. H. *nde1* deletion improves mitochondrial DNA maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* coenzyme Q mutants. **Biochem J.**, v. 449, p. 595-603, 2013.

GRAHAM, L. A.; BRANDT, U.; SARGENT, J. S.; TRUMPOWER, B. L.Mutational analysis of assembly and function of the iron-sulfur protein of the cytochrome bc1 complex in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bioenerg. Biomembr., v. 25, p. 245-257, 1993.

GRANT, C. M.; MACIVER, F. H.; DAWES, I. W. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet**., v. 29, p. 511-515, 1996.

GRANT, C.; MACIVER, F. H.; DAWES, I. W. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. **Mol. Biol. Cell.**, v. 8, p. 1699-1707, 1997.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. Science, v. 283, p. 1476-1481, 1999.

GREETHAM, D.; GRANT, C. M. Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. **Moll. Cell. Biol.**, v. 29, p. 3229-3240, 2009.

GREETHAM, D.; KRITSILIGKOU, P.; WATKINS, R. H.; CARTER, X.; PARKIN, J.; GRANT, C. M. Oxidation of the yeast mitochondrial thioredoxin promotes cell death. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 18, p. 376-385, 2013.

GREGG, C.; KYRYAKOV, P.; TITORENKO, V. I. Purification of mitochondria from yeast cells. J. Vis. Exp., 2009.

GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. **Proc. Natl.** Acad. Sci. USA., v. 82, p. 4668-4672, 1985.

GRUMBT, B.; STROOBANT, V.; TERZIYSKA, N.; ISRAEL, L.; HELL, K. Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 37461-37470, 2007.

GUIDOT, D. M.; MCCORD, J. M.; WRIGHT, R. M.; REPINE, J. E. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 26699-26703, 1993.

GUZY, R. D.; SCHUMACKER, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. **Exp. Physiol.**, v. 91, p. 807-819, 2006.

HABIB, S. J.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals. Methods Cell Biol., v. 80, p. 761-781, 2007.

HALL, A.; NELSON, K.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 15, p.795-815, 2011.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends Biochem Sci.**, v. 35, p. 505-513, 2010.

HAMZA, I.; DAILEY, H. A. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1823, p. 1617-1632, 2012.

HARBAUER, A. B.; ZAHEDI, R. P.; SICKMANN, A; PFANNER, N.; MEISINGER, C. The protein import machinery of mitochondria-a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. **Cell Metab.**, v. 19, p. 357-372, 2014.

HARDING, A. E. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. **Brain**., v.104, 589-620, 1981.

HARTL, F. U.; OSTERMANN, J.; GUIARD, B.; NEUPERT, W. Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. **Cell.**, v. 51, p. 1027-1037, 1987.

HATEFI, H. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu. Rev. Biochem**., v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HENDRICK, J. P.; HODGES, P. E.; ROSENBERG, L. E. Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 86, p. 4056-4060, 1989.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. **FEBS J.**, v. 274, p. 2163-2180, 2007.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1780, p. 1217-1235, 2008.

HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Oxidation and reduction of cysteines in the intermembrane space of mitochondria: multiple facets of redox control. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 13, p. 1323-1326, 2010a.

HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. The intermembrane space of mitochondria. Antioxid. Redox. Signal., v. 13, p. 1341-1358, 2010b.

HERRMANN, J. M.; LONGEN, S.; WECKBECKER, D.; DEPUYDT, M. Biogenesis of Mitochondrial Proteins. In: KADENBACH, B. (Ed.). Mitochondrial oxidative phosphorylation: nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and pathophysiology. New York: Springer, 2012. p. 41-64.

HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Mitochondrial disulfide relay: Redox-regulated protein import into the intermembrane space. J. Biol. Chem., v. 287, p. 4426-4433, 2012.

HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Three approaches to one problem: protein folding in the periplasm, the endoplasmic reticulum, and the intermembrane space. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 21, p. 438-56, 2014.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. J. Biol. Chem., v. 264, p. 13963-13966, 1989.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redoxdependent signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 411-421, 2014.

HU, J.; DONG, L.; OUTTEN, C. E. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 29126-29134, 2008.

HURT, E. C.; PESOLD-HURT, B.; SUDA, K.; OPPLIGER, W.; SCHATZ, G. The first twelve amino acids (less than half of the pre-sequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix. **EMBO J**., v.4, p. 2061-2068, 1985.

