

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

--0--

SINTESIS IN VITRO DEL PRECURSOR DE LA
ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HIGADO DE RATA:
ESTUDIO DE SU TRANSPORTE A MITOCONDRIAS AISLADAS

Trabajo que presenta
CARMEN GONZALEZ BOSCH
para optar al Grado de
Doctor en Ciencias
Biológicas

1987



UMI Number: U607645

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607645

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

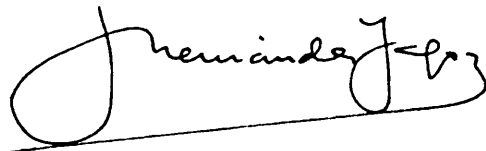
Ri. 18804810.

R. 6135

José Hernández Yago, Jefe del Departamento de Microscopia Electrónica
del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Caja de Ahorros
de Valencia,

CERTIFICA: que D^a Carmen González Bosch, ha realizado bajo su dirección
en este Departamento el trabajo que presenta con el título de "Síntesis
in vitro del precursor de la ornitina transcarbamilasa de hígado de rata:
estudio de su transporte a mitocondrias aisladas".

Valencia, 16 de Noviembre de 1987

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Hernández Yago', written over a horizontal line.

Dr. José Hernández Yago

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro me han ayudado, haciendo posible la realización de esta tesis:

A D. José Hernández-Yago, director de este trabajo, por sus consejos, su estímulo y su confianza.

A D. Santiago Grisolia, del que siempre he recibido apoyo, estímulo y buenos consejos.

A mis padres que siempre me han estimulado y ayudado a seguir adelante.

A Vicente Miralles, con quien he compartido el trabajo durante dos años y al que debo mucho por su ayuda, su apoyo en todo momento y su incondicional amistad.

A M^ª Eugenia Armengod, de la que tanto he aprendido, y que siempre ha estado dispuesta a brindarme su ayuda y sus buenos consejos.

A Erwin Knecht, del que siempre he recibido ayuda, amistad y buenos consejos.

A mi abuelo D. Francisco Bosch por sus excelentes consejos y su continuo apoyo y estímulo.

A mis compañeros del laboratorio, Enrique Roche, Jose Luis Vargas y Fernando Aniento, por su ayuda en la elaboración de esta tesis y por su amistad, que ha hecho que el trabajo diario sea algo muy estimulante.

Quiero agradecer muy especialmente su ayuda a M^ª Jesus Marcote, que con su constante esfuerzo y su incondicional amistad, ha sido fundamental para que pudiera terminar la elaboración de esta tesis.

A Pilar García por su ayuda y su apoyo en todo momento.

Agradezco también, de una forma especial, el esfuerzo que han realizado Eloisa y M^ª José Barber, ya que sin su inestimable ayuda no hubiera podido finalizar este trabajo.

A Asunción Montaner, M^{re} José Agulló, Ruth Wallace y Silvia Tortosa, que de un modo u otro me han prestado su ayuda cuando la he necesitado.

A Lali Alonso y Carmen Navarro por su ayuda y su su amistad.

A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Citológicas, de los que siempre he recibido ayuda, apoyo y amistad.

A D. Luis Franco por su inestimable ayuda.

A JuanPe, que siempre ha estado a mi lado.

A mi padre

INDICE

INTRODUCCION

- 1) ORIGEN DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES.
 - 1.1) Participación de dos sistemas genéticos.....1
 - 1.2) Proteínas sintetizadas en la mitocondria
 - 1.2.1) Características del genoma mitocondrial...1
 - 1.2.2) Sistema de traducción mitocondrial.....3
 - 1.2.3) Identidad de los productos de la síntesis mitocondrial..... 3
 - 1.2.4) Propiedades de las proteínas sintetizadas en la mitocondria..... 5
 - 1.3) Proteínas sintetizadas en el citosol.
 - 1.3.1) Localización de la síntesis
 - A) Síntesis sobre polisomas asociados a la mitocondria..... 6
 - B) Síntesis sobre el retículo endoplásmico rugoso..... 7
 - C) Síntesis sobre polisomas citoplásmicos libres..... 9
 - 1.3.2) Productos de la traducción citosólica ...10
 - 1.4) Coordinación entre ambos sistemas genéticos
 - 1.4.1) Participación de la mitocondria en la expresión del ADN nuclear.....11

1.4.2)	Regulación del sistema mitocondrial por productos de la síntesis citosólica.....	13
1.5)	Significado del origen dual de las proteínas mitocondriales	14
2)	TRANSPORTE A LA MITOCONDRIA DE LAS PROTEINAS SINTETIZADAS EN EL CITOSOL.	
2.1)	Características generales del proceso.....	16
2.2)	Síntesis en forma de precursores	
2.2.1)	Polipéptidos precursores de mayor tamaño: características de la secuencia señal.....	17
2.2.2)	Precursores sintetizados sin extensión adicional.....	21
2.3)	Transporte a la mitocondria de los precursores citosólicos.	
2.3.1)	Principios básicos del transporte de proteínas a través de membranas	22
	Proteínas sintetizadas sobre el retículo endoplásmico.....	22
	Proteínas de la superficie bacteriana.....	31
	Proteínas de orgánulos.....	34
	Visión actual del transporte a través de membranas.....	37
2.3.2)	Transporte a la mitocondria.	
	Reconocimiento de la superficie mitocondrial.....	38
	Translocación a la mitocondria ..	42
2.4)	Procesado de los precursores importados.....	51

2.5) Ensamblado de los precursores
procesados en unidades funcionales.....54

OBJETIVOS 55

MATERIAL Y METODOS

Material

- Animales..... 58
- Cepas bacterianas.....58
- Medios de cultivo y soluciones tampón..... 58
- Productos y reactivos químicos..... 60
- Productos radiactivos..... 60
- Enzimas..... 60
- Películas fotográficas..... 60

Metodos

- Condiciones generales del cultivo de
bacterias.....61
- Medida del crecimiento bacteriano.....61
- Conservación de las cepas bacterianas.....61
- Transformación de bacterias con ADN
plasmídico.....62
- Obtención de ADN plasmídico63
- Electroforesis en gel de agarosa:
electroelución de fragmentos de ADN.....65
- Tratamiento de fragmentos de ADN con la
ADN polimerasa I de E. Coli

(Fragmento Klenow).....	66
-Transcripción "in vitro".....	66
-Electroforesis en geles de poliacrilamida-urea.....	74
-Hibridación de ácidos nucleicos	75
-Síntesis de proteínas en un sistema libre de células.....	76
-Marcado radiactivo de proteínas.....	80
-Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS...	81
-Fluorografía.....	81
-Inmunoprecipitación de proteínas específicas..	82
-Aislamiento de mitocondrias.....	84
-Ensayos de transporte a la mitocondria.....	84

RESULTADOS

1) OBTENCIÓN DEL ARNm DEL PRECURSOR DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HIGADO DE RATA (pOCT).	
1.1) Transcripción "in vitro".....	87
1.2) Caracterización del transcrito obtenido....	93
2) SÍNTESIS "IN VITRO" DEL PRECURSOR DE LA OCT A PARTIR DE SU ARNm ESPECÍFICO	
2.1) Obtención del polipéptido precursor.....	93
2.2) Inmunoprecipitación con anti-OCT.....	98
3) TRANSPORTE DE pOCT A MITOCONDRIAS AISLADAS DE HIGADO DE RATA.	

3.1) Ensayo preliminar.....	98
3.2) Caracterización del transporte	
3.2.1) Requerimiento del medio de traducción...	100
3.2.2) Eficiencia del transporte en función de la cantidad de mitocondrias.....	104
3.2.3) Eficiencia del precursor para ser transportado.....	107
3.2.4) Transporte en función del tiempo de incubación.....	107
3.2.5) Efecto de los distintos componentes de la solución de traducción	111
3.2.6) Requerimientos energéticos.....	111
4) ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE TRADUCCION QUE FAVORECEN EL TRANSPORTE	
4.1) Caracterización parcial de los factores requeridos.....	114
4.2) Estimulación por iones potasio y magnesio.....	115
4.3) Estimulación por poliaminas	
4.3.1) Efecto de la espermidina y la espermina en función de la concentración.....	119
4.3.2) Otras poliaminas.....	121
4.3.3) Espermidina en presencia de iones magnesio.....	121
4.3.4) Efecto de la espermina en ausencia de lisado de reticulocitos.....	124

5) TRANSPORTE EN PRESENCIA DE UN EXTRACTO CITOSOLICO DE HIGADO DE RATA.	
5.1) Uso de un extracto citosólico como medio de transporte.....	124
5.2) Requerimientos del transporte	
5.2.1) Efecto de la mezcla de traducción.....	127
5.2.2) Efecto de las poliaminas.....	127
5.3) Caracterización parcial de los factores requeridos para el transporte.....	127
6) ESTUDIO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE pOCT A LA MITOCONDRIA	
6.1) Transporte en presencia de apocitocromo c: competencia por la entrada.....	130
6.2) Transporte a otras mitocondrias.....	133
DISCUSION.....	139
CONCLUSIONES.....	150
BIBLIOGRAFIA.....	152

INTRODUCTION

1) ORIGEN DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES.

1.1) PARTICIPACION DE DOS SISTEMAS GENETICOS.

La biogénesis de la mitocondria depende de la estrecha colaboración de dos sistemas genéticos diferentes, uno constituido por el ADN nuclear y el sistema de síntesis de proteínas localizado en el citosol, y otro propio de la mitocondria que consta de un ADN relativamente pequeño y los componentes necesarios para su transcripción y traducción (1).

A pesar de que la mitocondria posee su propio genoma y tiene capacidad para sintetizar proteínas, sólo dirige la síntesis de una docena de sus polipéptidos constituyentes, mientras que el resto de sus proteínas son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en el citosol y transportadas al orgánulo donde llegan a ser funcionales (2).

Los dos sistemas genéticos implicados en la biosíntesis de las proteínas mitocondriales muestran marcadas diferencias en cuanto a las características de los ribosomas, enzimas y factores necesarios para la traducción (3). Si se tiene en cuenta, además, que existen proteínas mitocondriales con unas subunidades sintetizadas en el citosol y otras sintetizadas en la mitocondria, es evidente que debe existir una regulación coordinada de ambos sistemas para lograr una mitocondria funcional .

1.2) PROTEINAS SINTETIZADAS EN LA MITOCONDRIA.

1.2.1) Características del genoma mitocondrial

Las mitocondrias contienen su propio ADN constituido por moléculas, que en la mayoría de los organismos son dúplex circulares, y cuyo tamaño oscila entre aproximadamente 16 Kb en animales, a más de 100

Kb en plantas (4). Los genes contenidos en este ADN codifican los ARN ribosómicos, mensajeros y de transferencia mitocondriales.

El código genético que utiliza la mitocondria difiere ligeramente del que se denomina "universal", por ser utilizado por la mayoría de los sistemas biológicos (1).

Se conoce la secuencia nucleotídica completa del ADN mitocondrial de algunos mamíferos, así como de Drosophila melanogaster, levadura etc, lo que ha permitido comprobar que aunque las funciones genéticas esenciales del ADN mitocondrial se han conservado en organismos de distinto nivel evolutivo, la organización de los genes y la forma de expresarse han evolucionado de una forma muy diferente de unas especies a otras.

El genoma mitocondrial más simple y especializado es el de mamíferos (5). Presenta una estructura muy empaquetada, con los genes contiguos y carentes de intrones. Sólo codifica dos ARNr, el mínimo número de ARNt necesarios para decodificar los mensajeros endógenos, y un pequeño número de proteínas que funcionan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. Este genoma parece haber alcanzado un nivel evolutivo con pocas posibilidades de cambio, excepto quizás, para una posterior reducción de su información genética.

A pesar de la autonomía del genoma mitocondrial, su replicación depende por completo de enzimas codificados por genes nucleares que no están relacionados con los que participan en la replicación del genoma nuclear. También las polimerasas y otros enzimas requeridos para la síntesis de ARN y su procesado post-transcripcional, son productos de los genes nucleares.

1.2.2) Sistema de traducción mitocondrial.

Salvo los ARNs mitocondriales y, en algún caso, alguna proteína ribosómica, el resto de los constituyentes proteicos del aparato de traducción mitocondrial (como son factores de iniciación, factores de elongación, aminoacilsintetasas, proteínas ribosomales, etc.), son sintetizados por el sistema núcleo-citoplásmico, siendo característicos de este orgánulo y diferentes de los del sistema de traducción citosólico.

Existen marcadas diferencias entre los ribosomas mitocondriales y citosólicos, de manera que los primeros presentan coeficientes de sedimentación inferiores a los característicos de eucariotas y más próximos a los bacterianos, y son sensibles a los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en bacterias (p.e.: cloranfenicol), sin ser afectados por los que actúan sobre los ribosomas citoplásmicos (p.e.: cicloheximida) (1).

El uso de diferentes métodos permitió establecer que la síntesis de proteínas en la mitocondria tenía lugar, fundamentalmente, sobre ribosomas asociados a la membrana interna mitocondrial (6,7). Este hecho se relacionó inicialmente con el carácter hidrofóbico de los productos de la traducción mitocondrial. Sólo en el caso de la proteína "var 1", una proteína hidrofílica sintetizada en mitocondrias de levadura, se pensaba que era sintetizada sobre una población de polisomas libres. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la proteína "var 1" también es sintetizada sobre polisomas asociados a la membrana interna (8). Esto parece apoyar la idea de que todos los productos de la síntesis mitocondrial son sintetizados por la misma población de ribosomas unidos a membrana.

1.2.3) Identidad de los productos de la síntesis mitocondrial.

La mitocondria sintetiza solamente del 5-15 % de

sus proteínas, aunque éstas son esenciales para constituir un orgánulo funcional.

La existencia de un sistema de síntesis proteica propio de la mitocondria fué establecido en 1958 por McLean y col (9). Estos autores demostraron que cuando se incubaban mitocondrias aisladas de hígado de rata en presencia de un aminoácido radiactivo, eran capaces de incorporarlo en sus proteínas en un proceso dependiente de ATP.

A partir de este momento se llevaron a cabo múltiples experimentos encaminados a identificar y caracterizar los productos de la síntesis mitocondrial. Esto planteó múltiples problemas, debido a las dificultades que se presentaban a la hora de separar y purificar las proteínas con las técnicas disponibles. El avance de los métodos analíticos, como la utilización de la electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia del detergente dodecil sulfato sódico, permitió identificar estos productos.

Los estudios realizados "in vivo" para determinar si una proteína era producto de la síntesis mitocondrial, se basaron en dos criterios fundamentalmente: a) la proteína estaba ausente en mutantes que presentaban defectos en la síntesis proteica mitocondrial, b) Su síntesis se bloqueaba al inhibir la traducción mitocondrial, pero no cuando se inhibía la citosólica.

Las primeras evidencias obtenidas sobre la naturaleza de estas proteínas indicaban que, en su mayoría, estaban asociadas a la membrana mitocondrial interna (10) y que eran componentes del último tramo de la cadena respiratoria (11).

Estudios realizados con mitocondrias aisladas determinaron que la mayoría de los productos de la traducción mitocondrial eran subunidades de complejos multienzimáticos, que precisaban de las subunidades sintetizadas en el citosol para constituir complejos funcionales. Entre los complejos que requieren para su síntesis la participación de ambos sistemas genéticos, se encuentran la citocromo oxidasa, la

coenzima QH_2 -citocromo c reductasa, y la ATPasa sensible a oligomicina. En mitocondrias de animales y hongos, tales como Neurospora crassa, también se incluye en este grupo la NADH-coenzima Q reductasa.

La posterior secuenciación del genoma mitocondrial de múltiples organismos, ha confirmado la naturaleza de estos productos de síntesis mitocondrial. En todos los casos corresponden a subunidades de complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y del complejo ATPasa. La única excepción es la proteína denominada "var 1", constituida por una sola subunidad, que forma parte de los ribosomas mitocondriales (12). Hay diferencias en los productos proteicos codificados por diferentes ADNs mitocondriales, lo cual podría ser reflejo de la evolución divergente que sufrió el ADN ancestral tras su introducción en células eucariotas (13).

1.2.4) Propiedades de las proteínas sintetizadas en la mitocondria.

Los polipéptidos sintetizados por la mitocondria, salvo la proteína "var 1", son altamente hidrofóbicos y muy insolubles en agua, presentando una gran tendencia a formar agregados en solución acuosa, que sólo se disocian en presencia de detergentes iónicos muy fuertes (1). Estas propiedades son atribuidas a su alto contenido en aminoácidos apolares. Por ejemplo, la lipoproteína del complejo ATPasa contiene sólo un 23 % de aminoácidos polares, en contraste con los valores habituales de 50-60% de la mayoría de las proteínas solubles.

Se ha especulado con la posibilidad de que el carácter hidrofóbico de ciertos componentes mitocondriales fuera el responsable de que tuvieran que ser sintetizados en el interior del orgánulo, evitando así su transporte a través de la fase acuosa citosólica. Sin embargo esta explicación no resulta satisfactoria a la vista de que otras muchas proteínas mitocondriales de carácter hidrofóbico, son sintetizadas sobre polisomas citosólicos y

posteriormente transportadas a la mitocondria, como es el caso de la subunidad 9 de la ATPasa en N. crassa (14).

1.3) PROTEINAS SINTETIZADAS EN EL CITOSOL.

1.3.1) Localización de la síntesis.

A) Síntesis sobre polisomas asociados a la mitocondria.

En 1972, Kellems y Butow (15), comprobaron que mitocondrias aisladas de S. cerevisiae llevaban asociadas ribosomas tipo 80S, que eran más resistentes a la disociación por 0.4 M KCl, que los ribosomas de los polisomas libres, o unidos a las membranas del retículo endoplásmico. Estos ribosomas estaban presentes en las mitocondrias de los mutantes "petite", que carecían de ADN mitocondrial, y la síntesis "in vitro" catalizada por ellos era sensible a cicloheximida y no a cloranfenicol.

Por otra parte, en el mencionado trabajo se aportaron evidencias de la existencia de sitios de alta y baja afinidad de unión a la mitocondria para estos ribosomas.

Se comprobó que entre un 80-85% de los polipéptidos sintetizados por estos polisomas, permanecían unidos a la mitocondria después de una centrifugación en gradiente de sacarosa, y que eran resistentes a la digestión con papaina, a menos que la membrana fuera disociada con detergentes (16,17). Estos resultados sugerían que los polisomas citoplásmicos asociados a la mitocondria, sintetizaban cadenas polipeptídicas que eran segregadas al interior del orgánulo durante la traducción.

Posteriormente los mismos autores (18) observaron que, en esferoplastos en crecimiento, se detectaban ribosomas unidos a la membrana externa mitocondrial en

forma de estructuras polisómicas. Estos polisomas se localizaban en regiones específicas de la membrana, donde existía una estrecha asociación con la membrana interna.