INOUE, Y.; MATSUDA, T.; SUGIYAMA, K.; IZAWA, S.; KIMURA, A. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem., v. 274, p. 27002-27009, 1999.

ISAYA, G.; MIKLOS, D.; ROLLINS, R. A. MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol.**, v. 14, p. 5603-5616, 1994.

ITOH, K.; NAKAMURA, K.; IIJIMA, M.; SESAKI, H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. **Trends Cell Biol.**, v. 23, p. 64-71, 2013.

JAMIESON, D J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast., v. 14, p. 1511-1527, 1998.

JAN, P. S.; ESSER, K.; PRATJE, E.; MICHAELIS, G. Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. **Mol Gen Genet.**, v. 263, p. 483-491, 2000.

JOHNSTON, M.; RILES, L.; HEGEMANN, J. H. Gene disruption. Methods Enzymol., v. 350, p. 290-315, 2002.

KALOUSEK, F.; ISAYA, G.; ROSENBERG, L. E. Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. **EMBO J.**, v. 11, p. 2803-2809, 1992.

KALOUSEK, F.; NEUPERT, W.; OMURA, T.; SCHATZ, G.; SCHMITZ, U. K. Uniform nomenclature for the mitochondrial peptidases cleaving precursors of mitochondrial proteins. **Trends Biochem Sci.**, v. 18, p. 249, 1993.

KARNKOWSKA, A.; VACEK, V.; ZUBÁČOVÁ, Z.; TREITLI, S. C.; PETRŽELKOVÁ, R.; EME, L.; NOVÁK, L.; ŽÁRSKÝ, V.; BARLOW, L. D.; HERMAN, E. K.; SOUKAL, P.; HROUDOVÁ, M.; DOLEŽAL, P.; STAIRS, C. W.; ROGER, A. J.; ELIÁŠ, M.; DACKS, J. B.; VLČEK, Č.; HAMPL, V. A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. **Curr Biol.**, v. 26, p. 1274-1284, 2016.

KAYA, A.; GERASHCHENKO, M. V.; SEIM, I.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B; GLADYSHEV, V. N. Adaptive aneuploidy protects against thiol peroxidase deficiency by increasing respiration via key mitochondrial proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 112, p. 10685-10690, 2015.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**., v.23, p.2947-2948, 2007.

KIM, K.; KIM, I. H.; LEE, KI-Y.; RHEE, S. G. STADTMAN, E. R. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O2 mixed-function oxidation system. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 4704-4711, 1988.

KOC, A.; MATHEWS, C. K.; WHEELER, L. J.; GROSS, M. K.; MERRILL, G. F. Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide *pool* maintenance during S phase. **J. Biol Chem.**, v. 281, p. 15058-15063, 2006.

KOEHLER, C. M.; TIENSON, H. L. Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1793, p. 139-145, 2009.

KOJER, K.; BIEN, M.; GANGEL, H.; MORGAN, B.; DICK, T. P.; RIEMER, J. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. **EMBO J.**, v. 31, p. 3169-3182, 2012.

KOJER, K.; RIEMER, J. Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1844, p. 1383-1390, 2014.

KOJER, K.; PELEH, V.; CALABRESE, G.; HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Kinetic control by limiting glutaredoxin amounts enables thiol oxidation in the reducing mitochondrial intermembrane space. **Mol Biol Cell.**, v. 26, p. 195-204, 2015.

KOOPMAN, W. J.; NIJTMANS, L. G.; DIETEREN, C. E.; ROESTENBERG, P.; VALSECCHI, F.; SMEITINK J. A.; WILLEMS, P. H. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation and reactive oxygen species generation. **Antiox. Redox Signal.**, v. 12, p. 1431-1470, 2010.

KOPPEN, M.; LANGER, T. Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, p. 221–242, 2007.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic. Biol. Med., v. 47, p. 333-343, 2009.

KRAYL, M.; LIM, J. H.; MARTIN, F.; GUIARD, B.; VOOS, W. A cooperative action of the ATPdependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. **Mol. Cell. Biol.**, v. 27, p. 411-425, 2007.

KUMAR, C. IGBARIA, A.; D'AUTREAUX, B.; PLANSON, A. G.; JUNOT, C.; GODAT, E.; BACHHAWAT, A. K.; DELAUNAY-MOISAN, A.; TOLEDANO, M. B. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. **EMBO J.**, v. 30, p. 2044–2056, 2011.

LAEMMLI, D. K. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-683, 1970.

LARSSON, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. Annu. Rev. Biochem., v. 79, p. 683-706, 2010.

LENAZ, G.; GENOVA, M. L. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 12, p. 961-1008, 2010.

LILL, R.; HOFFMANN, B.; MOLIK, S.; PIERIK, A. J.; RIETZSCHEL, N.; STEHLING, O.; UZARSKA, M. A.; WEBERT, H.; WILBRECHT, C.; MÜHLENHOFF, U. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1823, p. 1491-1508, 2012.

LIU, Q.; D'SILVA, P.; WALTER, W.; MARSZALEK, J.; CRAIG, E. A. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. **Science**, v. 300, p. 139–141, 2003.

LUO, W.; FANG, H.; GREEN, N. Substrate specificity of inner membrane peptidase in yeast mitochondria. **Mol Genet Genomics.**, v. 275, p. 431-436, 2006.

LUTTIK, M. A. H.; OVERKAMP, K. M.; KÖTTER, P.; DE VRIES, S.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. J. Biol.Chem., v. 273, p. 24529-24534, 1998.

MANNELLA, C. A.; MARKO, M.; PENCZEK, P.; BARNARD, D.; FRANK, J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. **Microsc. Res.** Tech., v. 27, p. 278-283,1994.

MANNELLA, C. A.; MARKO, M.; BUTTLE, K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. **Trends Biochem**. Sci., v. 22, p. 37-38, 1997.

MARCONDES, M. F.; TORQUATO, J. S. R.; ASSIS, D. M.; JULIANO, M. A.; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, V. Mitochondrial intermediate peptidase: Expression in *Escherichia coli* and improvement of its enzymatic activity detection with FRET substrates. **Biochem. Biophys. Res.** Commun., v. 391, p. 123-128, 2010.

MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS J**., v. 275, p. 3959-3970, 2008.

MARÍ, M.; MORALES, A.; COLELL, A.; GARCÍA-RUIZ, C.; KAPLOWITZ, N.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. **Biochim. Biophys.** Acta., v. 1830, p. 3317-3328, 2013.

MARRES, C. A. M.; DE VRIES, S.; GRIVEL, L. A. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 195, p. 857-862, 1991.

MARTIN, L. J. Mitochondrial and cell death mechanisms in neurodegenerative diseases. **Pharmaceuticals (Basel)**., v. 3, p. 839-915, 2010.

MARTINEZ-CABALLERO, S.; GRIGORIEV, S. M.; HERRMANN, J. M.; CAMPO, M. L.; KINNALLY, K. W. Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import com-plex TIM23. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 3584-3593, 2007.

MEIER, S.; NEUPERT, W.; HERRMANN, J. M. Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 7777-7785, 2005.

MEINECKE, M.; WAGNER, R.; KOVERMANN, P.; GUIARD, B.; MICK, D. U.; HUTU, D. P.; VOOS, W.; TRUSCOTT, K. N.; CHACINSKA, A.; PFANNER, N.; REHLING, P. Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. **Science**, v. 312, p. 1523-1526, 2006.

MEISINGER, C.; SOMMER, T.; PFANNER, N. Purification of *Saccharomcyes cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. **Anal. Biochem.**, v. 287, p. 339-342, 2000.

MEISINGER, C.; PFANNER, N.; TRUSCOTT, K. N. Isolation of yeast mitochondria. Methods Mol Biol., v. 13, p. 33-39, 2006.

MEISINGER, C.; SICKMANN, A.; PFANNER, N. The mitochondrial proteome: from inventory to function. **Cell.**, v. 134, p. 22-24, 2009.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. Annu. Rev. Biochem., v. 52, p. 711-760, 1983.

MENG, T. C.; FUKADA, T.; TONKS, N. K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases *in vivo*. **Mol. Cell**., v. 9, p. 387-399, 2002.

MESECKE, N.; TERZIYSKA, N.; KOZANY, C.; BAUMANN, F.; NEUPERT, W.; HELL, K.; HERRMANN, J. M. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. **Cell**, v. 121, p. 1059-1069, 2005.

MESECKE, N.; BIHLMAIER, K; GRUMBT, B.; LONGEN, S.; TERZIYSKA, N.; HELL, K.; HERRMANN, J. M. The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40. **EMBO REP.**, v. 9, p. 1107-13, 2008.