El análisis de los polipéptidos sintetizados por los polisomas unidos a mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* (19), demostró que estaban enriquecidos en proteínas mitocondriales nacientes, que eran rápidamente transportadas a un compartimento, que resultaba inaccesible a la acción de proteasas añadidas externamente. En concreto, determinaron que los productos de su síntesis estaban muy enriquecidos en las tres subunidades de la F_1 ATPasa.

A la vista de sus resultados, los autores consideraron la posibilidad de que estos ribosomas asociados a la mitocondria sintetizaran proteínas destinadas al orgánulo, que serían segregadas a su interior mediante un proceso vectorial de translocación, tal como ocurría con las proteínas de secreción (20).

Suissa y Schatz (21) determinaron, que en la síntesis de polipéptidos mitocondriales en levadura, estaban implicados tanto polisomas citosólicos libres como una pequeña proporción de polisomas asociados a mitocondrias. Dado que ninguno de los ARNs mensajeros que codificaban proteínas mitocondriales, eran traducidos predominantemente sobre polisomas asociados a la mitocondria, los autores concluyeron que estos polisomas podían participar en el importe de proteínas a la misma, pero esta vía no parecía ser esencial.

B) Síntesis sobre el retículo endoplásmico rugoso.

Schatz y Mason (1), en sus trabajos iniciales sobre la biosíntesis del apocitocromo c comprobaron que al llevar a cabo la síntesis "in vivo", en presencia de precursores radiactivos, el apocitocromo c aparecía concentrado alrededor del retículo endoplásmico.

González-Cadavid y Cordova (22) demostraron que

una fracción microsomal de hígado de rata incorporaba (^{14}C)-leucina en moléculas de apocitocromo c, cuando se incubaba en un sistema libre de células, sugiriendo que el apocitocromo c era sintetizado sobre microsomas. Sin embargo, estos mismos autores comprobaron que el apocitocromo c era sintetizado tanto por polisomas libres como por los unidos a membranas, pero debido a que en hígado de rata hay aproximadamente el doble de polisomas unidos que libres, concluyeron que el apocitocromo c se sintetizaba principalmente sobre polisomas unidos al retículo.

En contraste con estos resultados, datos más recientes indican que el apocitocromo c de hígado de rata no se sintetiza sobre las membranas del retículo endoplásmico rugoso, considerándose que gran parte del citocromo que aparece asociado a los microsomas, procede de las mitocondrias presentes en el sistema "in vitro" (23).

Godinot y Lardy (24) comprobaron, que en hígado de ratas inyectadas con (^{14}C)-isoleucina, la glutámico deshidrogenasa de microsomas se marcaba más rápidamente que la de la mitocondria, indicando que el enzima se sintetizaba sobre el retículo endoplásmico rugoso (RER). Este hallazgo fué confirmado por Kawajiri y col (25,26).

Cuando se llevaba a cabo una síntesis de proteínas "in vitro", en presencia de microsomas, una elevada proporción de los productos sintetizados, se detectaban asociados a membrana. Cuando estos productos fueron posteriormente incubados con membrana mitocondrial externa, se comprobó que algunas de las proteínas sintetizadas eran específicamente transferidas a la membrana mitocondrial (27). Estos hechos se podían relacionar con observaciones realizadas al microscopio electrónico, que revelaban la existencia de una asociación entre mitocondria y RER en hígado de rata (28).

Suissa y Schatz (21), aislaron el ARN mensajero de

los polisomas asociados al RER, y ensayaron su capacidad para sintetizar proteínas. Comprobaron que este ARN dirigía la incorporación de aminoácidos con mucha eficiencia, pero no dirigía la síntesis de proteínas mitocondriales.

Heinrich y col (29,30) indicaron, que las subunidades IV y V de la citocromo c oxidasa eran traducidas, al menos en parte, por ribosomas unidos a las membranas del retículo.

Hay y col (31) no pudieron detectar cambios cualitativos o cuantitativos en la tasa de síntesis, ni en la acumulación de sus formas precursoras, en levaduras que presentaban mutaciones que afectaban la ruta secretora, concluyendo que si la vía de secreción desempeñaba algún papel en la biogénesis de las proteínas mitocondriales, este debía ser poco importante.

Las evidencias de que se dispone actualmente, no permiten determinar con certeza si los resultados mencionados en este apartado, proceden de artefactos de las técnicas de fraccionamiento subcelular, o si realmente, tienen algún significado fisiológico. A pesar de ello, parece bastante claro que aunque el RER pudiera participar en la síntesis de las proteínas mitocondriales, no sería en ningún caso la vía principal de su síntesis.

D) Síntesis sobre polisomas citoplásmicos libres.

Los primeros datos a favor de que la síntesis de los precursores citosólicos de las proteínas mitocondriales, tenía lugar sobre polisomas libres, se obtuvieron en 1979. Raymond y Shore (32), determinaron que el ARNm de la carbamilfosfato sintetasa (CPS) de hígado de rata, se encontraba asociado fundamentalmente a polisomas libres. En el mismo trabajo llevaron a cabo experimentos de pulso y caza, marcando hepatocitos aislados con ³⁵S-metionina, y comprobaron que el precursor de la CPS se localizaba en el citosol, desapareciendo rápidamente del mismo, con la aparición concomitante

de la forma madura en la mitocondria. Concluyeron que el producto primario era sintetizado sobre polisomas libres y transportado posteriormente a la mitocondria.

Zimmermann y col (33) comprobaron, que la síntesis del translocador de ADP/ATP de la membrana interna de mitocondrias de N. crassa, también tenía lugar sobre polisomas libres. A partir de este momento se ha confirmado tanto "in vivo" como "in vitro" que la mayoría de los precursores mitocondriales de origen citosólico son traducidos sobre polisomas libres (13).

1.3.2) Productos de la traducción citosólica.

Actualmente está perfectamente establecido, que la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en ribosomas citoplásmicos y transportadas a la mitocondria.

Entre las proteínas sintetizadas de esta forma, se encuentran las proteínas de la matriz mitocondrial, las de la membrana externa, espacio intermembrana y la mayoría de las proteínas de la membrana interna. También se encuentran entre estos productos los enzimas que participan en la replicación, transcripción y traducción del ADN mitocondrial (34).

La identificación de las proteínas mitocondriales que son sintetizadas en el citosol, ha sido posible mediante el uso de diversas técnicas. Entre éstas cabe destacar el uso de los mutantes citosólicos de S. cerevisiae, denominados "petite" (1). Estos mutantes son deficientes en la respiración, por carecer de componentes de la cadena de transporte de electrones y del sistema de fosforilación oxidativa, y se caracterizan por haber perdido gran parte o todo el ADN mitocondrial. Por tanto las proteínas presentes en estas mitocondrias tienen que ser sintetizadas en el citosol. El análisis de sus proteínas mostró que

el sistema núcleo-citoplásmico producía la mayoría de los enzimas mitocondriales solubles, así como el grueso de sus proteínas de membrana.

También se utilizaron cultivos celulares crecidos en presencia de inhibidores de la síntesis mitocondrial (1). En estas condiciones, si la inhibición era completa, cualquier proteína presente en las mitocondrias sería de origen citosólico. Los resultados obtenidos con este método indicaron que la mayoría de las proteínas mitocondriales eran sintetizadas en el citosol, pero este procedimiento tenía la limitación de que el inhibidor podía interferir en otras funciones celulares además de la síntesis proteica mitocondrial.

Los experimentos de pulso y caza constituyeron una de las formas más directas de estudiar el origen de las proteínas mitocondriales (1). Cuando estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de inhibidores de la síntesis citosólica, como la cicloheximida, se comprobó que se inhibía tanto el marcado de las proteínas del citosol, como el de la mayoría de las proteínas mitocondriales, confirmando el origen citosólico de estas últimas (1).

1.4) COORDINACION ENTRE AMBOS SISTEMAS GENETICOS

1.4.1) Participación de la mitocondria en la expresión del ADN nuclear.

El hecho de que la información genética necesaria para la biogénesis de la mitocondria esté distribuida entre dos compartimientos espacialmente separados, debe implicar la existencia de mecanismos que aseguren una coordinada expresión de ambos genomas.

La mayoría de los productos sintetizados en la mitocondria, se asocian con productos de la síntesis citosólica, para formar proteínas oligoméricas. Normalmente los productos de ambos sistemas genéticos se sintetizan de un modo estequiométrico, para

asegurar que el proceso sea eficiente y económico para la célula. Por ello, se ha tratado de determinar si un sistema controla la expresión del otro, o si la célula posee un mecanismo adicional para coordinar la expresión de ambos sistemas.

Estudios realizados con levaduras, indicaban que la síntesis de las subunidades mitocondriales de origen nuclear, no requería la presencia de un genoma mitocondrial intacto, ya que mutantes de levadura que carecían de ADN mitocondrial, tenían proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo idénticas a las que presentaban las cepas salvajes, y que se sintetizaban a un nivel prácticamente normal (35,36).

También se ha comprobado en S. cerevisiae, que la inhibición de la síntesis proteica mitocondrial, conduce a la acumulación de las cuatro subunidades citosólicas de la citocromo oxidasa oxidasa que son traducidas en el citosol (37). Estos estudios demostraron que la síntesis de las subunidades citosólicas de la citocromo oxidasa no dependía de la síntesis de las correspondientes subunidades mitocondriales, aunque éstas son necesarias para su correcto ensamblaje en la mitocondria.

Hay autores, sin embargo, que apoyan la existencia de la regulación del sistema núcleo-citoplásmico por parte de la mitocondria. Así Barath y Kuntzel (38) encontraron que, en N. crassa, la inhibición de la síntesis proteica mitocondrial parecía estimular la biosíntesis de la ADN polimerasa, ARN polimerasa y metionil-tRNA transformilasa mitocondriales, así como de algunos factores de elongación. Para explicar estos hallazgos los autores propusieron que la mitocondria podía sintetizar represor(es) específicos para las proteínas de origen citosólico implicadas en la transcripción y traducción mitocondrial, de tal manera que cuando la síntesis del represor cesara aumentaría la síntesis de las proteínas mitocondriales de origen citosólico. Sin embargo, el posible papel regulador de la mitocondria se ha puesto en duda ya que el aumento en los niveles de los productos citosólicos, en ausencia de síntesis mitocondrial, no era significativo.

Se ha propuesto también la existencia de un transporte de proteínas desde la mitocondria al citosol (39), e incluso se ha descrito la existencia en mitocondrias de hígado de rata de algún inhibidor de la síntesis citosólica (40). Sin embargo, estos resultados son controvertidos y la opinión más generalizada actualmente, es que no hay evidencias suficientes que demuestren la existencia de una regulación de la expresión del genoma nuclear por parte de la mitocondria (13).

1.4.2) Regulación del sistema mitocondrial por productos de la síntesis citosólica

Los enzimas y proteínas codificados en el núcleo juegan un importante papel en la transcripción del ADN mitocondrial, en el procesado de sus ARNs precursores y en la traducción de sus ARNm. Por tanto los genes mitocondriales pueden ser regulados en cualquiera de estas etapas por los productos nucleares.

Estudios llevados a cabo "in vitro" con levaduras, indicaron que la inhibición de la síntesis citosólica mediante cicloheximida, provocaba un descenso en la tasa y duración de la síntesis mitocondrial. Sin embargo, si las células se incubaban primero con cloranfenicol, la síntesis proteica mitocondrial en presencia de cicloheximida se incrementaba considerablemente, sugiriendo que durante la preincubación se acumulaban productos de la síntesis citosólica que estimulaban la posterior traducción mitocondrial (41).

Poyton y Kavanagh (37) demostraron, que la síntesis en mitocondrias aisladas de las subunidades I y III de la citocromo oxidasa de levadura, era estimulada por la adición de extracto citosólico, pero si previamente las subunidades citosólicas eran eliminadas de este extracto por inmunoprecipitación, se perdía el efecto completamente. Este experimento sugería que la síntesis mitocondrial de las subunidades I y III estaba regulada por la presencia de las correspondientes subunidades citosólicas.

Aunque experimentos similares condujeron a otros autores a considerar que los factores citosólicos que estimulaban la síntesis de proteínas no eran proteínas sino nucleótidos de guanina (42), Thirunavukkarasu (43) comprobó que el incremento de la síntesis se debía a factores proteicos termolábiles, no dializables y que precipitaban con sulfato amónico.

Se ha tratado de determinar si el sistema núcleo-citoplásmico podía regular la expresión del genoma mitocondrial a nivel transcripcional, pero hasta el momento no hay evidencias de que exista tal regulación del genoma como un todo, ni tampoco de genes individuales (13).

1.5) SIGNIFICADO DEL ORIGEN DUAL DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES.

El hecho de que la mayoría de las proteínas mitocondriales sean sintetizadas en el citosol a pesar de que la mitocondria posee su propio genoma, se relaciona habitualmente con su posible origen evolutivo.

La hipótesis más aceptada es la denominada endosimbiótica, que postula que la mitocondria deriva de un tipo de células bacterianas que, en algún momento de su evolución, fueron parásitos de las células que ahora se denominan eucariotas. La bacteria original necesitaba su propio genoma para ser funcional, pero una vez se estableció la simbiosis pudo recurrir al sistema de traducción de la célula. Para ello se produjo una transferencia de material genético desde la mitocondria al núcleo de la célula huésped, mediante un proceso de duplicación génica y cesión de una de las copias al núcleo.

Esta hipótesis parece estar apoyada por el hecho de que se han detectado secuencias del ADN mitocondrial en el núcleo de organismos tan diversos como levadura, insectos o rata (13). En el caso de la

levadura se ha comprobado que estas porciones de ADN mitocondrial se encuentran integradas en los cromosomas nucleares, formando un producto de fusión de cuatro regiones no contiguas del ADN mitocondrial (incluyendo partes de los genes del citocromo b y de la proteína ribosomal mitocondrial) (44). Este hecho parece sugerir que proceden de la escisión y reordenación de estas secuencias del ADN mitocondrial, seguidas de una transposición de este ADN aberrante al núcleo.

Tanto en levadura como en otros organismos, las secuencias de ADN mitocondrial encontradas en el núcleo son probablemente inactivas genéticamente. Estas secuencias podrían constituir restos, a modo de fósiles, de los sucesos ocurridos durante la evolución de la célula eucariótica. Sin embargo en el caso de la subunidad 9 de la ATPasa, de N. crassa, el gen que codifica esta proteína es nuclear, pero existe una copia de este gen en su ADN mitocondrial que aparentemente no se expresa, y cuyo significado fisiológico se desconoce (45).

Actualmente no se conoce el mecanismo por el cual el ADN se traslada desde la mitocondria al núcleo, ni si este proceso de transferencia continúa en los diferentes organismos. En el caso de Podospora anserina, se ha detectado un movimiento de secuencias de ADN mitocondrial hacia el núcleo, en cada ciclo celular, que se ha relacionado con la senescencia de este organismo (46).

También se ha comprobado que en plantas superiores el genoma mitocondrial puede interaccionar con el del cloroplasto. Así en Zea mays se han encontrado porciones del ADN del cloroplasto integradas en el ADN mitocondrial, aunque no se sabe si estas secuencias se expresan en la mitocondria, ni el mecanismo por el cual son transferidos a ella (47).

Se plantea la cuestión de por qué si tuvo lugar esa transferencia del genoma mitocondrial al núcleo, ésta no fué completa, reteniendo el orgánulo algunas secuencias. Recientemente von Heijne (48) ha propuesto una hipótesis para explicar la existencia de un mínimo genoma mitocondrial y el hecho de que sean

retenidos en él genes que codifican proteínas altamente hidrofóbicas. El autor asume, que el mecanismo de transporte post-traducciona1 para las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, evolucionó cuando ya existía el mecanismo de secreción co-traducciona1 de la célula huésped. De este modo, aunque a la célula le resultó beneficiosa la reducción del genoma mitocondria1, una pequeña porción del mismo permaneció en el orgánulo, porque contenía los genes que codificaban aquellas proteínas mitocondriales que por sus características no podían escapar al sistema de secreción citosólico.

2) TRANSPORTE A LA MITOCONDRIA DE LAS PROTEINAS SINTETIZADAS EN EL CITOSOL.

2.1) CARACTERISTICAS GENERALES DEL PROCESO.

Las proteínas mitocondriales codificadas por genes nucleares, son sintetizadas en el citosol sobre polisomas libres, siendo posteriormente importadas a la mitocondria, donde alcanzan su localización funcional definitiva (2).

En la mayoría de los casos, el transporte de proteínas desde el citosol a la mitocondria, implica las siguientes etapas : a) síntesis en el citosol de un polipéptido precursor, que generalmente, contiene una extensión amino-terminal adicional; b) unión del precursor a la superficie mitocondria1; c) translocación del mismo en, o a través de, las membranas mitocondriales; d) procesado proteolítico del precursor, en el interior de el interior de la mitocondria; e) ensamblado de las proteínas, en complejos u orientaciones topológicas definitivas.

Dependiendo del compartimiento intramitocondria1 donde se localice la proteína, estas etapas presentan

características diferenciadas, que aseguran la correcta distribución de las proteínas en el orgánulo (2).

2.2) SINTESIS EN FORMA DE PRECURSORES.

2.2.1) Polipéptidos precursores de mayor tamaño: características de la secuencia señal

La mayoría de las proteínas mitocondriales, se sintetizan en el citosol en forma de precursores, que contienen una extensión amino-terminal adicional, denominada secuencia señal, péptido señal o presecuencia (31).

El hecho de que las proteínas de secreción también se sinteticen con una secuencia amino-terminal adicional (20), indujo a pensar, que el papel de este péptido adicional, podía ser dirigir los precursores a la mitocondria.

Al analizar las presecuencias mitocondriales conocidas, se comprobó que no existe una significativa homología de secuencia entre ellas, pero sí presentan, características estructurales comunes. Así, la mayoría de estas secuencias contienen abundantes restos aminoácidos básicos e hidroxilados, y carecen de aminoácidos ácidos, o de tramos extensos de restos hidrofóbicos (49). El espaciado regular de las cargas positivas, a lo largo de sus secuencias primarias, sugiere una estructura secundaria común.