MILENKOVIC, D.; GABRIEL, K.; GUIARD, B.; SCHULZE-SPECKING, A.; PFANNER, N.; CHACINSKA, A.. Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: Site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. J. Biol. Chem., v. 282, p. 22472-22480, 2007.

MISHRA, P; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 634-646, 2014.

MOKRANJAC, D.; SICHTING, M.; POPOV-CELEKETIC, D.; MAPA, K.; GEVORKYAN-AIRAPE-TOV, L.; ZOHARY, K.; HELL, K.; AZEM, A.; NEUPERT, W. Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to inner membrane of mitochondria. **Mol. Biol. Cell.**, v. 20, p. 1400-1407, 2009.

MOLINA, M. M.; BELLÍ, G.; de la TORRE, M. A.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE MT, HERRERO, E. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. **J. Biol. Chem.**, 279, p. 51923-51930, 2004.

MONTEIRO, G.; PEREIRA, G. A. G.; NETTO, L. E. S. Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: one dependent on cAMP and the other on heme. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 278-88, 2002.

MONTEIRO, G.; NETTO, L. E. S. Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett**., v. 241, p. 221-8, 2004.

MONTEIRO, G.; HORTA, B. B.; PIMENTA, D. C.; AUGUSTO, O. NETTO, L E. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 104, p. 4886-4891, 2007.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics., v. 190, p. 1157-1195, 2012.

MORGAN, B.; SOBOTTA, M. C.; DICK, T. P. Measuring E(GSH) and H(2)O(2) with roGFP2-based redox probes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, 1943-1951, 2011.

MOSSMANN, D.; MEISINGER, C.; NORA VÖGTLE, N. Processing of mitochondrial presequences. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1819, p. 1098-1106, 2012.

MÜHLENHOFF, U.; GERBER, J.; RICHHARDT, N.; LILL, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. **EMBO J**. v. 22, p. 4815-4825, 2003.

MULLER, E. G. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. **J Biol Chem.**, v. 266, p. 9194-9202, 1991.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J., v. 417, p. 1-13, 2009.

MURPHY, M. P.; HOLMGREN, A.; LARSSON, N. G.; HALLIWELL, B.; CHANG, C. J.; KALYANARAMAN, B.; RHEE, S. G.; THORNALLEY, P. J.; PARTRIDGE, L.; GEMS, D.; NYSTROM, T.; BELOUSOV, V.; SCHUMACKER, P. T.; WINTERBOURN, C. C. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell Metab.**, v. 13, p. 361–366, 2011.

MURPHY, M. P. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 16, p. 476-495, 2012.

NAAMATI, A.; REGEV-RUDZKI, N.; GALPERIN, S.; LILL, R.; PINES, O. Dual targeting of Nfs1and discovery of its novel processing enzyme, Icp55, **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 30200-30208, 2009.

NELSON, K. J.; KNUTSON, S. T.; SOITO, L.; KLOMSIRI, C.; POOLE, L. B.; FETROW, J. S. Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. **Proteins.**, v. 79, p. 947-964, 2011.

NETT, J. H.; DENKE, E.; TRUMPOWER, B. L. Two-step processing is not essential for the import and assembly of functionally active iron-sulfur protein into the cytochrome bc1 complex in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v. 272, p. 2212–2217, 1997.

NETT, J. H.; TRUMPOWER, B. L. Intermediate length Rieske iron-sulfur protein is present and functionally active in the cytochrome bc1 complex of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol Chem., v. 274, p. 9253–9257, 1999.

NETTO, L. E.; DE OLIVEIRA, M. A.; MONTEIRO, G.; DEMASI, A. P.; CUSSIOL, J. R.; DISCOLA, K. F.; DEMASI, M.; SILVA, G. M.; ALVES, S. V.; FARIA, V. G.; HORTA, B. B. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 146, p. 180-193, 2007.

NETTO, L. E.; ANTUNES, F. The roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction. **Mol Cells.**, v.1, p. 65-71, 2016.

NETTO, L. E.; de OLIVEIRA, M. A.; TAIRUM, C. A.; da SILVA NETO, J. F. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. **Free Radic. Res.**, v. 50, 206-245, 2016.

NEUPERT, W.; HERRMANN, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. Annu. Rev. Biochem., v. 76, p. 723-749, 2007.

NUNNARI, J.; FOX, T. D.; WALTER, P. A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. **Science**, v. 262, p. 1997-2004, 1993.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. Cell. v. 148, p. 1145-1159, 2012.

OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. S.; AUGUSTO, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, 326-334, 2007.

OHDATE, T.; KITA, K.; INOUE, Y. Kinetics and redox regulation of Gpx1, an atypical 2-Cys peroxiredoxin, in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 10, p. 787-790, 2010.

OHLMEIER, S.; KASTANIOTIS, A. J.; HILTUNEN, J. K.; BERGMANN, U. The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and res piratory growth. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 3956-3979, 2004.

OHTAKE, Y.; YABUCHI, S. Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**., v. 7, p. 953–961, 1991.

OJEDA, L.; KELLER, G.; MUHLENHOFF, U.; RUTHERFORD, J. C.; LILL, R.; WINGE, D. R. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v. 281, p. 17661-17669, 2006.

OKAMOTO, K.; BRINKER, A.; PASCHEN, S. A.; MOAREFI, I.; HAYER-HARTL, M.; NEUPERT, W.; BRUNNER, M. The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. **EMBO J.**, v. 21, p. 3659–3671, 2002.

OLAFSDOTTIR, K.; REED, D. J. Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 964, p. 377-382, 1988.

OLIVEIRA, M. A.; DISCOLA, K. F.; ALVES, S. V.; MEDRANO, F. J.; GUIMARÃES, B. G.; NETTO, L. E. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. **Biochemistry**., v. 49, p 3317-3326, 2010.

OSTERGAARD, H.; TACHIBANA, C.; WINTHER, J. R Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. J. Cell Biol., v. 166, p. 337-345, 2004.

OUTTEN, C. E.; CULOTTA, V. C. Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. J. Biol. Chem., v. 279, p. 7785-7791, 2004.

PALADE, G. E. The fine structure of mitochondria. Anat. Rec. v. 114, p. 427-451, 1952.

PARK, S.; G.; CHA, M.; K.; JEONG, W.; KIM, I.; H.; Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzimas in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v. 275, p. 5723-5732, 2000.

PARSONAGE, D.; YOUNGBLOOD, D. S.; SARMA, G. N.; WOOD, Z. A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. **Biochemistry**, v. 44, p. 10583-10592, 2005.

PEDRAJAS, J. R.; KOSMIDOU, E.; MIRANDA-VIZUETE, A.; GUSTAFFSON, J. A.; WRIGHT, A. P. H.; SPYROU, G. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**., v. 274, p. 6566-6573, 1999.

PEDRAJAS, J. R.; MIRANDA-VIZUETE, A.; JAVANMARDY, N.; GUSTAFS-SON, J. A.; SPYROU, G. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thiore-doxin peroxidase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 26, p.16296-6301, 2000.

PEDRAJAS, J. R.; PADILLA, C. A.; MCDONAGH, B.; BARCENA, J. A. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 13, p. 249-258, 2010.

PEDRAJAS, J. R.; McDONAGH, B.; HERNÁNDEZ-TORRES, F.; MIRANDA-VIZUETE, A.; GONZÁLEZ-OJEDA, R.; MARTÍNEZ-GALISTEO, E.; PADILLA, C. A.; BÁRCENA, J. A.

Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 24, p. 115-128, 2016.

PENNINCKX, M. J.; ELSKENS, M. T. Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. Adv. Microb. Physiol., v. 34, p. 239-301, 1993.

PERKINS, G.; RENKEN, C.; MARTONE, M. E.; YOUNG, S. J.; ELLISMAN, M.; FREY, T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. **J. Struct.** Biol., v. 119, p. 260-272, 1997.

PESKIN, A. V.; LOW, F. M.; PATON, L. N.; MAGHZAL, G. J.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C.C. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H_2O_2 is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 11885-11892, 2007.

PORRAS, P.; PADILLA, C. A.; KRAYL, M.; VOOS, W.; BÁRCENA, J. A. One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v. 281, p. 16551-16562, 2006.

PORRAS, P.; MCDONAGH, B.; PEDRAJAS, J. R.; BARCENA, J. A.; PADILLA, C. A. Structure and function of yeast glutaredoxin 2 depend on postranslational processing and are related to subcellular distribution. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1804, p. 839-845, 2010.

POVEDA-HUERTES, D.; MULICA, P.; VÖGTLE F. N. The versatility of the mitochondrial presequence processing machinery: cleavage, quality control and turnover. **Cell Tissue Res**., v. p. 2016

PRAKASH, S.; TIAN, L.; RATLIFF, K. S.; LEHOTZKY, R. E.; MATOUSCHEK, A. An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, p. 830-837, 2004.