Roise y col (50) indicaron que la presecuencia de la subunidad IV de la citocromo-oxidasa de levadura, podía adoptar una conformación helicoidal, de tal manera que los residuos cargados positivamente se localizaban a un lado de la hélice, mientras que los no cargados e hidrofóbicos, se agrupaban en el lado opuesto. Figura 1.

von Heijne (51) determinó que la mayoría de las presecuencias conocidas podían adoptar este tipo de conformación, sugiriendo que la propiedad común de estas secuencias podría ser su capacidad de plegarse

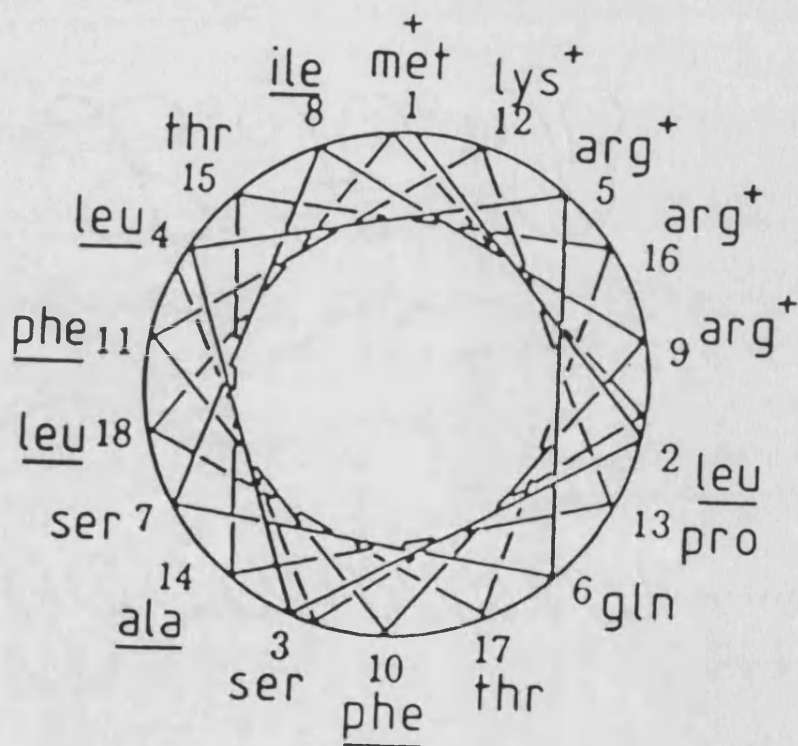


FIGURA 1

Esquema de la hélice anfifílica que puede formar la pre-secuencia de la subunidad IV de la citocromo oxidasa de levadura.

(Extraído de la Ref. 50)

en una conformación de α -hélice, en condiciones adecuadas, pudiendo ser la señal reconocida por el sistema de transporte mitocondrial.

Estas características, diferencian claramente las presecuencias mitocondriales, de las extensiones adicionales de las proteínas transportadas al retículo endoplásmico de las células eucariotas, o a través de la membrana plasmática bacteriana.

Por otra parte, no hay una aparente correlación entre el tamaño de la secuencia señal y la localización final de la proteína madura en la mitocondria, ni tampoco los precursores de subunidades del mismo complejo enzimático contienen necesariamente, un número fijo de aminoácidos adicionales (31).

Experimentos de fusión génica y análisis de delección, demostraron que la presecuencia de una proteína mitocondrial importada es, normalmente, suficiente para dirigir al interior de la mitocondria una proteína "pasajera" unida a ella, aunque ésta no sea mitocondrial, transportándola al compartimiento adecuado, propio de la proteína a la cual corresponde la presecuencia.

Por ejemplo, la fusión de los 22 primeros residuos del precursor de la subunidad IV de la citocromo c oxidasa de levadura, con la dihidrofolato reductasa de ratón (una proteína citosólica), da lugar a una proteína resultante, que es eficientemente importada y procesada por la mitocondria, tanto "in vivo" como "in vitro" (52).

Los mismos resultados se obtuvieron con las presecuencias de otras proteínas mitocondriales, como la la ornitina transcarbamilasa humana (53), y la alcohol deshidrogenasa III de levadura (54).

Análisis más detallados de estas extensiones amino-terminales demostraron que hay porciones de las mismas que son críticas para que se mantenga su

funcionalidad. Por ejemplo, los 12 primeros residuos de la secuencia señal de la subunidad IV de la citocromo oxidasa de levadura, cuando se fusionaron con la dihidrofolato reductasa, dirigieron su importe al interior del orgánulo (55).

En otros casos se ha comprobado que la región crítica no se sitúa en el extremo amino-terminal de la secuencia señal, como ocurre con la presecuencia de la OCT humana, en la que se ha determinado que es la región central de la presecuencia, la que resulta esencial para el transporte (53).

Puesto que el prepéptido dirigía, tanto el importe del precursor a la mitocondria como su distribución entre los compartimentos del orgánulo, se determinó si ambas funciones eran especificadas por una única señal, o si estaban implicadas múltiples señales.

Los estudios realizados con los precursores del citocromo c1, y de la citocromo c peroxidasa de levadura (dos proteínas localizadas en el espacio intermembrana) demostraron que contenían tramos de aminoácidos no cargados en el extremo C-terminal de sus presecuencias, que podían prevenir su translocación a través de la membrana interna (54).

Se comprobó que, en algunas secuencias señal, los segmentos de máximo momento hidrofóbico de las hélices formadas, coincidían con las regiones consideradas "críticas" para sus funciones en el transporte (51).

Las evidencias actuales sugieren que la información necesaria para dirigir las proteínas a su correcta localización intramitocondrial, está contenida en una serie de señales discretas, linealmente ordenadas en el extremo amino-terminal de las proteínas transportadas. Estas señales de importe, no consisten en secuencias específicas reconocidas por la mitocondria, sino más bien, son determinantes de la estructura secundaria o terciaria de péptido señal (49).

2.2.2) Precursores sintetizados sin extensión adicional.

Unos pocos precursores mitocondriales son sintetizados sin extensión amino-terminal adicional. Entre ellos se encuentran los de las proteínas destinadas a la membrana externa mitocondrial, así como alguna proteína de membrana interna. Este es el caso por ejemplo del translocador de ADP/ATP y del apocitocromo c, de membrana interna.

Se ha sugerido que aunque estas formas precursoras presentan el mismo tamaño que sus correspondientes proteínas maduras pueden presentar otras características estructurales que les diferencien de ellas. Por ejemplo el precursor del translocador de nucleótidos de adenina queda retenido cuando se hace pasar por una columna de hidroxapatito, mientras que su forma madura no se une a la misma (56). También en el caso de la porina, una proteína de la membrana externa mitocondrial se observan diferencias ya que su forma precursora es sensible a tripsina en presencia de deoxicolato, mientras que la forma madura, una vez integrada en la membrana, es insensible a la proteólisis, incluso en presencia de detergente (57).

Se ha comprobado que estos precursores sintetizados con el mismo tamaño que sus formas maduras, también contienen secuencias que les guían a la mitocondria, aunque en este caso, no son eliminadas proteolíticamente durante el transporte.

Así, los primeros 41 aminoácidos de la principal proteína de la membrana externa de mitocondrias de levadura, una proteína de 70 Kd sintetizada sin extensión amino-terminal, contiene la información capaz de dirigir la proteína a la mitocondria, y localizarla en la membrana externa (58). Se ha comprobado, que si se unen los 61 residuos amino-terminales de esta proteína, con la β -galactosidasa de E. coli, la proteína de fusión es transportada a la membrana externa mitocondrial (59). Estos 41 residuos amino-terminales contienen dos señales, una localizada en los 12 primeros residuos, que dirige la proteína a la mitocondria. La otra señal, parece estar contenida, en una secuencia

ininterrumpida de 28 residuos no cargados, flanqueada por residuos básicos, que actúa como una señal de detención, ya que retiene la proteína en la membrana externa, previniendo su paso a través de la misma (60).

El precursor del citocromo c, una proteína localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial, carece de extensión amino-terminal, diferenciándose de su forma madura en que carece del grupo hemo, denominándose apocitocromo c (61).

Se ha sugerido que el apocitocromo c contiene una señal que le dirige a la mitocondria, que quedaría enmascarada en el citocromo c tras la unión al grupo hemo. Esta señal parece estar contenida en un segmento específico de la cadena que se extiende desde el residuo 66 hasta el extremo carboxilo-terminal del mismo, ya que sólo este fragmento es capaz de competir con un apocitocromo c sintetizado "in vitro", por la entrada a la mitocondria (62).

También en el caso de la proteína translocadora de ADP/ATP de la membrana interna de mitocondrias de levadura, que se sintetiza sin extensión N-terminal adicional, se ha localizado la señal que la dirige a su localización mitocondrial en los primeros 115 aminoácidos (49).

2.3) TRANSPORTE A LA MITOCONDRIA DE LOS PRECURSORES CITOSOLICOS

2.3.1) Principios básicos del transporte de proteínas a través de membranas

Proteínas sintetizadas sobre el retículo endoplásmico

La mayoría de las proteínas celulares son sintetizadas en el citosol aunque su localización

funcional sea un compartimiento separado del mismo por una o más membranas. Este hecho plantea la cuestión fundamental de cómo estas proteínas son insertadas o transportadas a través de la bicapa lipídica de la membrana, asegurando al mismo tiempo la correcta localización en su destino final.

La mayor parte de los conocimientos que se poseen actualmente sobre el transporte de proteínas a través de membranas procede de los estudios llevados a cabo con proteínas de secreción.

Los trabajos realizados por Palade (63) utilizando la microscopía electrónica, demostraron que la ruta general seguida por las proteínas de secreción suponía varias etapas: inicialmente aparecían en el lumen del retículo endoplásmico, pasaban posteriormente al aparato de Golgi y, las vesículas de secreción procedentes de este último, se fundían con la membrana celular, vertiendo su contenido al medio extracelular.

Para esclarecer los mecanismos moleculares que rigen el transporte de proteínas a través de membranas se han propuesto diversos modelos teóricos entre los que cabe destacar los siguientes:

A) Hipótesis de la secuencia señal

Este modelo postula que las proteínas son sintetizadas en el citosol en forma de precursores de mayor tamaño que contienen una secuencia adicional con información suficiente para dirigir la proteína a su destino final en la célula (64).

La existencia de esta secuencia adicional fue demostrada por Milstein y col (65), en base a los estudios que realizaron sobre síntesis de anticuerpos. Los autores comprobaron que en un sistema libre de células, programado con ARN mensajero de mieloma de ratón, se sintetizaba entre otros productos una forma precursora de mayor tamaño de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina. Este precursor era 1,500 daltons mayor que la cadena ligera presente en el anticuerpo y era convertido a su forma madura si la síntesis se llevaba a cabo en presencia de microsomas.

Experimentos de mapeo, mostraron que el precursor tenía una secuencia amino-terminal diferente a la de la proteína madura, por ello, se concluyó que una corta secuencia en este extremo de la molécula era la señal que indicaba a la proteína su destino final y se denominó "secuencia señal" (65).

Blobel y Dobberstein (64) confirmaron y extendieron estos resultados al comprobar que microsomas de páncreas canino, libres de polisomas, eran capaces de translocar formas precursoras recién sintetizadas de la cadena ligera k de la inmunoglobulina y de procesarlas proteolíticamente a su forma madura.

Estos resultados sirvieron como base para enunciar la hipótesis de "la secuencia señal", que proponía las siguientes etapas para la secreción celular de proteínas:

1- La síntesis de proteínas se inicia sobre polisomas libres.

2- Las proteínas que van a ser secretadas deben tener en su extremo amino-terminal un péptido extra que constituye la "secuencia señal" y que es lo primero que emerge del ribosoma.

3- La secuencia señal se une al retículo endoplásmico rugoso gracias al reconocimiento de una proteína de membrana que actúa como un receptor.

4- La proteína receptora, probablemente junto con otras proteínas, forma una especie de "poro" en torno a la secuencia señal.

5- La unión entre el poro y el ribosoma no es covalente.

6- La elongación del polipéptido "empuja" a la proteína a pasar a través del poro en una conformación extendida.

7- La secuencia señal es eliminada por una proteasa localizada en la cara luminal de la membrana del retículo endoplásmico rugoso .

Se han localizado "secuencias señal" en el extremo amino-terminal de muchas proteínas de secreción nascentes, cuyo tamaño oscila entre 15-30 aminoácidos (66).

Al analizar estas secuencias, se ha comprobado que existe una gran variabilidad en cuanto a su longitud y secuencia de aminoácidos, pero todas ellas constan de tres regiones estructuralmente diferenciadas: una región amino-terminal cargada positivamente, una región central hidrofóbica y una región carboxi-terminal más polar (67).

Recientemente, von Heijne (68), ha realizado un estudio sobre secuencias señal tanto de eucariotas como de procariotas, y ha comprobado, que existen sólo diferencias sutiles entre ambos tipos de extensiones adicionales. Las tres regiones características de estas secuencias, parecen haber sufrido presiones selectivas distintas, aunque cada una de ellas ha sido seleccionada de forma similar en procariotas y eucariotas. Esto hace pensar, que cada región de la secuencia señal juega un papel determinado en el transporte, y que éste es similar en todos los organismos.

Los estudios realizados para determinar la estructura secundaria de la secuencia señal, parecen indicar que la región hidrofóbica central, adopta preferentemente, estructura de α -hélice, termodinámicamente más favorable en un ambiente apolar, y un plegamiento β cerca del extremo carboxilo terminal (20).

Walter y Blobel (69) y Meyer y col (70) han aislado la denominada partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y la proteína reconocedora de esta partícula, denominada "docking protein" (DP) por Meyer, que coordinan la síntesis de las proteínas pre-secretoras con su inserción en microsomas.

La partícula de reconocimiento de la señal (SRP), es un complejo de 6 polipéptidos y un ARN de 7S, que se une a polisomas que están sintetizando proteínas

pre-secretoras o pre-membrana, produciendo la detención del crecimiento de la cadena cuando se han incorporado aproximadamente 80 aminoácidos. Ya que, alrededor de 40 quedan enmascarados por el ribosoma, al detenerse la síntesis, la porción del polipéptido que ha emergido al exterior corresponde a la secuencia señal (71).

El complejo SRP-polisoma se une a la proteína de unión de la SRP (DP), que es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico rugoso de 72,000 daltons. Tras la unión, la SRP se libera y el polisoma continúa la elongación de la cadena que pasa a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso. En el lumen, la secuencia señal es eliminada proteolíticamente, y tiene lugar la glicosilación (72). Figura 2.

Se han encontrado algunas proteínas de secreción cuyas características difieren de las previstas por esta hipótesis. Así la ovoalbúmina se sintetiza sobre el retículo sin ser procesada durante su inserción (73). Se determinó que posee una secuencia señal interna próxima al extremo amino-terminal de la proteína, que no es procesable pero que desempeña las mismas funciones en la translocación del polipéptido (74).

Las proteínas de membrana sintetizadas sobre el retículo endoplásmico siguen una ruta similar a las proteínas de secreción. Para este tipo de proteínas la hipótesis de la secuencia señal postula la existencia de secuencias de anclaje a la membrana o "secuencias stop", de manera que la orientación de cada proteína en la membrana estaría determinada por secuencias discretas de la cadena que actuarían independientemente (75).

B) Otras hipótesis

El modelo de "transferencia directa", propuesto por von Heijne y Blomberg (76), trata de explicar el paso de la cadena naciente a través de la membrana desde un punto de vista físico-químico, eliminando la necesidad de las proteínas formadoras de "túneles",

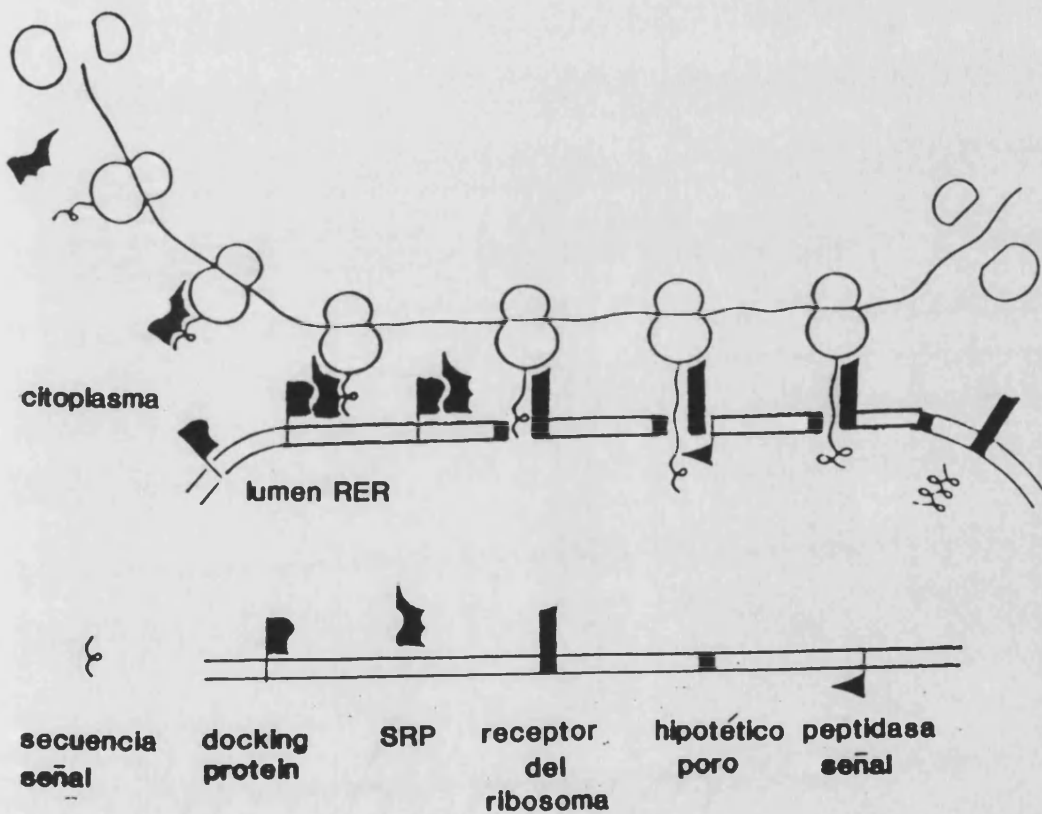


FIGURA 2

Modelo propuesto por la hipótesis de "la sequencia seña" para la translocación de proteínas a través de la membrana del reticulo endoplásmico.

(Extraída de la Ref. (75)).

postuladas por la hipótesis de la secuencia señal.

En esta hipótesis se destaca la importancia de la energía necesaria para que tenga lugar la transferencia de los distintos dominios del polipéptido, entre la fase acuosa citosólica y la fase hidrofóbica de la membrana. Se considera que la secuencia señal se asocia directamente con el núcleo lipofílico de la membrana, en virtud de su elevada hidrofobicidad, liberándose una energía que sería suficiente para forzar a los restos hidrofílicos del polipéptido a atravesar la bicapa.

Wickner por su parte postuló la hipótesis denominada de "la membrana gatillo", en la que se considera que la membrana puede "disparar" el plegamiento del polipéptido a una conformación que le permitiría insertarse en la bicapa lipídica (77).

Este modelo se diferencia de la hipótesis de la secuencia señal en que considera que la porción madura del polipéptido, contiene la información necesaria para el ensamblaje de la proteína en la membrana y que el papel desempeñado por la secuencia señal sería facilitar el plegamiento de la cadena polipeptídica a una conformación que favoreciera su inserción en la membrana. También se considera que en el reconocimiento de la superficie de la membrana pueden participar proteínas, lípidos o propiedades físicas particulares de la fase lipídica.

Engelman y Steitz (78) propusieron el modelo de "la horquilla espiral" en el que se considera que los fundamentos y mecanismos de la secreción de proteínas son los mismos que los que rigen el plegamiento de las proteínas integrales de membrana.

Postularon que, a medida que la proteína se sintetiza en el citosol se pliega en un ambiente acuoso dando lugar a dos hélices antiparalelas, una de las cuales estaría formada por la secuencia señal. Esta horquilla helicoidal se insertaría espontáneamente en la región hidrofóbica de la membrana gracias a interacciones hidrofóbicas.

Recientemente Singer y col (79), han propuesto un mecanismo molecular, válido tanto para la translocación de proteínas hidrofílicas a través de membranas como para la transferencia de proteínas integrales, que denominan "translocación de subdominios".

Proponen que el transporte de los polipéptidos tiene lugar mediante la translocación secuencial de sucesivos "subdominios" plegados. Este proceso se iniciaría con la unión de la secuencia señal, generalmente amino-terminal, a un receptor de membrana que induciría el plegamiento del primer subdominio. Una vez translocado este subdominio, el siguiente tramo de la cadena se plegaría en un segundo subdominio, que sería a su vez, translocado. Figura 3.

Como premisa para que su hipótesis sea válida, postulan la existencia de proteínas especiales de membrana, denominadas proteínas translocadoras. Cada una de ellas estaría compuesta por n subunidades homólogas, pero no idénticas, que formarían un canal acuoso en el centro del agregado. La característica especial adscrita a estas proteínas es que, en una de las interfases no idénticas entre subunidades vecinas, éstas estarían débilmente unidas. Esta interfase, aportaría la ruta de paso para la translocación del polipéptido hidrofílico.

Durante la intercalación, formación de subdominios y desplazamiento de cada segmento sucesivo, todos los residuos iónicos del segmento permanecerían en contacto con el agua, lo cual sería necesario para que la energía de activación fuese suficientemente baja. Los residuos hidrofóbicos, en cambio, quedarían protegidos en las porciones hidrófobas de la interfase.

Los mismos autores consideran que puede haber un mecanismo unitario, mediado por el mismo tipo de proteínas translocadoras, tanto para la integración en la membrana de polipéptidos anfipáticos de diversa topología, como para la completa translocación de proteínas a través de la bicapa (80). El único

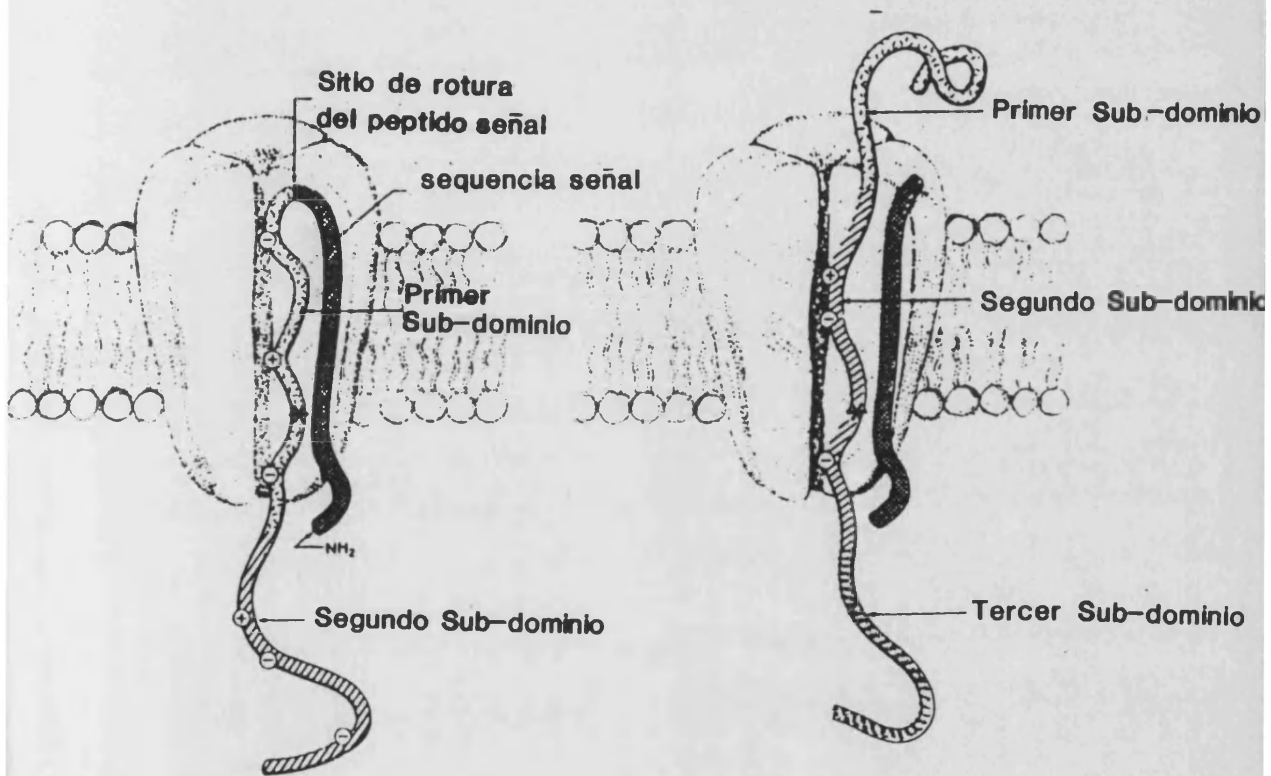


FIGURA 3

Modelo de "translocación de subdominios" propuesto por Singer y col. para explicar el transporte de proteínas a través de membranas.

(Extraído de la Ref. 79.)

requerimiento adicional que se necesita para la integración de proteínas, es que los tramos hidrofóbicos deben tener una longitud crítica, actuando como secuencias de detención o secuencias señal internas.

En este modelo la intercalación de proteínas en la membrana no supone en ningún momento la inserción directa de la proteína en la bicapa lipídica, sino que se lleva a cabo vía una interfase de la proteína translocadora.

Una consecuencia importante de este modelo es, que la topología final de la proteína integral de membrana viene determinada, en gran medida, por el mecanismo de su inserción en la membrana. Una vez intercalada se mantiene su orientación debido a que su desplazamiento en la bicapa supondría un gasto energético excesivo.

Proteínas de la superficie bacteriana

La superficie de las bacterias Gram negativas consta de tres capas: membrana plasmática, espacio periplásmico y membrana externa. Las proteínas de las dos últimas capas son secretadas a través de la membrana plasmática, que en procariotas es el equivalente funcional del retículo endoplásmico (81).

La translocación de estas proteínas, se caracteriza porque requiere un potencial electroquímico a través de la membrana plasmática y, en algunos casos, la participación de los productos de los genes denominados "sec". Estos últimos, se identificaron en bacterias portadoras de una serie de mutaciones letales, que afectaban la exportación de proteínas al periplasma y a la membrana externa (82,83).

Parece ser, que el requerimiento de estos productos es específico para cada precursor, ya que,

no se correlaciona con la presencia de secuencia señal, o con, un compartimiento subcelular determinado (84). Aunque se desconocen las funciones de estos productos, los datos que se poseen actualmente, apoyan su posible participación estabilizando las cadenas polipeptídicas nacientes, actuando como receptores, o incluso, catalizando el tránsito a través de la bicapa. Se piensa, que estos genes, pueden codificar una maquinaria de exportación, similar a la de eucariotas, aunque no se han caracterizado los componentes de la misma (85).

Todas las proteínas conocidas de la membrana externa y del periplasma, así como algunas de la membrana plasmática, son sintetizadas con una secuencia señal amino-terminal (85).

Estos péptidos líder, constan aproximadamente, de 23 aminoácidos. No se observa homología de secuencia entre los mismos, pero sí presentan caracteres estructurales comunes. Se ha demostrado que ésta, es esencial para la exportación (86), pudiendo desempeñar múltiples funciones en la célula, a juzgar por los efectos producidos, al introducir mutaciones en estas secuencias (87).

Se determinó, si la secuencia señal, era suficiente para especificar la exportación de las proteínas, o si, parte de la información, estaba contenida en la porción madura del polipéptido.

En experimentos de fusión génica, en los que se obtenían proteínas híbridas formadas por una secuencia señal seguida de una proteína no secretora, se comprobó, que las proteínas resultantes, no eran translocadas a través de la membrana plasmática (88). En cambio, si en lugar de la secuencia señal, se usaba la proteína de secreción casi completa, sí se producía la secreción (89). Estos resultados, indicaban que la porción madura de la proteína, contenía información necesaria para el transporte.

También se han descrito mutaciones, en las porciones maduras de algunas proteínas bacterianas, que afectan su exportación, y que apoyan la idea, de su participación en la translocación. Así

recientemente Randall y col (90), han descrito una mutación, en la región madura de la proteína de unión a la maltosa de E. coli, que revierte los efectos producidos por una mutación en la secuencia señal. Los autores postulan, que esta alteración en la exportación, podría deberse a un efecto indirecto sobre la secuencia señal, relacionado con el plegamiento que hace al precursor competente para el transporte.

Sin embargo McIntyre y col (91), indicaron, que la secuencia señal de la proteína OmpA de E. coli, contenía la información suficiente para transportar proteínas no secretoras. Los autores consideran, que la incapacidad de algunas secuencias señal para dirigir el transporte, no se debe a la falta de información, sino, a la incompatibilidad de la proteína a transportar, con el sistema de exportación.

Se ha demostrado, que las proteínas bacterianas, son translocadas cuando la cadena naciente ha alcanzado, al menos, un 80% de su tamaño definitivo, siendo ésta, la longitud crítica, diferente para cada proteína particular. Estos datos apoyan la observación de que, la translocación en bacterias, no está estrictamente acoplada a la elongación del polipéptido (92).

Las secuencias señal, son procesadas por una peptidasa líder, localizada en la membrana plasmática, y cuyo centro activo, asoma al espacio periplásmico (93).

En cuanto a los requerimientos energéticos del transporte de proteínas, se ha comprobado, que se precisa un potencial electroquímico a través de la membrana plasmática. Se considera poco probable, que la necesidad de este potencial se deba exclusivamente a que el mecanismo de transporte sea meramente electroforético, ya que el componente químico del gradiente es suficiente para mantener el transporte (94).

Chen y col (95) han indicado, que el ATP es necesario para el transporte co y post-traducciona de

proteínas a través de vesículas de membrana de E. coli, y que la fuerza protón-motriz, podría contribuir a aumentar la eficacia del transporte, pero sin ser esencial para el mismo.

Posteriormente, estos mismos autores, han caracterizado este requerimiento de ATP, y han considerado, que éste podría actuar a dos niveles. Por una parte, como fuente de energía de la translocación, y por otra parte, para facilitar el proceso, manteniendo, por ejemplo, la topología de las proteínas de membrana implicadas en la translocación (96).

Proteínas de orgánulos

La mayor parte de las proteínas de los orgánulos subcelulares, son sintetizadas en el citosol, y tienen que ser transportadas desde el mismo, a través de una o varias membranas, para alcanzar su localización definitiva.

A finales de los años 70 comenzó a estudiarse el mecanismo de transporte y ensamblaje de las proteínas de orgánulos subcelulares, como cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y glioxisomas. Las primeras aproximaciones experimentales, implicaron el uso de sistemas de síntesis de proteínas "in vitro", para caracterizar los productos primarios de la síntesis, de los ARNm que codifican los polipéptidos del orgánulo (97).

Dobberstein y col (98), demostraron que la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBPCasa), era sintetizada como un precursor de mayor tamaño que la correspondiente forma madura. La extensión adicional de este precursor tenía un tamaño aparente de 3,500 daltons, superior al encontrado en las proteínas de secreción. Cuando esta forma precursora, era incubada con extractos de algas, era convertida a su forma madura.

Otro importante descubrimiento fué demostrar que el ARNm que codifica este precursor es sintetizado

sobre polisomas libres, a diferencia de lo que ocurre en el caso de las proteínas de secreción cuyos ARNm se localizan fundamentalmente en polisomas asociados a membrana. Estos hallazgos indicaban que las proteínas de los cloroplastos eran transportadas a través de las dos membranas del orgánulo en un proceso post-traducciona (98).

A partir de este momento, se describieron precursores de mayor tamaño en mitocondrias y microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas), y se determinó que su transporte tenía lugar de un modo post-traducciona, siendo similar en todos los casos aunque cada sistema mostraba características propias (97).

Los dos orgánulos donde el transporte de proteínas se ha estudiado más extensivamente son, el cloroplasto y la mitocondria. Ambos sistemas de transporte presentan muchas características comunes.

Así en ambos casos, el transporte implica la síntesis en el citosol de precursores, que en la mayoría de los casos, contienen secuencias N-terminales adicionales. Estas extensiones son eliminadas durante, o inmediatamente después, de que tenga lugar la importación de la proteína por el orgánulo, aunque el procesado no es un requisito para que tenga lugar dicha importación (49).

Puesto que a la mitocondria se le dedica un capítulo aparte, se describe a continuación, el sistema de transporte de proteínas al cloroplasto.

En el cloroplasto la biosíntesis de sus proteínas depende de dos sistemas genéticos: el nuclear y el del orgánulo. El cloroplasto sintetiza sus ARNr y ARNt, así como unas pocas proteínas. El resto de sus proteínas son sintetizadas en el citosol y transportadas al orgánulo (97).

Se ha analizado la secuencia de la subunidad menor de la RuBPCasa, que es codificada por un gen nuclear y sintetizada en el citosol, y se comprueba que aunque existe homología de secuencia en las porciones maduras del enzima en diferentes especies, la secuencia señal

sólo presenta unas pocas regiones de homología (97).

El papel desempeñado por la secuencia señal, en la translocación de proteínas y en su maduración, no es del todo claro, pero sí se ha demostrado, que es necesaria su presencia para que tenga lugar el transporte "in vitro" (99).

También se han llevado a cabo experimentos de fusión génica, en los cuales se obtenían proteínas quiméricas, conteniendo la secuencia señal de una proteína transportada al orgánulo unida a una proteína citosólica, comprobándose que, "in vivo", estos precursores son transportados al orgánulo y procesados concomitantemente (100).

En el caso de la subunidad pequeña de la RuBPCasa, se ha comprobado, que en los procariotas fotosintéticos, donde la subunidad no ha de ser transportada a través de membranas, no se sintetiza como precursor de mayor tamaño (101).

Se han realizado experimentos, encaminados a determinar si la distribución de las proteínas importadas en los distintos compartimientos del orgánulo, venía determinada por la secuencia señal. Smeekens y col (102), realizando experimentos con proteínas de fusión, concluyeron que la secuencia señal de la plastocianina tenía dos dominios: uno responsable del importe al orgánulo, y otro del transporte a través de la membrana del tilacoide.

Los precursores, parece ser, que se unen a receptores expuestos en la cara citosólica de la membrana externa, como una primera etapa de su importe. Si los cloroplastos aislados, se tratan suavemente con proteasas, antes de llevar a cabo la incubación con precursores, no tiene lugar ni la unión ni la importación, probablemente, porque se han destruido los sitios de unión de la membrana (103).

El transporte de las proteínas del estroma y del tilacoide, requiere energía en forma de ATP, aunque no se sabe de qué modo actúa (101). Recientemente, Pain y Blobel (104) encontraron, que la importación de la subunidad pequeña de la RuBPCasa, requería la

hidrólisis de ATP en el estroma, para ser transportada post-traduccionalmente "in vitro". Los autores, sugirieron que el importe podría requerir una ATPasa del estroma del cloroplasto, cuya función aún resulta incierta.

Todos los precursores citosólicos de las proteínas del cloroplasto examinados, sufren un procesado proteolítico, durante, o inmediatamente después, de su transporte al orgánulo. Cuando las proteínas alcanzan la membrana interna, sus secuencias señal son eliminadas por proteólisis, un proceso que puede facilitar la liberación del polipeptido de los receptores. En algunos casos esta maduración, parece tener lugar en varias etapas, aunque poco se conoce al respecto, habiéndose caracterizado parcialmente, peptidasas señal de algunos organismos (105)

Visión actual del transporte a través de membranas

El hecho de que en los últimos años se hayan aportado múltiples datos, en apoyo de la existencia de un mecanismo de transporte post-traducciona1 para las proteínas de secreción, ha cambiado por completo la visión que se tenía hasta el momento del transporte a través de membranas.

Actualmente se tiende a considerar, que el mecanismo que permite la translocación de proteínas a través de los sistemas membranosos es universal, presentando características particulares en cada sistema, que asegurarían su especificidad (106).

Los dos tipos de translocación que se consideraban hasta el momento, uno acoplado a la traducción, y otro post-traducciona1, no serían excluyentes entre sí, de tal manera, que la translocación co-traducciona1 constituiría un mecanismo para garantizar, que las proteínas destinadas a ser insertadas, en, o a través de las membranas, no fuesen liberadas al citosol, sin ser la vía obligatoria de transporte de las proteínas de secreción, como se pensaba (107).

Se considera que en todos los sistemas estudiados,

es necesaria una estructura conductora de la translocación, cuya característica básica parece ser la carencia de plegamiento del polipéptido a transportar. Así Maher y Singer (108), lograron la translocación posttraduccional, "in vitro", de la preprolactina, en un ambiente reductor, en el que se evitaba la formación de enlaces disulfuro, y por tanto, el plegamiento de la cadena.

Se desconoce el mecanismo, que mantiene desplegados los polipéptidos, para hacerlos competentes en el transporte. En el caso de las proteínas de secreción, podría lograrse gracias a que su interacción con la SRP, permitiría "anclar" su extremo amino-terminal en esta partícula, mientras que el extremo carboxi-terminal, quedaría embebido en el ribosoma, evitándose de este modo el plegamiento.

Asimismo se ha comprobado, que en el caso de las proteínas de bacterias (92), y de mitocondrias (109), había una clara correlación entre la capacidad de los polipéptidos para ser translocados a través de membranas y la conformación extendida del polipéptido a transportar.

También se ha sugerido que pueden existir enzimas encargados de preservar este estado desplegado. Ya que recientemente se ha descrito la necesidad de la hidrólisis del ATP para el transporte post-traduccional en diversos sistemas, se ha apuntado que esta energía liberada por el ATP podría dirigir la acción de este hipotético enzima (110).

2.3.2) Transporte a la mitocondria

Reconocimiento de la superficie mitocondrial

Una vez sintetizados, los precursores de las proteínas mitocondriales son transportados a la mitocondria, donde alcanzan su localización funcional definitiva.

La primera etapa de este transporte implica la

interacción del precursor con la superficie mitocondrial, de un modo específico, que permita al orgánulo, diferenciar los precursores citosólicos del resto de las proteínas celulares.

Se ha sugerido la existencia de receptores proteicos, localizados en la membrana externa, que mediarían la interacción de los precursores con el orgánulo (31).

Si el importe de las proteínas mitocondriales, estuviera mediado por receptores específicos, éstos, deberían reunir las siguientes características: a) estar expuestos a la cara citoplásmica de la membrana externa, para ser accesibles, tanto a los precursores recién sintetizados, como a los factores que modifican la interacción precursor-receptor; b) unir los precursores aún cuando la translocación no llegara a producirse; c) satisfacer los criterios definidos para las interacciones ligando-receptor (unión rápida y reversible, presencia de un número limitado de sitios de unión en la membrana, ser saturables por el ligando y ser específicos) y d) servir como ruta obligada para el importe.