PUJOL-CARRION, N.; BELLI, G.; HERRERO, E.; NOGUES, A.; de la TORRE-RUIZ, M. A. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Sci., v. 119, p. 4554-4564, 2006.

QIN, J.; CLORE, G. M.; KENNEDY, W. M.; HUTH, J. R.; GRONENBORN, A. M. Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B. **Structure**, v. 15, p. 289-297, 1995.

REINDERS, J.; ZAHEDI, R. P.; PFANNER, N.; MEISINGER, C.; SICKMANN, A. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. **J. Proteome Res.** v. 5, p. 1543-1554, 2006.

RHEE, S. G.; KANG, S. W.; JEONG, W.; CHANG, T. S.; YANG, K. S.; WOO, H. A. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, p. 183-189, 2005.

RHEE, S. G.; WOO, H. E. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H_2O_2 , and protein chaperones. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 15, p. 781-794, 2011.

RHEE, S. G.; WOO, H. A.; KIL, I. S.; BAE, S. H. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 4403-4410, 2012.

RIEMER, J.; BULLEID, N.; HERRMANN, J. M. Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. **Science**, v. 324, p. 1284-1287, 2009.

RIEMER, J.; FISCHER, M.; HERRMANN, J. M. Oxidation-driven protein import into mitochondria: Insights and blind spots. **Biochim. Biophys. Acta Biomem.**, v. 1808, p. 981-989, 2011.

RIEMER, J.; SCHWARZLÄNDER, M.; CONRAD, M.; HERRMANN. J. M. Thiol switches in mitochondria: operation and physiological relevance. **Biol. Chem.**, v. 396, p. 465-482, 2015.

RIETSCH, A.; BECKWITH, J. The genetics of disulfide bond metabolism. **Annu. Rev. Genet**., v. 32, p. 163-184, 1998.

RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, M. T.; TAMARIT, J.; BELLÍ, G.; ROS, J.; HERRERO, E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. **Mol. Biol. Cell.**, v. 13, p. 1109-1121, 2002.

ROVERI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 202-212, 1994.

SAITOH, T.; IGURA, M.; NOBITA, T.; OSE, T.; KOJIMA, R.; MAENAKA, K.; ENDO, T.; Kohda, D. Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. **EMBO J**., v. 26, p. 4777-4787, 2007.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. Science, v. 283, p. 1488-1493, 1999.

SCHAFFER, S. W.; SULEIMAN, M. S. **Mitochondria:** The dynamic organelle. New York: Springer, 2007. 359 p.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. **Curr. Genet.**, v. 16, p. 339-346, 1989.

SCHMIDT, O.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**., v. 11, p. 655-667, 2010.

SCHNEIDER, A.; OPPLIGER, W.; JENÖ, P. Purified inner membrane protease I of yeast mitochondria is a heterodimer. J. Biol. Chem., v. 269, p. 8635-8638, 1994.

SCHULTZ, B. E.; CHAN, S. I. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 30, p. 23-65, 2001.

SCHULZ, C.; LYTOVCHENKO, O.; MELIN, J.; CHACINSKA, A.; GUIARD, B.; NEUMANN, P.; FICNER, R.; JAHN, O.; SCHMIDT, B.; REHLING, P. Tim50's presequence receptor domain is essential for signal driven trans-port across the TIM23 complex. J. Cell Biol., v. 195, p. 643–656, 2011.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol.** Cell., v. 48, 158-167, 2012.

SHELTON, M. D.; CHOCK, P. B.; MIEYAL, J. J. Glutaredoxin: role in reversible protein sglutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 7, p. 348-366, 2005.

SHIOTA, T.; MABUCHI, H.; TANAKA-YAMANO, S.; YAMANO, K.; ENDO, T. In vivo proteininteraction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 108, p. 15179-15183, 2011. SIDERIS, D. P.; TOKATLIDIS, K. Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. **Mol. Microbiol.**, v. 65, p. 1360-1373, 2007.

SIPOS, K.; LANGE, H.; FEKETE, Z.; ULLMANN, P.; LILL, R.; KISPAL, G. Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. **J. Biol. Chem**., v. 277, p. 26944–26949, 2002.

SJOSTRAND, F.S. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. Nature, v. 171, p. 30-32, 1953.

SRIRAM, S. M.; KWON, Y. T. The molecular principles of N-end rule recognition. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 17, p. 1164-1165, 2010.