Hennig y Neupert (111), comprobaron, que el apocitocromo c sintetizado "in vitro", era transportado a mitocondrias aisladas de N. crassa, donde era convertido en citocromo c, por unión del grupo hemo. Sin embargo, si se adicionaba deuterohemina, un análogo del grupo hemo que inhibe reversiblemente su unión al apocitocromo c, se producía la unión del apocitocromo a la superficie mitocondrial, sin que tuviera lugar el importe a su interior. La adición al medio de protohemina, producía la conversión, a su forma madura, del precursor unido.

Posteriormente, el mismo grupo de investigadores, caracterizó los posibles receptores de membrana, determinando que eran altamente específicos para el apocitocromo c, ya que éste era desplazado por apocitocromo c de otras fuentes, pero no por el citocromo c de la propia N. crassa (112).

La unión del apocitocromo c a la mitocondria

parecía implicar un número limitado de sitios de unión, y mostraba especificidad de sustrato. Se estimó que el grado de inhibición observado en presencia del apocitocromo c "competidor", parecía corresponder a la existencia de, aproximadamente, 90 picomoles de receptor por cada miligramo de proteína mitocondrial.

Resultados similares, se obtuvieron, al estudiar el transporte del apocitocromo c a mitocondrias aisladas de hígado de rata (113).

Se han aportado evidencias que sugieren la existencia de receptores para otras proteínas mitocondriales. Así, Ono y col (114), han purificado parcialmente una proteína receptora, esencial para la importación de la pre-ornitina aminotransferasa, a partir de membrana externa de mitocondrias de hígado de rata.

Otros datos que apoyan la existencia de receptores, proceden de la observación de Neupert y col (115), de que en los ensayos de transporte "in vitro", una gran proporción del precursor presente en el medio, se asocia a mitocondrias desenergizadas. Tras restaurar el potencial de membrana, sólo los precursores asociados, eran internalizados y procesados correctamente. Esto sugería, que el precursor se unía a sitios específicos de la membrana, a partir de los cuales era translocado, con preferencia al que todavía se encontraba soluble en el medio extramitocondrial.

Aunque parece evidente, que el transporte es mediado por algún sistema receptor que es capaz de distinguir las proteínas mitocondriales del resto de las proteínas celulares, no se sabe si existe un sólo tipo de receptor para todos los precursores mitocondriales, o, si por el contrario, existen diversos receptores para los distintos precursores.

Se han llevado a cabo experimentos de competencia, para la importación de distintos precursores por mitocondrias aisladas, que sugieren que algunos de ellos comparten la misma ruta de translocación a la mitocondria, aunque no siempre este hecho va asociado

a que posean características comunes. Así, se ha sugerido una ruta común para el transporte de la 3-cetoacil CoA tiolasa, que no se sintetiza como precursor de mayor tamaño, y otros enzimas sintetizados con péptido señal adicional (116). También se ha comprobado, que el apocitocromo c, parece tener una ruta de importación distinta a la del translocador de ADP/ATP y de la subunidad 9 de la ATPasa mitocondrial (117).

Riezman y col (118), aislaron vesículas de membrana externa de mitocondrias de levadura que unían, específicamente, precursores mitocondriales con gran afinidad. Comprobaron, que si sometían, tanto mitocondrias enteras, como las vesículas, a un tratamiento suave con tripsina, se bloqueaban la unión y la importación, lo cual parecía sugerir la existencia de algún componente proteico en la superficie mitocondrial, que podría actuar como receptor.

Zwikinski y col (119) comprobaron que un tratamiento suave con tripsina, de mitocondrias aisladas de N. crassa, inhibía la unión y el transporte de los precursores del translocador de ADP/ATP de la membrana interna, y de la porina de membrana externa.

También, el tratamiento suave de mitocondrias de corazón de rata con tripsina y quimotripsina, inhibía la unión y la importación del precursor de la OCT de hígado de rata (120).

Schatz y col (57) comprobaron, que el tratamiento suave con tripsina, de mitocondrias aisladas de S. cerevisiae, inhibía el importación "in vitro" de los precursores de la subunidad β de la ATPasa y del citocromo b_{L2} . En este último caso, aportaron datos convincentes de que la etapa afectada era precisamente la unión. En las mismas condiciones, sin embargo, no se afectaba la importación del precursor de la principal proteína de membrana externa.

Actualmente se ha comprobado, que la importación de la mayoría de los precursores mitocondriales, es inhibida tras un tratamiento suave de la mitocondria

con tripsina (121).

Translocación a la mitocondria

A) Requerimientos energéticos

Los primeros estudios encaminados a determinar los requerimientos energéticos del importe de los precursores citosólicos a la mitocondria, fueron realizados por Nelson y Schatz en 1979 (122), utilizando esferoplastos de levadura. Para ello, aprovecharon que el nivel de ATP de la matriz mitocondrial en levadura, puede ser disminuido específicamente, haciendo uso de inhibidores y mutaciones adecuadas.

Cuando se inhibían tanto la fosforilación oxidativa como el transporte de ATP desde el citosol, se inhibía al mismo tiempo el transporte de los precursores citosólicos de las tres subunidades mayores de la F_1 ATPasa, así como de dos subunidades del complejo citocromo bc_1 . Sin embargo, el transporte tenía lugar si sólo se inhibía la fosforilación oxidativa, o el translocador ADP/ATP. Estos precursores, se localizan en la matriz y la membrana interna, respectivamente. Por otra parte, el transporte del precursor de la citocromo c peroxidasa, no era inhibido en ninguna de estas condiciones. Este enzima, se localiza en el espacio intermembrana, donde el ATP citosólico tiene libre acceso.

Estos experimentos, demostraron, que el transporte de precursores citosólicos a la mitocondria requiere energía.

La fuente de esta energía, podía ser el gradiente electroquímico de la membrana interna, o el ATP intramitocondrial. Los autores consideraron, que a la vista de sus resultados, era el ATP la fuerza directora del transporte, ya que la disipación del potencial transmembrana no parecía afectarle, sin embargo, no pudieron determinar qué papel desempeñaba el ATP en este proceso.

Zimmerman y Neupert (56), estudiando el transporte "in vitro" del precursor del translocador ADP/ATP, en mitocondrias de N. crassa, comprobaron que se requerían orgánulos energizados para su transporte, pero no para su unión a la superficie mitocondrial, no obstante, no pudieron determinar cuál era la fuente de energía.

Posteriormente estos mismos autores (117), confirmaron los anteriores resultados para el transporte de la subunidad 9 de la ATPasa, pero no así para el apocitocromo c, que no parecía requerir una membrana interna energizada. Por contra, la sulfito oxidasa, que al igual que el apocitocromo c se localiza en el espacio intermembrana, si requería energía para su transporte (123).

Schatz y col (124), realizaron experimentos más refinados para determinar la forma de energía requerida, utilizando un sistema "in vitro", donde la única fuente de energía para el transporte, era el ATP añadido exógenamente. En estas condiciones, estudiaron el transporte de la subunidad β de la electroquímico establecido a través de la membrana interna.

También se comprobó, que se requería el potencial de membrana, y no el ATP, para que tuviera lugar el importe de la subunidad 9 de la ATPasa y del translocador de ADP/ATP (125).

Para determinar qué componente de la fuerza protón-motriz era requerido para el importe, si el potencial eléctrico o el gradiente de pH, se utilizó la valinomicina, que disminuye el potencial de membrana, al permitir el movimiento de iones potasio a través de la misma, sin alterar el gradiente de pH. En estas condiciones, se determinó que el importe de la OCT a mitocondrias aisladas de hígado de rata era inhibido, lo cual sugería, que la fuerza directora del proceso era más bien el potencial eléctrico (126).

Pfanner y Neupert (127), demostraron posteriormente, que el transporte del translocador de ADP/ATP de N. crassa, podía ser dirigido por un potencial de difusión de iones potasio, por lo cual

los autores concluyeron, que era el potencial de membrana en sí mismo y no la fuerza protón-motriz total, la fuente de energía requerida para el importe.

Se comprobó, que el importe de la principal proteína de membrana externa de mitocondrias de levadura, que tiene una masa molecular de 29 kilodaltons y que se sintetiza sin extensión N-terminal adicional, no requería energía para su inserción post-traducciona en mitocondrias aisladas (57). Esto apoyaba la existencia de diferentes rutas de importe, para los precursores destinados a los distintos compartimentos del orgánulo.

Schleyer y Neupert (128), estudiaron la translocación de los precursores de la subunidad β de la F_1 -ATPasa y del citocromo c_1 a mitocondrias aisladas de N. crassa, y comprobaron que la etapa que requería la existencia de un potencial transmembrana, era la translocación del extremo N-terminal del precursor. Una vez ha sido importada esta parte del polipéptido, el resto de la cadena puede transportarse en ausencia del potencial.

Está pues, perfectamente establecido, que los precursores que han de ser transportados a, o través de, la membrana interna, requieren energía. Parece que esta energía, la aporta el componente eléctrico del gradiente electroquímico establecido a través de la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, no se ha podido descartar que además de este potencial eléctrico, se requieran otros compuestos de elevada energía de hidrólisis.

Así, Pfanner y Neupert (129), han determinado, que el importe de la subunidad β de la F_1 -ATPasa de N. crassa a mitocondrias aisladas, requiere conjuntamente un potencial de membrana y la presencia de nucleósidos trifosfato (ATP y GTP). Los análogos no hidrolizables de estos nucleósidos trifosfato, no podían sustituirlos en su función, por tanto, se concluyó que era necesaria la hidrólisis de los enlaces fosfato de elevada energía.

Posteriormente han investigado el papel que desempeñan estos nucleósidos trifosfato, no sólo en la subunidad β de la F_1 -ATPasa, sino también, en el caso del translocador de ADP/ATP y de la subunidad 9 de la F_0 -ATPasa de N. crassa. También utilizaron una proteína de fusión, constituida por la secuencia señal de la subunidad 9 de la F_0 -ATPasa unida a la dihidrofolato reductasa de ratón (130).

Comprobaron, que los nucleótidos eran necesarios para que tuviera lugar la interacción inicial de los precursores con la mitocondria, y para la completa translocación desde la superficie mitocondrial. Sin embargo, los niveles de nucleótidos requeridos en cada etapa eran distintos, necesitándose mayor cantidad de los mismos para las últimas etapas que para las primeras.

El hecho de que precursores con idéntica secuencia señal, pero diferente porción madura, requirieran diferentes niveles de estos nucleótidos, y que la sensibilidad a proteasas aumentara en presencia de los mismos, (la resistencia a proteasas es mayor en una conformación plegada), hizo que los autores sugirieran, que la energía liberada en su hidrólisis podía estar implicada en modular el plegamiento de los precursores en el citosol, haciéndolos competentes para el importe (130).

B) Factores citosólicos implicados

Puesto que la translocación de las proteínas de secreción, a través del retículo endoplásmico estaba mediada por un factor citosólico, la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), se pensó, que la importación de los precursores citosólicos, podría requerir también algún factor que facilitara el proceso para que este resultara específico y eficiente.

Se determinó cuáles eran los requerimientos del transporte de precursores citosólicos a mitocondrias aisladas. Cuando se llevaron a cabo estos primeros estudios, los precursores se sintetizaban en un sistema de síntesis "in vitro" a partir del ARN total, ya que no se disponía de los ARNm específicos. La

aisladas. Cuando se llevaron a cabo estos primeros estudios, los precursores se sintetizaban en un sistema de síntesis "in vitro" a partir del ARN total, ya que no se disponía de los ARNm específicos. La síntesis se incubaba con mitocondrias aisladas, y posteriormente, se identificaban los precursores inmunoprecipitando el medio de incubación con los anticuerpos específicos (31).

Por este motivo, en las incubaciones, siempre estaban presentes, los componentes del medio de traducción utilizado en la síntesis. Dos grupos de investigadores describieron, que para que tuviera lugar la importación del precursor de la OCT de hígado de rata de un modo eficiente, se requería la presencia de los componentes del medio de traducción (120,131).

Miura y col (131) indicaron, que los factores requeridos eran, un componente del lisado de reticulocitos de conejo, y los iones potasio y magnesio. La caracterización parcial del factor del lisado indicó que era no dializable, y sensible a un tratamiento con tripsina, o a 100 °C 2 minutos. Esto parecía indicar que se trataba de una proteína de masa molecular elevada.

Shore y col (120), sin embargo, describieron que el factor o factores necesarios para estimular la importación estaba en el lisado de reticulocitos, y que eran retenidos por una columna de Sephadex G-25, que retiene moléculas bien por su pequeño tamaño (< 5,000 daltons), bien por interacciones inespecíficas con la matriz.

Ohta y Schatz (132), por su parte, determinaron que el transporte del precursor de la subunidad β de la F_1 -ATPasa a mitocondrias aisladas de levadura, requería un factor citosólico soluble, presente tanto en el lisado de reticulocitos de conejo, como en la fracción citosólica de levadura. Este factor era no dializable y sensible a tripsina, presentando una masa molecular aparente, de aproximadamente 40,000 daltons.

A pesar de que el factor mostraba características

de proteína, los autores consideraron que no se podía descartar la posibilidad de que el verdadero factor estimulador fuera una molécula pequeña que se encontraba unida a, (o quizá estabilizada por) proteínas, que por sí solas serían inactivas. Tampoco excluyeron la posibilidad, de que el factor actuara estabilizando el potencial de membrana, aunque lo consideraron poco probable, ya que la importación a la mitocondria requiere un potencial muy pequeño. Postularon la hipótesis, de que este factor citosólico, se uniría a los precursores y favorecería la correcta asociación de los mismos con la superficie mitocondrial (132).

Firgaira y col (133), indicaron, que la importación a la mitocondria de varios precursores citosólicos de enzimas de la matriz, entre los que se encontraba la OCT, requería un componente sensible a ribonucleasa. Los autores propusieron, que este ARN podía formar parte de un complejo ribonucleoproteico, que se asociaba al precursor en el citosol.

Sin embargo, Argan y Shore (134) comprobaron, que los factores requeridos para la importación de pOCT contenidos en el lisado de reticulocitos, se asociaban al precursor constituyendo un complejo de 5S. No obstante, la eficiencia de este complejo para importar el precursor a la mitocondria, no se veía afectado por el tratamiento con ribonucleasa .

Posteriormente se ha indicado, que el tratamiento con RNasa, del lisado de reticulocitos utilizado en el medio de transporte, producía la inhibición de la importación de proteínas a mitocondrias aisladas de levadura (135). En este caso, se comprobó, que este tratamiento no degradaba una estructura esencial para el transporte, sino que se debía a un efecto inespecífico producido por la degradación de los ribosomas presentes en el lisado de reticulocitos. Los productos de esta degradación podrían inhibir el importación produciendo un desacoplamiento de la mitocondria o asociándose a los propios precursores.

Recientemente Pfanner y Neupert (136), han descrito un componente citosólico, presente en el lisado de reticulocitos de conejo, que se requiere

También se ha descrito recientemente, que el importe de la subunidad β de la F_1 -ATPasa de N. crassa, requiere un componente localizado en el espacio (137) intermembrana, que parece estar asociado a la membrana. Este factor es sensible al calor, y eluye de una columna de Sephadex G-25, por lo que los autores suponen que es de naturaleza proteica. Hasta el momento se desconoce cual es su función.

C) Participación de la secuencia señal en la translocación

Roise y col (50), observaron que un péptido sintético que representaba la secuencia señal de la subunidad IV de la citocromo oxidasa de levadura, podía formar una hélice anfifílica en la interfase agua-membrana, con un lado altamente cargado y otro hidrofóbico, lo suficientemente activa en superficie como para perturbar fuertemente las bicapas fosfolipídicas. Este efecto se incrementaba por un potencial de membrana de la misma polaridad que el requerido para la importación del precursor de la auténtica subunidad IV a la mitocondria. Los autores sugirieron, que esta perturbación de la bicapa lipídica, incrementada por el potencial, podría formar parte del mecanismo de translocación de las pre-secuencias de los precursores a la mitocondria.

Por otra parte Epand y col (138) obtuvieron un péptido sintético correspondiente a los residuos 1-27 del precursor de la ornitina transcarbalimasa (pre-OCT), y comprobaron que los fosfolípidos aniónicos, inducían en él un marcado cambio conformacional. El péptido adoptaba una estructura con un alto contenido en α -hélice en presencia de fosfolípidos aniónicos como la cardiolipina. También presentaba una actividad lítica sobre las membranas, solubilizando los lípidos en forma de micelas discoidales, tal como sucede con los péptidos líticos melitina y δ -hemolisina, que también forman hélices anfifílicas en estas interfases (31).

Las propiedades poco usuales de las hélices anfifílicas, provienen de la desigual distribución de los residuos hidrofóbicos en torno a la hélice, y son

Las propiedades poco usuales de las hélices anfifílicas, provienen de la desigual distribución de los residuos hidrofóbicos en torno a la hélice, y son relativamente independientes de la estructura primaria del péptido.

Recientemente Horwich y col (139) han demostrado que para que la secuencia señal del precursor de la OCT sea funcional se requiere tanto la estructura helicoidal, como su carga positiva, lo que podría indicar la existencia de una interacción electrostática entre la secuencia y la mitocondria.

Hurt y Schatz (140) comprobaron que la dihidrofolato reductasa de ratón, un enzima citosólico, contenía una secuencia formadora de una hélice anfifílica cargada positivamente y sin embargo no era transportada a la mitocondria. Si esta secuencia se unía al extremo amino-terminal de una proteína "pasajera", era capaz de dirigirla a la mitocondria.

Dichos autores consideraron que las condiciones que debía cumplir una secuencia señal, para ser funcional, eran estar plegada en una estructura "competente" para la importación y estar expuesta en la superficie de la proteína. La secuencia señal de la dihidrofolato reductasa quedaría enmascarada en la proteína madura plegada, y no podría por tanto, interaccionar con la superficie mitocondrial. Esto podría explicar por qué la secuencia señal en las proteínas mitocondriales se localiza habitualmente en el extremo amino-terminal, ya que esto permitiría que dicha secuencia se plegase de un modo independiente, constituyendo un dominio competente para el transporte, sin afectar el plegamiento estable del resto del polipéptido.

La detección de una pre-secuencia mitocondrial oculta en una proteína citosólica indujo a pensar que las auténticas secuencias señal de las proteínas mitocondriales podrían haber evolucionado por transposición de fragmentos de ADN a los extremos 5' de secuencias codificadoras.

Para verificar esta idea Baker y Schatz (141) utilizaron fragmentos al azar del ADN de E. coli para llevar a cabo ensayos de complementación "in vivo". Un elevado porcentaje de estos fragmentos codificaban polipéptidos que restauraban la importación a la mitocondria de un precursor de la subunidad IV de la citocromo oxidasa que carecía de la mayoría de su presecuencia.

Al secuenciar estas señales derivadas de E. coli se comprobó que se asemejaban a las presecuencias mitocondriales en que contenían abundantes residuos básicos y carecían de residuos ácidos. Por tanto el genoma de E. coli codifica una gran reserva de polipéptidos que pueden dirigir proteínas a la mitocondria.

D) Rutas de transporte

Schleyer y Neupert (128) estudiando el importe de los precursores de la subunidad β de la F_1 -ATPasa y del citocromo c_1 describieron la existencia de intermediarios de la translocación, que se expandían en la membrana externa e interna simultáneamente y que sugerían que la translocación tenía lugar en una sola etapa, a través de sitios de contacto entre ambas membranas.

Hartl y col (121) propusieron que también el precursor de la proteína Fe/S del complejo III de la cadena respiratoria de N. crassa era transportado a través de sitios de contacto.

Recientemente se han caracterizado estos sitios de contacto implicados en la translocación, comprobándose que estos sitios definidos bioquímicamente se correspondían en algunos casos con las áreas donde ambas membranas se encuentran muy próximas y que se observan en microfografías electrónicas (137).

Al obtener mitoplastos, permanecen restos de la membrana externa unidos a la membrana interna, que corresponden a los sitios de contacto. En estas condiciones mantienen su capacidad para importar

precursores, habiéndose descartado que la membrana interna posea un sistema separado de importación.

Estos sitios de contacto están presentes en la mitocondria incluso en ausencia de los precursores y no parecen ser estabilizados por un potencial de membrana, ya que la mayoría persisten en ausencia de potencial.

Los autores concluyen que en las zonas donde los precursores son importados, las dos membranas mitocondriales se encuentran en íntimo contacto interaccionando de una forma estable y específica (137).

2.4) PROCESADO DE LOS PRECURSORES IMPORTADOS

La mayoría de los precursores mitocondriales sufren alguna modificación covalente, durante o, inmediatamente después de su translocación. La modificación más frecuente es la proteólisis.

Los precursores con extensión amino-terminal adicional, caso más frecuente dentro de los precursores citosólicos mitocondriales, sufren una o dos etapas separadas de rotura.

Para aquellas proteínas de matriz y membrana interna, que son sintetizadas como precursores de mayor tamaño, la rotura producida por una proteasa de matriz da lugar a productos electroforéticamente indistinguibles de sus correspondientes formas maduras. Esta rotura es aparentemente endoproteolítica.

El enzima se detectó por primera vez en un extracto hipotónico de levadura (142) que procesaba varios precursores a su forma madura, en ausencia de una fuente de energía como ATP. Su actividad máxima se alcanzaba a pH neutro, y era fuertemente inhibida por agentes quelantes como EDTA, GTP, y

1,10-ortofenantrolina. Sin embargo esta inhibición era reversible ya que la acción de los iones Zn^{+2} y Co^{+2} restauraban la actividad del enzima. Era, sin embargo insensible a inhibidores de serín-proteasas y agentes modificadores de sulfidrilos.

Dos grupos han purificado el enzima de levadura (143,144). Estas preparaciones, parcialmente purificadas, se utilizaron para determinar la especificidad de sustrato y algunas de sus características físicas.

Mediante filtración en gel mostraba un masa molecular aparente de 110 Kd y una clara especificidad de sustrato, actuando "in vitro" sobre varios precursores mitocondriales, y no sobre proteínas no mitocondriales. Además la acción del enzima era limitada, dando lugar únicamente a la forma madura. Los precursores desnaturalizados no son sus sustratos «in vitro», aunque son rápidamente degradados por serín-proteasas como la tripsina y la quimotripsina. Esto parece indicar que se requiere una conformación particular del precursor para que se produzca la rotura correcta. Mc Ada y col (144) indicaron que la actividad se correlacionaba con una subunidad de 50 Kd.

Conboy y col (145) describieron una proteasa presente en mitocondrias de hígado de rata, responsable del procesamiento de pOCT a su forma madura. Esta actividad proteásica se localizaba en la matriz, y requería 0.1 mM de Zn^{+2} para su máxima actividad. El enzima de rata, a diferencia del de levadura, se inhibía con elevadas concentraciones de leupeptina. Este enzima parcialmente purificado tenía un punto isoeléctrico de 5.5 y una masa molecular relativa de 109 Kd.

Algunos precursores mitocondriales son procesados hasta alcanzar su forma madura en dos etapas discretas. Así los citocromos b_2 y c_1 y la citocromo c peroxidasa de levadura siguen esta ruta (146). El primer procesado requiere el enzima de matriz, que da lugar a una forma intermedia entre la forma precursora y la madura. Estos intermediarios parecen estar

firmemente unidos a la membrana interna, asomando al espacio intermembrana. El segundo corte que convierte a la forma madura estos intermediarios parece producirse en la cara externa de la membrana interna.

En el caso del citocromo b_5 y la citocromo c peroxidasa, sus formas maduras se liberan como componentes solubles al espacio intermembrana. El citocromo c_1 , permanece unido a la membrana interna.

El grupo de Schatz (147), ha demostrado que algunas formas intermedias detectadas "in vitro" son verdaderos intermediarios cinéticos en la maduración de sus respectivos precursores. Así el marcado de esferoplastos o células de levadura con un pulso radiactivo, en presencia de un inhibidor que bloquea la importación «in vivo», permitió detectar tanto las formas intermedias como las maduras.

El citocromo c_1 requiere la unión del grupo hemo a la forma intermedia para que tenga lugar la segunda rotura, ya que en mutantes deficientes en el grupo hemo, se acumula la forma intermedia, que es convertida a la forma madura al restaurarse la biosíntesis del grupo hemo (148).

En el caso del precursor de la OCT se ha observado la aparición de una forma intermedia durante la importación y maduración de pOCT por mitocondrias de hígado de rata, no obstante no se observa en hepatocitos aislados (149). Mori y col (150) describieron una actividad proteásica, que podría ser responsable de este procesamiento, sin embargo, no se ha podido determinar si existe este intermediario o, si es en realidad un artefacto del sistema de transporte "in vitro", ya que muchos autores detectan esta forma intermedia sólo en ocasiones, incluso en ausencia de mitocondrias (151).

La proteasa de matriz, al igual que otros componentes de la maquinaria de transporte, muestra poca especificidad de especie, de manera que precursores mitocondriales de diversos orígenes pueden ser importados y procesados por mitocondrias heterólogas «in vitro» (31).

Además de la rotura proteolítica, se producen otras modificaciones que incluyen la unión covalente del grupo hemo o de nucleótidos de flavina, la metilación de cadenas laterales aminoaciladas y la acetilación del grupo N-terminal de la proteína madura (31).

2.5) ENSAMBLADO DE LOS PRECURSORES PROCESADOS EN UNIDADES FUNCIONALES

La etapa final del importe de los precursores citosólicos es su asociación en unidades funcionales en el interior de la mitocondria.

Este "ensamblado" puede considerarse que se produce a diversos niveles: inicialmente los monómeros pueden alcanzar su compartimento mitocondrial y asumir su correcta orientación; a continuación algunas proteínas tienen que formar homooligómeros para ser activas; y finalmente algunas proteínas tienen que asociarse con polipéptidos sintetizados en la mitocondria para constituir complejos enzimáticos.

Se plantea el problema de poder determinar experimentalmente que el producto final del importe "in vitro" se ha localizado en la mitocondria en su estado funcional. El fraccionamiento subcelular de la mitocondria ha permitido determinar la localización en el compartimento adecuado de algunos precursores (124).

Se ha confirmado que algunos polipéptidos importados "in vitro" se integran en la orientación adecuada, ya que muestran propiedades físicas comunes con sus correspondientes proteínas maduras. Así, en el caso de la porina de membrana externa de levadura (57), el polipéptido importado se parece a la proteína madura en su elevada resistencia a la proteólisis, incluso en presencia de detergentes.

También se ha comprobado que el precursor de la OCT importado se ensambla en trimeros, tal como sucede con el enzima nativo (152).

OBJETIVOS

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es contribuir a la caracterización de los factores que regulan el transporte de los precursores citosólicos de las proteínas mitocondriales, al interior de la mitocondria. Esta etapa, esencial en la biosíntesis de estos polipéptidos, puede ser un factor clave en la regulación del recambio de estas proteínas en la célula, constituyendo en la actualidad uno de los pasos menos conocidos de la biogénesis de las proteínas mitocondriales.

El estudio de este proceso se vé obstaculizado por las dificultades que plantea la obtención de los polipéptidos precursores en cantidad suficiente, y en un estado homogéneo y funcional.

Por esta razón, en el presente trabajo se han planteado dos etapas bien diferenciadas:

1.- La puesta a punto de un sistema de obtención de precursores específicos de proteínas mitocondriales en condiciones funcionales y, al mismo tiempo, en cantidad suficiente para poder llevar a cabo experimentos de transporte a mitocondrias aisladas.

2.- La caracterización de factores implicados en el proceso de transporte de los precursores citosólicos a la mitocondria.

Como modelo para este estudio, se ha utilizado el precursor de la ornitina transcarbamilasa de hígado de rata (pOCT). La razón de esta elección estriba en primer lugar en el hecho de haber tenido acceso a su ADNc completo, lo cual permitía poder obtener su ARNm específico, mediante transcripción "in vitro" y, consecuentemente, la síntesis del polipéptido precursor en cantidad suficiente para poder estudiar su transporte a mitocondrias aisladas.

Por otra parte este enzima resulta de gran interés ya que ha sido objeto de detallados estudios en este laboratorio (153).

La OTC de hígado de rata, al igual que la mayoría de las proteínas mitocondriales, está codificada por un gen nuclear, es sintetizada en el citosol como un

precursor de mayor tamaño, que contiene una extensión amino-terminal adicional, siendo posteriormente transportado a la mitocondria donde es procesado a su forma madura (154).

Este enzima se localiza en la matriz de las mitocondrias del hígado de los animales ureotélicos, donde cataliza la síntesis de citrulina a partir de ornitina y carbamilo-fosfato, constituyendo la segunda etapa del ciclo de la urea (155).

El transporte de su precursor citosólico ha sido objeto de diversos estudios, habiéndose caracterizado algunos aspectos de su transporte a la mitocondria, aunque todavía quedan por resolver los mecanismos moleculares que regulan esta etapa.

Consideramos que la elucidación de los factores que regulan su transporte a la mitocondria puede aportar información sobre el paso de polipéptidos a través de membranas, así como sobre posibles factores reguladores del recambio de las proteínas en la célula.

Por otra parte el estudio del transporte del precursor de la OTC a mitocondrias, puede ser de gran interés práctico dado que se han descrito procesos patológicos producidos por deficiencias de OTC, que se han relacionado con posibles alteraciones en su transporte a la mitocondria (156). Un conocimiento más profundo de este proceso podría contribuir a esclarecer las bases moleculares de estas "enfermedades enzimáticas", que más que deberse a deficiencias en la actividad del enzima se han calificado como "enfermedades de transporte".

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Animales

Se utilizarón ratas macho de la raza Wistar y conejos blancos de raza Nueva Zelanda.

Cepas bacterianas

Se usó una cepa de E. coli K12, la C600, (r-, m-, thi-1, thr-1, lac Y1).

Medios de cultivo y soluciones tampón.

TAMPON YM9

Por cada litro de agua bidestilada contiene:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11 g
KH_2PO_4	3 g
NH_4Cl	1 g
NaCl	5 g

se esteriliza en el autoclave a 120 °C durante 30 minutos. A continuación se añade, por litro :

solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 M	1 ml
solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 M	1 ml

estas soluciones han sido previamente esterilizadas en el autoclave.

Los medios de cultivo se ajustan a pH 7 con NaOH 1N y se esterilizan en el autoclave durante 30 minutos.

MEDIO LB

Por litro de agua bidestilada :

Bacto tryptone Difco 10 g
Extracto de levadura Difco 5 g
NaCl 10 g

MEDIO LBT

Medio LB suplementado con 40 mg de timina/litro.

MEDIO LAT

Medio LBT suplementado con 20 g de Agar Difco/litro.

MEDIO 5NBST

Por litro :

"Nutrient Broth" Difco 40 g
NaCl 1 g
Timina 40 mg

MEDIO PARA "STAB"

Por litro:

"Nutrient Broth" Difco 8 g
Bacto Agar Difco 7.6 g
Timina (2 mg/ml) 40 ml

MEDIOS CON ANTIBIOTICOS

Los antibióticos se añaden a los medios previamente esterilizados, a la concentración final adecuada en cada caso. La ampicilina se añade a una

concentración final de 40 µg/ml.

Productos y reactivos químicos

Los productos utilizados en la electroforesis en su mayor parte eran de BioRad; la agarosa, el fenol ultrapuro y la formamida fueron obtenidos de BRL; la sacarosa, la urea y la mayoría de las sales fueron de la casa Merck; el CsCl de Boehringer Mannheim; el Sephadex de Pharmacia Fine Chemicals; los reactivos del sistema SP6 de Amersham International; las columnas Elutip de Schleicher & Schuell; los Staphylococcus aureus fijados con formalina de Meloy Laboratories; el sistema BlUGENE de BRL; el m⁷G(5')ppp(5')G (CAP) de Pharmacia.

Productos radioactivos

(³⁵S)-L-metionina (>1,000 Ci/mmol), (¹⁴C)-formaldehído, y una mezcla de proteínas marcadas con (¹⁴C) por metilación reductiva, se obtuvieron de Amersham International.

Enzimas

La mayoría de las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Boehringer Mannheim, alternativamente de Biolabs o Amersham. La RNasa pancreática y la lisozima de Sigma; la ADN polimerasa I de E. coli (fragmento Klenow), la fosfatasa alcalina bacteriana y la T4 ADN ligasa de Boehringer Mannheim. La SP6 ARN polimerasa de Amersham. La DNasa I de E. coli, libre de ribonucleasa, de Sigma. La tripsina de páncreas bovino de Sigma. La nucleasa micrococcal de S. aureus de P.L. Biochemicals.

Películas fotográficas

Para fotografiar los geles de agarosa o de poliacrilamida se utilizaron las películas Polaroid tipo 665/positivo-negativo. Para las fluorografías se usaron películas Kodak X-Omat S.

METODOS

Condiciones generales del cultivo de bacterias

CULTIVO DE NOCHE : permite obtener un cultivo en fase estacionaria. Se inoculan 10 ml de medio, contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml, con 0.1 ml de un cultivo estacionario a 10^7 bacterias/ml aproximadamente, o con una colonia aislada sobre una placa. Se incuba en la estufa a 37 °C durante 16 a 20 horas.

CULTIVO DE DIA: se obtiene un cultivo en fase exponencial. Se inoculan 10 o 20 ml de medio con un pequeño volumen (0.1 - 1 ml) de un cultivo de noche. Conviene que los cultivos de E. coli crezcan con buena aireación para que las condiciones de crecimiento sean reproducibles y el estado fisiológico de las bacterias sea óptimo en la fase exponencial. Para ello los cultivos se llevan a cabo en tubos llamados de "burbujeo" porque en ellos se hace burbujear aire estéril y húmedo, o bien en un Erlenmeyer de 250 ml en un baño con agitación.

Medida del crecimiento bacteriano

La tasa de crecimiento de un cultivo bacteriano se midió determinando su densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 660 nm, en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 70. Si el cultivo se ha realizado en tubos de burbujeo se mide directamente introduciendo el tubo en el espectrofotómetro. Si se ha hecho el cultivo en un Erlenmeyer se toman alícuotas a diferentes tiempos y se transfieren a un tubo de burbujeo para realizar la medida.

Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

se conservan de dos maneras:

1. Siembra por "picadura" en tubos que contienen 2 ml de medio para "stab". Los tubos se cierran herméticamente recubriendo el tapón con parafina fundida. Así se conservan durante años, a temperatura ambiente, protegiéndolos de la luz.

2. Conservación en glicerina : a un "cultivo de noche" crecido en 2 ml de medio 5NBST, se le añaden 0.5 ml de una solución de glicerina estéril al 87 % y se guarda el cultivo a -20 °C. En estas condiciones se conservan los cultivos durante años.

Transformación de bacterias con ADN plasmídico.

El método utilizado se basa en los protocolos descritos por Mandel y Higa (157) y Cohen y col (158), con ligeras modificaciones. Se prepara un cultivo de día de la cepa receptora diluyendo 1/40 un cultivo de noche en 8 ml de medio LBT fresco y se incuba a 37 °C con burbujeo. Cuando el cultivo alcanza una D.O. (660) de 0.6 se enfría rápidamente pasándolo a un baño de hielo fundente a 0°C donde se mantiene durante 5 minutos, sin dejar de burbujear.

A continuación se centrifuga la suspensión celular a 4,000 rpm durante 10 minutos y a 4 °C en una centrífuga de mesa, desechándose el sobrenadante. El sedimento celular se resuspende en 7.5 ml de 0.1 M CaCl₂ frío y estéril, manteniéndolo a 0 °C durante 30 minutos. Finalmente se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y el sedimento se re suspende en 1 ml de 0.1 M CaCl₂ frío, dejando el tubo en el baño a 0 °C durante una hora, como mínimo. En estas condiciones las células son competentes para que tenga lugar la transformación.

Se toma un tubo estéril de 10 ml y se añaden 100 µl de tampón 0.1 M Tris-HCl pH 7.1, 100 µl de la suspensión de células tratadas con calcio y aproximadamente 0.5 a 1 µg del ADN plasmídico, contenido en un volumen no superior a 10 µl. Se incuba a 0 °C durante 15-30 minutos. Transcurrido

este tiempo se transfiere rápidamente a un baño de agua a 42 °C y se mantiene en él durante 3-5 minutos. A continuación se añade 1 ml de medio LBT y se incuba con aireación a 37 °C durante 1 hora.

Las células transformadas se seleccionan extendiendo 0.1 ml de este último cultivo en placas conteniendo el medio selectivo adecuado que se incuban a 37 °C durante 24 horas aproximadamente. Como control de la transformación se extiende la misma cantidad de células, no incubadas con el ADN plasmídico, en placas de medio selectivo.

Obtención de ADN plasmídico

METODO DE HELINSKI.

Para obtener grandes cantidades de ADN plasmídico altamente purificado en su forma circular covalentemente cerrada, se utilizó el método de Clewell y Helinski (159), con ligeras modificaciones. El protocolo que se describe a continuación está referido a la obtención de ADN plasmídico partiendo de 1 litro de cultivo bacteriano.

A) Crecimiento del cultivo y amplificación del plásmido.