SRIRAM, S. M.; KIM, B. Y.; KWON, Y. T. The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. v. 12, p. 735-747, 2011.

STEPHEN, D. W.; JAMIESON, D. J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**., v. 141, p. 207–212, 1996.

STOJANOVSKI, D.; BOHNERT, M; PFANNER, N.; van der LAAN, M. Mechanisms of protein sorting in mitochondria. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., v. 4, p. 1-40, 2012.

STOLDT, S.; WENZEL, D.; HILDENBEUTEL, M.; WURM, C. A.; HERRMANN, J. M.; JAKOBS, S. The inner-mitochondrial distribution of Oxal depends on the growth conditions and on the availability of substrates. **Mol. Biol. Cell.**, v.23, p. 2292-2301, 2012.

STURTZ, L. A.; DIEKERT, K.; JENSEN, L. T.; LILL, R.; CULOTTA, V. C. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. J. Biol. Chem., v. 276, p. 38084-38089, 2001.

SUN, J.; TRUMPOWER, B. L. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. Arch. Biochem. Biophys., v. 419, p. 198-206, 2003.

SUNDARESAN, M.; YU, Z. X.; FERRANS, V. J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science.**, v. 270, p. 296-299, 1995.

SUZUKI, T.; VARSHAVSKY, A. Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space. **EMBO J**., v. 18, p. 6017–6026, 1999.

SZTUL, E. S.; HENDRICK, J. P.; KRAUS, J. P.; WALL, D.; KALOUSEK, F.; ROSENBERG, L. E. Import of rat ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria: two-step processing of the leader peptide. **J. Cell Biol.**, v. 105, p. 2631-2639, 1987.

TAHARA, E. B.; BARROS, M. H.; OLIVEIRA, G. A.; NETTO, L. E.; KOWALTOWSKI, A. J. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. **FASEB J.**, v. 21, p. 274-83, 2007.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 11, p. 621-632, 2010.

TAMURA, Y.; HARADA, Y.; SHIOTA, T.; YAMANO, K.; WATANABE, K.; YOKOTA, M.; YAMAMOTO, H.; SESAKI, H.; ENDO, T. Tim23-Tim50 pair coordinates func-tions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. **J. Cell Biol.**, v. 184, p. 129-141, 2009.

TANAKA, T.; IZAWA, S.; INOUE, Y. GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v. 280, p. 42078-42087, 2005.

TASAKI, T.; SRIRAM, S. M.; PARK, K. S.; KWON, Y. T. The N-end rule pathway. Annu. Rev. Biochem., v. 81, p. 261-289, 2012.

TAYLOR, A. B.; SMITH, B. S.; KITADA, S.; KOJIMA, K.; MIYAURA, H.; OTWINOWSKI, Z.; ITO, A.; DEISENHOFER, J. Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. **Structure**., v. 9, p. 615-625, 2001.

TEIXEIRA, P. F.; GLASER, E. Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1833, p. 360-370, 2013.

TERZIYSKA, N.; GRUMBT, B.; KOZANY, C.; HELL, K. Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 1353-1363, 2009.

TOLEDANO, M. B.; KUMAR, C.; Le MOAN, N.; SPECTOR, D.; TACNET, F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 3598-3607, 2007.

TOLEDANO, M. B.; DELAUNAY-MOISAN, A.; OUTTEN, C. E.; IGBARIA, A. Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 18, p.1699-1711, 2013.

TOLEDO, J. C.; AUDI, R.; OGUSUCU, R.; MONTEIRO, G.; NETTO, L. E. S.; AUGUSTO, O. Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 50, p. 1032-1038, 2011.

TROTTER, E W.; GRANT, C. M. Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**. v. 4, p. 392-400, 2005.

TRUJILLO, M.; CLIPPE, A.; MANTA, B.; FERRER-SUETA, G.; SMEETS, A.; DECLERCQ, J. P.; KNOOPS, B.; RADI, R. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 467, p. 95-106, 2007.

TRUSCOTT, K. N.; KOVERMANN, P.; GEISSLER, A.; MERLIN, A.; MEIJER, M.; DRIESSEN, A. J.; RASSOW, J.; PFANNER, N.; WAGNER, R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. **Nature Struct. Biol.**, v. 8, p. 1074-1082, 2001.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol., v. 552, p. 335-344, 2003.

TZAGOLOFF, A. Mitochondria. New York: Plenum Press, 1982. 342 p.