Se lleva a cabo un cultivo de noche de la cepa portadora del plásmido en 50 ml de medio LBT que contiene el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido. A la mañana siguiente se diluye 1/20 este cultivo de noche en medio LBT fresco que contiene el antibiótico. El volumen se distribuye en dos Erlenmeyers de 1 litro, o en cuatro de 500 ml, y se incuban a 37 °C con agitación. Cuando la D.O. (660) el cultivo es igual a 0.8, se añade cloranfenicol a una concentración final de 200 µg/ml para lograr la amplificación del plásmido. Se deja incubando a 37 °C durante la noche con agitación. A continuación se distribuye el volumen total en 6 frascos de centrífuga de 200 ml y se centrifuga a

7,000 rpm durante 20 minutos y a 4 °C, en el rotor GSA de una centrifuga Sorvall RC-5B. El sedimento celular de cada frasco se resuspende en 10 ml de TES, pH 8 frío (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM Na Cl). Se reúnen todas las resuspensiones en un sólo frasco y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones.

B) Lisis de las células bacterianas.

El sedimento de esta última centrifugación se resuspende en 12 ml de una solución de sacarosa al 25 % (p/p) en 50 mM Tris-HCl pH 8, y se añaden 2.4 ml de una solución recién preparada de lisozima (10 mg/ml) en 25 mM Tris-HCl pH 8. Se deja en hielo durante 15-30 minutos. A continuación se añaden 4.8 ml de 0.25 M EDTA pH 8 y se deja en hielo durante otros 15-30 minutos. Finalmente se añaden 19.2 ml de mezcla lítica x 2 (50 mM Tris-HCl pH 8 62.5 mM EDTA , 2 % Tritón X-100) y se deja de nuevo en hielo durante 15-30 minutos. El lisado así obtenido se centrifuga en tubos de polipropileno a 17000 rpm en el rotor SS-34 de la centrifuga Sorvall, durante 40 minutos y a 4 °C, sin poner el freno. Se recoge cuidadosamente el sobrenadante, evitando arrastrar el sedimento gelatinoso, en una probeta previamente pesada. El sobrenadante debe tener una coloración amarillenta. Si presenta color claro y el sedimento es muy compacto y opaco, es indicativo de que las células no han sido lisadas correctamente. En este caso se debe resuspender de nuevo el sedimento, calentarlo a 65 °C durante 30 minutos y repetir de nuevo la centrifugación. Se añaden, a continuación, 0.8 ml de tampón TES pH 8, por cada 3 ml de sobrenadante recuperado. Se obtiene así un lisado que contiene el ADN plasmídico no purificado, pero que puede utilizarse para estimar el tamaño del plásmido.

C) Purificación mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad de CsCl-bromuro de etidio

Por cada 3 ml del lisado claro, obtenido en la fase anterior, se añaden 3.65 g. de CsCl y se agita suavemente hasta que se disuelva por completo. La densidad de esta solución debe ser, aproximadamente, 1.6 g/ml. A continuación se añaden, en oscuridad, 0.5 ml de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml en

TES pH 7.5) por cada 10 ml de mezcla. La concentración final de bromuro de etidio es de 500 µg/ml. La mezcla se distribuye en tubos de polialómero de 13.5 ml de capacidad, que se cierran herméticamente mediante un sellado por calor. Se centrifuga durante 40 horas a 40000 rpm y 15 °C, sin freno, en el rotor 50 Ti Beckman. Una vez finalizada la centrifugación el ADN se visualiza utilizando luz ultravioleta de longitud de onda larga (lámpara UVGL-58 Mineralight). Si la separación ha sido buena, se observan dos bandas: una inferior, que contiene el ADN plasmídico en su forma circular cerrada y otra superior formada por ADN cromosómico lineal y ADN plasmídico circular relajado. Para extraer la banda inferior, se pincha el tubo con una jeringuilla provista de una aguja hipodérmica de 22G y se recoge el volumen recuperado (aproximadamente 1 ml) en un tubo graduado. El bromuro de etidio se elimina mediante sucesivas extracciones con volúmenes iguales de n-butanol a 0-4 °C, saturado con agua, quedando el ADN en la fase inferior acuosa y descartándose la fase orgánica superior. Este proceso se repite hasta que la fase acuosa queda incolora y se lleva a cabo en la oscuridad. A continuación la solución de ADN se dializa contra 1 litro de tampón 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, estéril, a 4 °C y con agitación, durante 24 horas, realizando al menos tres cambios de tampón.

Tras la diálisis el ADN se transfiere a un tubo de polipropileno estéril y se guarda a 4 °C.

METODO DE LISIS ALCALINA

Cuando se aisló el ADN plasmídico de un gran número de muestras, para analizar su tamaño o para utilizarlo en un proceso que no requiere una excesiva purificación se utilizó el método "rápido" descrito por Silhavy y col (160), que es una variante del método de Birnboim y Doly (161). El ADN se extrae posteriormente con fenol/cloroformo, tal como describen Silhavy y col (160).

Electroforesis en gel de agarosa y electroelución de fragmentos de ADN

La preparación de los geles de agarosa se llevó a cabo tal como describen Maniatis y col (162). Los geles más utilizados fueron del 0.8 %, y se corrieron a 7 mA, 14-16 horas. La electroelución de fragmentos de ADN se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Maniatis u col (162).

Tratamiento de fragmentos de ADN con la ADN polimerasa I de E. coli (Fragmento Klenow)

Cuando es necesario modificar los extremos 5' protuberantes de un fragmento para transformarlos en romos, se utiliza el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I que es capaz de incorporar los nucleótidos que faltan en el extremo 3' hasta igualar las cadenas.

El protocolo seguido es el descrito por Maniatis y col (162). En un tubo Eppendorf estéril se mezclan el fragmento de DNA que se quiere modificar, suspendido en un volumen de 20 μ l de agua, con 2.5 μ l de tampón de «nick translation» x 10 (0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 0.1 M MgSO₄, 1mM DTT, 500 μ g/ml de BSA), 2.3 μ l de una solución que contiene los cuatro dNTPs a una concentración 1.75 mM, 5 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli y agua destilada estéril hasta completar un volumen de 25 μ l.

Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se inactiva el enzima calentando a 70 °C, durante 5 minutos.

Finalmente el DNA se recupera extrayendo con fenol/cloroformo y precipitándolo con etanol para resuspenderlo en el tampón adecuado.

Transcripción "in vitro".

El sistema de transcripción "in vitro" utilizado en este trabajo es el denominado SP6. Esta denominación se debe a que se basa en la síntesis de ARN dirigida por la ARN polimerasa del bacteriofago SP6, que se caracteriza por mostrar una elevada especificidad por el promotor SP6, de tal manera que inicia la transcripción exclusivamente a partir del mismo (163).

Este hecho se ha aprovechado para construir vectores de clonación que contienen el promotor SP6 seguido de una secuencia compuesta por sitios únicos de reconocimiento de endonucleasas de restricción (secuencia "polylinker") (164).

Utilizando estos vectores se puede clonar prácticamente cualquier tipo de fragmento de restricción en la orientación deseada respecto al promotor

De esta forma, en presencia de la ARN polimerasa del fago SP6, y en las condiciones óptimas para que tenga lugar la transcripción, se sintetiza ARN a partir del ADN situado después del promotor SP6. (Figura 4).

Vectores de clonación

Los vectores utilizados en este sistema de transcripción contienen el promotor SP6 y la secuencia "polylinker" que han sido clonados en el plásmido pBR322, de tal manera que se mantiene el gen de resistencia a la ampicilina, mediante el cual pueden ser seleccionados en un medio que contiene el antibiótico.

Los vectores se denominan pSP64 y pSP65 y se diferencian solamente en la orientación de la secuencia "polylinker", lo cual permite utilizar uno u otro en la clonación del fragmento, dependiendo de los enzimas de restricción utilizados (164). En la figura 5, se muestra un esquema de estos plásmidos.

Puesto que no se han encontrado secuencias de terminación potentes para esta ARN polimerasa, antes de iniciarse la transcripción es necesario linealizar el vector, utilizando un enzima de restricción que digiera el vector inmediatamente después del inserto del ADNc.

Clonación de fragmentos de ADN en el vector

pSP64

Puesto que el plásmido pSP64 contiene una

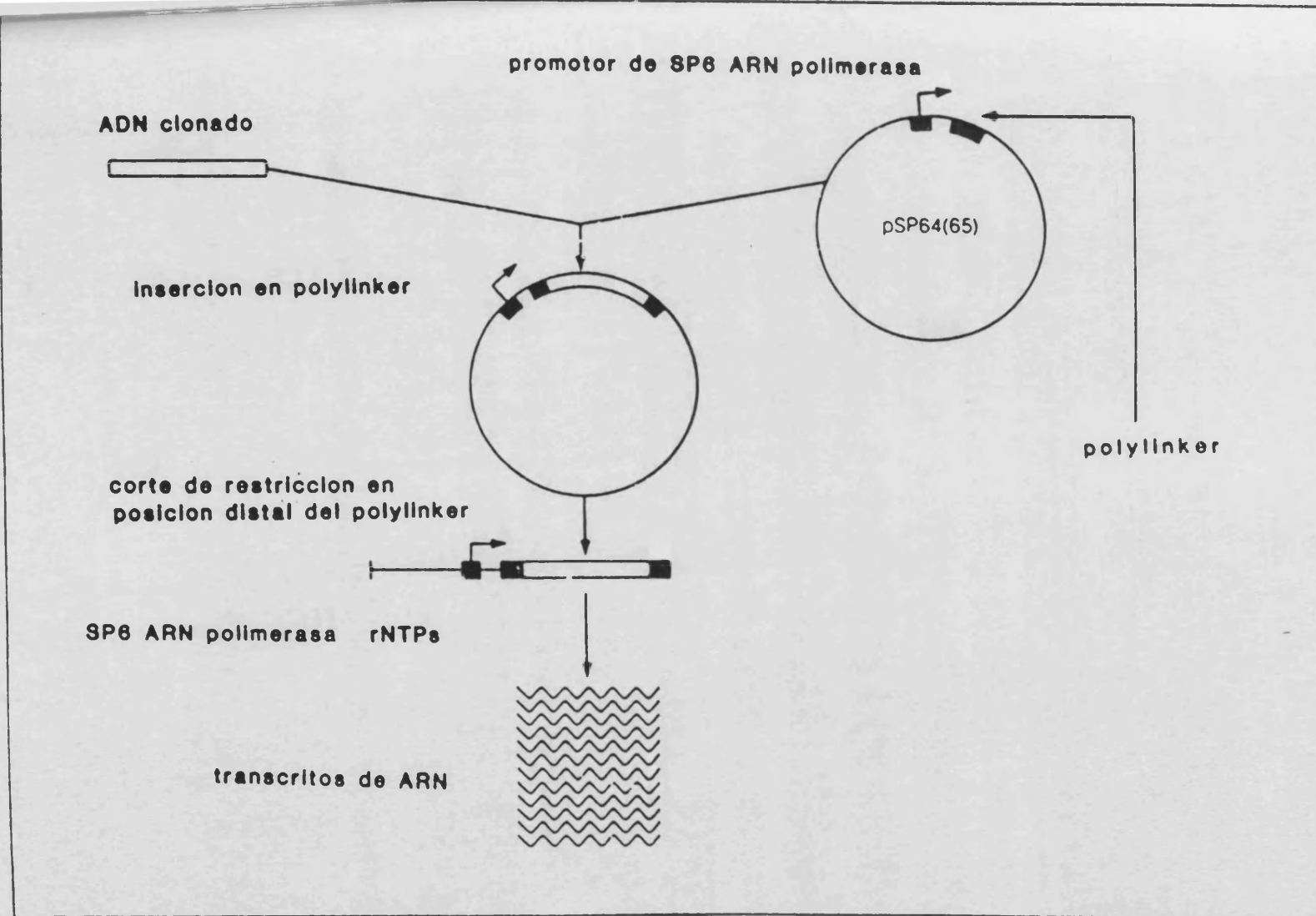


FIGURA 4: Esquema del sistema de transcripción SP6

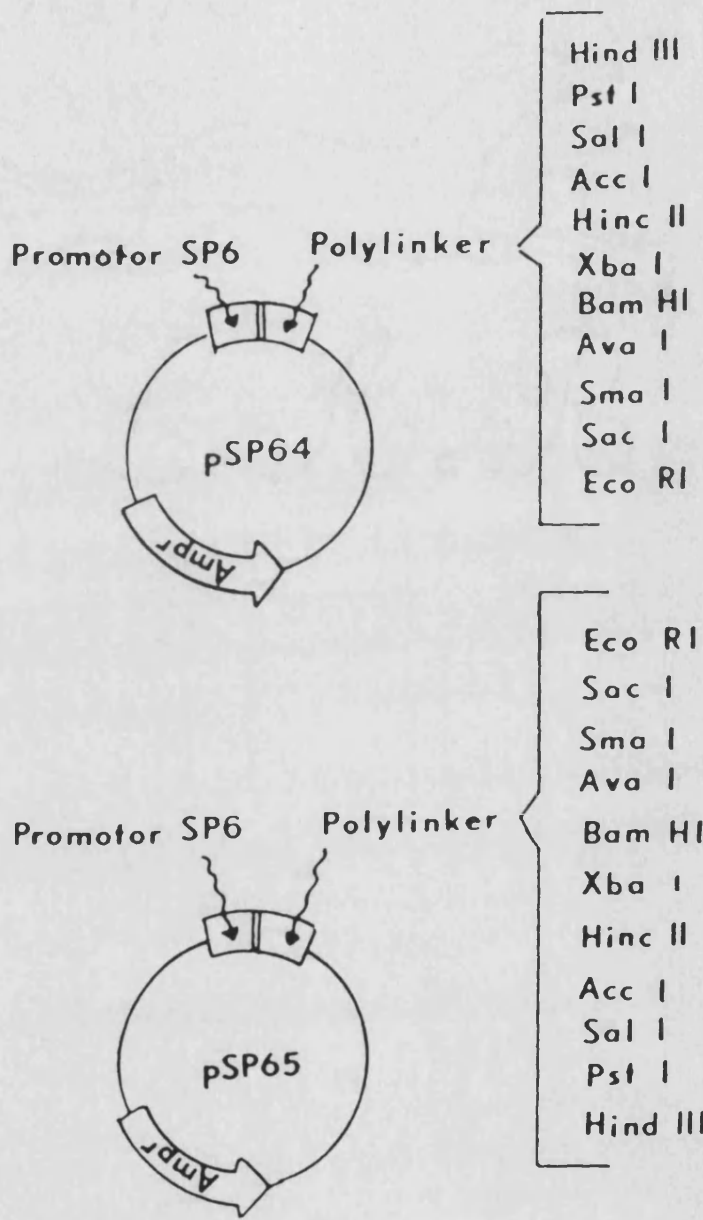


FIGURA 5

Esquema de los vectores del sistema de transcripción SP6.

secuencia "polylinker" constituida por sitios únicos de restricción, la clonación se lleva a cabo de tal manera que el fragmento que se va a clonar contenga extremos compatibles con alguno de estos sitios.

Para ello se obtiene el fragmento de ADN mediante digestión del plásmido donde se encuentra contenido con las endonucleasas de restricción adecuadas. A continuación se lleva a cabo una electroforesis preparativa en gel de agarosa y posterior electroelución del fragmento deseado.

Si el fragmento obtenido contiene extremos protuberantes y se requiere que sean romos para favorecer la inserción en algún sitio del polylinker, se trata con la ADN polimerasa I de E. coli (fragmento Klenow), extrayendo posteriormente con fenol y precipitando con etanol.

El plásmido pSP64 se digiere con los enzimas adecuados para lograr extremos compatibles con los del fragmento. Una vez verificado que la digestión es completa se extrae con fenol y se precipita con etanol.

Una vez se han obtenido el fragmento y el ADN vector con los extremos compatibles se procede a unirlos en presencia de T4 ADN ligasa.

Para evitar que el vector se recircularice en el medio de ligación, sin haber incluido el fragmento, se eliminan los grupos fosfato 5' terminales del ADN vector, mediante tratamiento con la fosfatasa alcalina (BAP), ya que la ligasa no une extremos defosforilados. Para ello se incuban 25 μ l de este ADN en tampón TE con 2 μ l de BAP (20 u/ μ l) a 65 $^{\circ}$ C durante 60 minutos.

Se añaden 1.5 μ l de 0.1 M EDTA, para alcanzar una concentración final de 5 mM y se calienta a 50 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. Se extrae con fenol/cloroformo y se precipita con etanol.

La mezcla de ligación contiene el fragmento y el vector (ya defosforilado) en un volumen de 17 μ l, 2 μ l de tampón de ligación x 10 (0.5 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 10 mM espermidina, 10 mM ATP, 1mg/ml BSA), y 1 μ l de T4 ADN ligasa. Se incuba durante la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se toma la mitad del volumen de la ligación (el resto se guarda a 4 °C) y se utiliza para transformar la cepa de E.coli C600, seleccionando las células transformadas sobre placas de medio LAT que contienen ampicilina a una concentración final de 40 μ g/ml. Se obtiene el ADN plasmídico de las colonias crecidas en el medio selectivo, mediante extracción alcalina, y se determina su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los plásmidos que presentan el tamaño adecuado se caracterizan mediante análisis de restricción para determinar la orientación en que se ha insertado el fragmento. Una vez seleccionados los plásmidos recombinantes se guardan en cultivos de reserva, tanto en glicerinado como en "stab".

Protocolo utilizado para la transcripción "in vitro"

Si se transcribe un ADN eucariótico se tiene en cuenta que la mayoría de los ARNm de las células eucarióticas presentan una modificación característica en su extremo 5'terminal, denominada "cap", cuya estructura general es 7mG(5')ppp(5')N (161). N es el nucleótido inicial del ARNm y puede ser A o G, y puede estar modificado mediante una O-metilación en la posición 2'de su mitad ribosa.

Se ha demostrado que los ARNm que presentan esta modificación son traducidos con mucha mayor eficiencia, respecto a los que carecen de ella, en los sistemas de síntesis "in vitro".(165,166)

Por ello en estos casos se adiciona al medio de transcripción un dinucleótido análogo del "cap", 7mG(5')ppp(5')G, en exceso con respecto al GTP, que es el nucleótido con el que se inicia la transcripción en el sistema SP6 (167). (Figura 6)

Es esencial evitar la contaminación de RNasa durante el proceso, por eso se deben llevar guantes y utilizar todo el material previamente esterilizado.

La reacción se lleva a cabo en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml al que se añaden los siguientes componentes, a temperatura ambiente (para evitar que precipite el ADN en presencia de la espermidina):

Tampón de transcripción x 5 *	10 µl
0.5 M DTT	1 µl
20 mM ATP	1.33 µl
20 mM UTP	1.33 µl
20 mM CTP	1.33 µl
2.5 mM GTP (1/8)	1 µl
16.7 mM 7mG(5')ppp(5')	1.5 µl
1 mg/ml ADN "molde" lineal	1 a 5 µl
20 u/µl HPRI **	2.5 µl
10 u/µl SP6 ARN polimerasa	1 µl
H ₂ O libre de RNasa	hasta 50 µl

* Tampón de transcripción (5 x): (40 mM Tris-HCl pH 7.6, 6 mM MgCl₂, 2 mM espermidina, 10 mM ditiotreitol, 100 µg/ml BSA)

** HPRI (inhibidor de la ribonucleasa extraído de placenta humana).

Se agita suavemente el tubo y se incuba a 37 °C durante 1-5 horas normalmente, aunque el tiempo de incubación puede variar dependiendo del ADN «molde», pudiendo ser necesario, en algunos casos, dejar la incubación durante toda la noche para lograr un buen rendimiento.