UKAI, Y.; KISHIMOTO, T.; OHDATE, T.; IZAWA, S.; INOUE, Y. Glutathione peroxidase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is distributed in mitochondria and involved in sporulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 411, p. 580-585, 2011.

VACA JACOME, A. S.; RABILLOUD, T.; SCHAEFFER-REISS, C.; ROMPAIS, M. AYOUB, D.; LANE, L. BAIROCH, A.; VAN DORSSELAER, A.; CARAPITO, C. N-terminome analysis of the human mitochondrial proteome. **Proteomics.**, v. 15, p. 2519-2524, 2015.

van DAMME, P.; MARTENS, L.; VAN DAMME, J.; HUGELIER, K.; STAES, A.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K. Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. **Nat. Methods,** v. 2, p. 771-777, 2005.

van der LAAN, M.; BOHNERT, M.; WIEDEMANN, N.; PFANNER. N. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. **Trends Cell Biol.**, v. 22, p. 185-192, 2012.

van der LAAN, M.; HORVATH, S. E.; PFANNER, N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 41, p. 33-42, 2016.

van der LAAN, M.; WIEDEMANN, N.; MICK, D. U.; GUIARD, B.; REHLING, P.; PFANNER, N. A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 2271–2276, 2006.

van LOON, A. P.; PESOLD-HURT, B.; SCHATZ, G. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 83, p. 3820-3824, 1986.

VARSHAVSKY, A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 93, p. 12142–12149, 1996.

VARSHAVSKY A. The N-end rule at atomic resolution. Nat. Struct. Mol. Biol., v.15, p. 1238-1240, 2008.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. Mol. Cell., v. 26, p. 1-14, 2007.

VÖGTLE, F. N.; WORTELKAMP, S.; ZAHEDI, R. P.; BECKER, D.; LEIDHOLD, C.; GEVAERT, K.; KELLERMANN, J.; VOOS, W.; SICKMANN, A.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. **Cell.**, v.139, p. 428-439, 2009.

VÖGTLE, F.N.; PRINZ, C.; KELLERMANN, J.; LOTTSPEICH, F.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. **Mol. Biol. Cell.**, v. 22 p. 2135-2143, 2011.

VÖGTLE, F. N.; BURKHART, J. M.; RAO, S.; GERBETH, C.; HINRICHS, J.; MARTINOU, J. C.; CHACINSKA A.; SICKMANN, A.; ZAHEDI, R. P.; MEISINGER, C. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. **Mol. Cell. Proteomics.**, v. 12, p. 1840-1852, 2012.

WAYPA, G. B.; GUZY, R.; MUNGAI, P. T.; MACK, M. M.; MARKS, J. D.; ROE, M. W.; SCHUMACKER, P. T. Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. **Cir. Res.**, v. 99, p. 970-978, 2006.

WIEDEMANN, N.; VAN DER LAAN, M.; HUTU, D. P.; REHLING, P.; PFANNER, N. Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain. **J. Cell Biol.**, v. 179, p. 1115–1122, 2007.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat Chem Biol.**, v. 4, p. 278-286, 2008.

WITTIG, I; BRAUN, H. P.; SCHÄGGER, H. Blue native PAGE. Nat. Protoc., v. 1, p. 418 - 428, 2006.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, p. 650-653, 2003a.

WOOD, Z. A.; SCHRODER, E.; HARRIS, J. R.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxirredoxins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, p. 32-40, 2003b.

YAMAMOTO, H.; ESAKI, M.; KANAMORI, T.; TAMURA, Y.; NISHIKAWA, SI.; ENDO, T. Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. **Cell.**, v. 111, p. 519–528, 2002.

YAMANO, K.; KUROYANAGI-HASEGAWA, M.; ESAKI, M.; YOKOTA, M.; ENDO, T. Step-size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation. J. Biol. Chem., v. 283, p. 27325-27332, 2008a.

YAMANO, K.; YATSUKAWA, Y.; ESAKI, M.; HOBBS, A. E.; JENSEN, R. E.; ENDO, T. Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 3799-3807, 2008b.

ZAMAN, S.; LIPPMAN, S. I.; ZHAO, X.; BROACH, J. R. How *Saccharomyces cerevisiae* responds to nutrients. **Annu. Rev. Genet.**, v. 42, p. 27-81, 2008.

ZHANG, L., HACH, A. Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 56, p. 415-426, 1999.