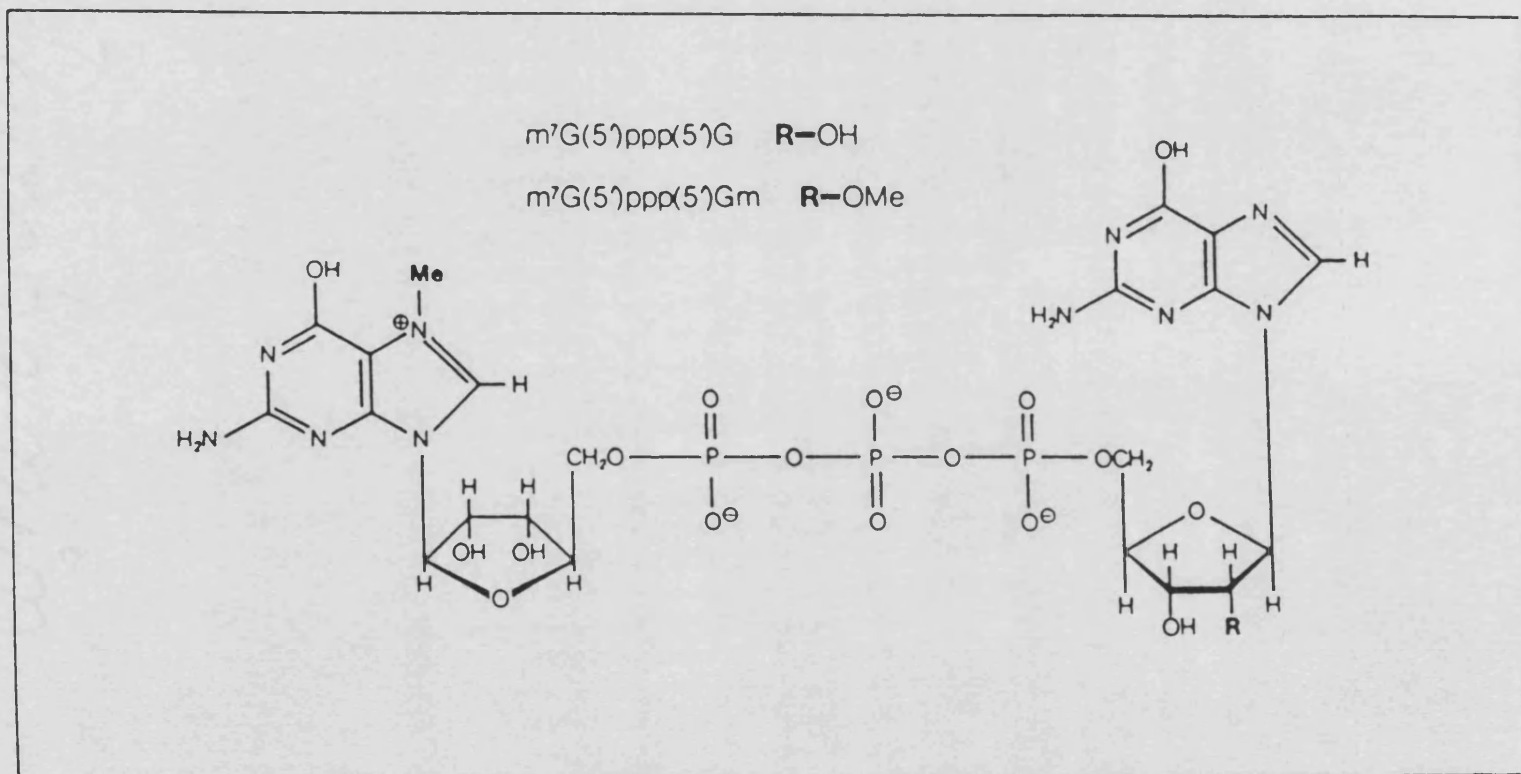


FIGURA 6

Estructura de los análogos del "CAP" utilizados en el sistema SP6.

(1mg/ml) libre de RNasa, y como prevención se añade también inhibidor de la RNasa a una concentración final de 1 u/ μ l (pues las preparaciones de DNasa I pueden llevar RNasa contaminante, aunque se indique que están libres de la misma). Se incubó durante 10 minutos a 37 °C y a continuación se extrae con fenol/cloroformo, por el procedimiento habitual.

Se precipita con etanol mediante la adición de 0.4 volúmenes de acetato amónico y 2.5 volúmenes de etanol al 95 % (-20 °C). Se deja a -80 °C durante la noche, y después se centrifuga 15 minutos en una Eppendorf a 4 °C. Se lava el sedimento dos veces con etanol 70 % (-20 °C) centrifugando 2 minutos en la Eppendorf, a 4 °C. El precipitado se seca a vacío para eliminar los restos de etanol y se resuspende en 20-30 μ l de agua estéril, guardándose a -80 °C hasta su uso.

El curso de la reacción se siguió incorporando a la mezcla de reacción 10 μ Ci de (³²P)-UTP (>400 Ci/mmol). A diferentes tiempos se toman pequeñas alícuotas y se estima la radiactividad asociada a productos precipitables con ácido tricloroacético en frío.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-urea

Se utilizó este método para analizar el tamaño de los transcritos obtenidos. La preparación de los geles se lleva a cabo esencialmente como describen Maniatis y col (168). Se han utilizado en este trabajo geles del 3.5 % de poliacrilamida y 5 M urea. Las condiciones eléctricas fueron: voltaje constante a 200 V (10 V/cm), durante 5 horas. Las muestras se preparan adicionando al ARN un tampón constituido por 80 % formamida desionizada, 1 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.1 % azul de bromofenol.

Los geles se tiñen con bromuro de etidio, tal como se describe para los geles de agarosa.

Hibridación de ácidos nucleicos

Para detectar la presencia de un ARN específico se utilizó la técnica denominada de hibridación "dot blot" siguiendo el protocolo descrito por Garger y col (169), con ligeras modificaciones. Esta técnica permite detectar secuencias específicas en muestras de ARN sin necesidad de llevar a cabo previamente una etapa de separación de los mismos.

Las muestras de ARN, se desnaturalizan en un tampón constituido por: 7.5 % formaldehído, 6 x SSC (1 x SSC = 0.15 M NaCl 0.015 citrato sódico), calentando 15 minutos a 60 °C. Se hacen diluciones sucesivas con 6 x SSC.

El filtro de nitrocelulosa se prepara, sumergiéndolo en agua estéril, y luego en 20 x SSC. Se seca bajo lámpara y sobre él se aplican 5 µl de cada muestra. El filtro se seca y se incuba a 80 °C dos horas.

Se somete el filtro a una prehibridación para minimizar la adsorción inespecífica, incubando el filtro en una solución compuesta por 50 % ornamida desionizada, 5 x SSC, 25 mM fosfato sódico pH 6.5, 0.1 % ficoll, 0.1 % polivinil pirrolidona, y 0.5 mg/ml de ADN, de esperma de salmón, fragmentado y desnaturalizado (100 µl/cm² de filtro). La incubación se lleva a cabo a 42 °C, durante una hora, en una bolsa sellada por calor.

Posteriormente, se lleva a cabo la hibridación, en una solución igual a la anterior, a la que se adiciona la sonda de ADN. Se incuba a 42 °C durante la noche.

Se ha utilizado como sonda un fragmento del ADNc de la secuencia que se desea detectar marcado con un nucleótido biotinilado (dUTP) mediante "nick translation" (170).

Finalizada la hibridación, se detectan los

híbridos utilizando el sistema Bluegene de BRL.

Síntesis de proteínas en un sistema libre de células

Entre los sistemas libres de células capaces de traducir eficientemente ARNs mensajeros exógenos los más utilizados son el lisado de reticulocitos de conejo y el extracto de germen de trigo.

Este último sistema resulta de fácil preparación, y es muy económico, pero plantea algunos problemas de terminación prematura en la síntesis de algunas proteínas, siendo los ARN de mayor tamaño los que resultan más afectados por este problema (171).

El sistema de lisado de reticulocitos es, sin duda, el más utilizado debido a su fácil preparación y a que muestra la mayor actividad de todos los sistemas libres de células obtenidos a partir de extractos de células eucarióticas.

Obtención de un lisado de reticulocitos.

Se utilizan conejos jóvenes de la raza "Nueva Zelanda", de un peso comprendido entre 1.5 - 2.5 Kg.

Cada animal es inyectado subcutáneamente durante cinco días consecutivos, con fenilhidracina al 2.5% en solución salina, neutralizada a pH 7 con hidróxido sódico. El volumen inyectado corresponde a una dosis diaria de 0.35 ml/ Kg de peso. Este tratamiento destruye los glóbulos rojos provocando una salida masiva de reticulocitos al torrente sanguíneo, bloqueándose así su maduración.

Transcurridos tres días después de la última inyección, los conejos son anestesiados con éter y se les extrae la sangre por punción cardíaca, utilizando jeringas heparinizadas. Previamente a la extracción se inyectan 5,000 unidades de heparina al flujo sanguíneo por la misma vía.

Una vez obtenida la sangre es muy importante trabajar con rapidez y en frío para evitar la inactivación de los reticulocitos.

La sangre se centrifuga durante 10 minutos, a 4 °C a 6,000 rpm en una centrifuga Sorvall RC-5B utilizando el rotor SS-34. Las células sedimentadas se resuspenden en una solución isosmolar compuesta por: 135 mM NaCl, 7.5 mM MgCl₂ y 5 mM KCl, mantenida en frío, en una relación de 5 a 10 volúmenes por volumen de sedimento celular. En esta etapa hay que intentar no descartar los leucocitos que forman una capa blanquecina en la parte superior del sedimento, porque están mezclados con jóvenes reticulocitos.

Las células se sedimentan de nuevo en las mismas condiciones, repitiendo hasta tres veces esta etapa de lavado. La última centrifugación, sin embargo, se lleva a cabo a 7,000 rpm durante 15 min para coseguir un sedimento celular compacto. Se estima entonces el volumen del sedimento y se añade un volumen igual de agua destilada estéril a 0-4 °C. Los tubos se agitan suavemente durante 10 seg para lisar las células.

El lisado se centrifuga a 15,000 rpm durante 15 minutos, a 4 °C en el rotor SS-34, para eliminar restos celulares y la fracción membranosa. Una vez obtenido el lisado se trabaja en condiciones estériles. Los sobrenadantes se decantan cuidadosamente en un recipiente estéril mantenido en frío y se hacen alícuotas que se almacenan a -80 °C hasta su uso.

Preparación de lisado de reticulocitos dependiente de ARN mensajero.

Cuando los sistemas libres de células se utilizan para sintetizar proteínas codificadas por ARNs mensajeros exógenos, se plantea el problema de que son traducidos en competencia con los ARNs mensajeros endógenos del reticulocito.

Pelham y Jackson (172) demostraron que se podía eliminar selectivamente el ARN mensajero endógeno del

reticulocito, sin afectar la actividad del sistema de traducción, utilizando la nucleasa micrococcal que muestra un requerimiento absoluto de iones Ca^{+2} para su actividad.

El procedimiento utilizado consiste en incubar el lisado con la nucleasa micrococcal en presencia de Ca^{+2} , logrando así eliminar el ARNm endógeno del reticulocito que está constituido fundamentalmente por ARNm de globina. Una vez finalizada esta incubación los iones Ca^{+2} son secuestrados adicionando el agente quelante EGTA, quedando así inactivada la nucleasa.

El lisado, tras este tratamiento con nucleasa, muestra una actividad de traducción completamente dependiente de los ARNm añadidos.

El tratamiento con nucleasa conviene llevarlo a cabo a pequeña escala en tubos de plástico desechables.

Por cada mililitro de lisado se añaden los siguientes reactivos:

-Hemina a una concentración final de 35 μM , a partir de una solución stock (1 mM en 90% etilenglicol, 20 mM Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl). La función de la hemina es inactivar un inhibidor de los factores de iniciación de la síntesis de proteínas.

- CaCl^{+2} 1mM, a partir de una solución 0.1 M.

-nucleasa micrococcal, 90 unidades, a partir de una solución stock de 9,000 u/ml.

La mezcla se incuba a 20 °C durante 15 min. Al terminar la incubación la digestión se detiene añadiendo EGTA a una concentración final de 2 mM, a partir de una solución 0.1 M, neutralizada con KOH. El lisado tratado se almacena a -80 °C en pequeñas alícuotas.

Protocolo de la síntesis "in vitro" de proteínas.

Se lleva a cabo esencialmente como describen Mori

y col (173), en presencia del aminoácido radioactivo ^{35}S -metionina.

El sistema se optimizó utilizando ARN total aislado de hígado de rata mediante una modificación del método de Cox (174), seleccionando los ARN poliadenilados mediante cromatografía de afinidad utilizando celulosa-oligo(dT) (175).

Una reacción tipo tiene lugar en un volumen final de 14,25 μl constando de 5 μl de lisado de reticulocitos tratados con nucleasa, 3,25 μl de una solución de traducción compuesta por (se indican las concentraciones finales en el medio de traducción): 76 mM KCl, 0.6 mM acetato magnésico, 0.6 mM espermidina, 2.2 mM ditioneol, 15 mM creatinfosfato, 1.5 mg/ml creatin fosfoquinasa, 27 μM de todos los L-aminoácidos menos metionina, 0.7 mM ATP, 0.3 mM GTP, 5 mM tampón Hepes pH 7.4, 26 μCi de ^{35}S -metionina ($>1,000$ Ci/mmol) y el ARNm en un volumen no superior a 4 μl .

El ARN mensajero se adiciona a la mezcla de síntesis a la concentración final que se ha determinado previamente como óptima para cada especie de ARN. La incubación se lleva a cabo a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos. Una vez finalizada se detiene la reacción adicionando al medio cicloheximida a una concentración final de 12 $\mu\text{g/ml}$.

/* Para estimar la incorporación del aminoácido radiactivo en los polipéptidos sintetizados, se toman alícuotas de 2-5 μl de la mezcla de síntesis y se añaden a 1.5 ml de solución de decolorar, compuesta por 0.33 M NaOH, 0.33 g/l L-metionina y 0.16 M H_2O_2 (30 %). Esta etapa permite eliminar el color rojo de las muestras y deacilar los ARNt cargados. Se incuban 10' a 50 $^{\circ}\text{C}$. Cuando las muestras están decoloradas se añade 1ml de 25 % TCA a cada tubo, se agita y se dejan 30 minutos a 0-4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se recoge el precipitado a través de filtros Whatman GF/C, que son posteriormente lavados con 5 ml de 5 %

TCA. /* Los filtros se secan bajo una lámpara y se introducen en viales a los que se adicionan 4ml de líquido de contador de centelleo, compuesto por Tolueno / Tritón X-100 / PPO / POPOP. La radiactividad presente en cada una de las muestras se mide en un contador de centelleo Beckman LS 7800 con una eficiencia de ~70% para ^{35}S .

Ya que los polipéptidos son insolubles en TCA, mientras que los aminoácidos libres son bastante solubles, se puede estimar la cantidad de polipéptidos que han sido sintetizados por el sistema.

Marcado radiactivo de proteínas

El método utilizado es la metilación reductiva, usando cianoborohidruro sódico (176).

Mediante esta técnica los grupos amino libres de las proteínas son convertidos en derivados N,N-dimetilo al reaccionar con formaldehído y un agente reductor.

Este método permite introducir en las proteínas, grupos metilo marcados con ^{14}C o tritio, obteniendo así proteínas marcadas radiactivamente a elevadas actividades específicas, produciendo cambios mínimos en la estructura proteica.

Las condiciones que se han utilizado en este trabajo son : 1 mg/ml de la proteína a marcar, 20 mM cianoborohidruro, 100 mM tampón Hepes pH 7.5 y ^{14}C -Formaldehído en una relación 12:1 respecto a las lisinas presentes en la proteína (se estima que es la relación óptima).

La reacción se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se determina el nivel de marcado , tomando una alícuota de la mezcla de reacción y midiendo el material insoluble en TCA frío.

El formaldehído libre se elimina mediante el método descrito por Penefsky (177).

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (178).

Las dimensiones de las placas utilizadas son 14 x 16 x 0.15 cm. Los geles constan de dos capas:

- una capa superior de mayor tamaño de poro, que constituye el gel concentrador, preparado al 3 % de poliacrilamida, con un recorrido de 2 cm.

- una capa inferior de tamaño de poro menor, o gel separador, con un recorrido de 12 cm y una concentración de poliacrilamida que depende de las características de las proteínas a separar, pero que en este trabajo ha sido normalmente del 12 %.

El recorrido se lleva a cabo a corriente continua, utilizando 10 mA por gel durante 16-20 horas, hasta que el frente se encuentra a aproximadamente 1 cm del final de la placa, o dejando salir el frente en aquellas ocasiones en que interesa una mayor separación de las bandas.

Fluorografía

Esta técnica, denominada también autorradiografía de centelleo, fué descrita por Bonner y Laskey (179), y permite detectar la presencia de moléculas marcadas radiactivamente en el interior de geles de poliacrilamida, con una elevada eficiencia.

Para ello el gel se impregna con un centelleador orgánico, el 2,5-difeniloxazol (PPO), antes de ser expuesto a la película de rayos X. Dado que este compuesto es muy insoluble en agua, pero muy soluble en dimetilsulfoxido (DMSO), se elimina el agua del gel sustituyéndola por DMSO antes de introducir este compuesto.

Las partículas β emitidas por el isótopo radiactivo interaccionan con el PPO, emitiendo una radiación luminosa que impresiona la placa de rayos X, intensificando así la imagen aut.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se dejan 30 minutos en solución fijadora compuesta de 45 % metanol, 7.5 % ácido acético glacial en agua destilada. A continuación se sumergen en DMSO 30 minutos. (En esta etapa se puede utilizar DMSO ya utilizado con este fin en una ocasión anterior) y después en DMSO nuevo otros 30 minutos. Después se sumerge en una solución 22.2 % (p/v) de PPO en DMSO, durante al menos 3 horas, cuidando que la solución cubra por completo el gel. Finalmente se retira la solución de PPO y el gel se sumerge en agua destilada durante 1 hora, adquiriendo una tonalidad blanquecina al precipitar el PPO en presencia del agua.

Los geles se secan y se colocan, en la oscuridad, entre dos películas de rayos X (X-Omat XS5 Kodak) de 18x24 cm, y en una carpeta de placas reflectantes, especialmente diseñada para este uso. Se guarda a -80 °C el tiempo que sea necesario para lograr una buena impresión de las placas.

Las placas se revelan durante 5 minutos en una solución de revelado especial para fluorografías (LX 24, Kodak). La placa se enjuaga con agua y se sumerge en una solución fijadora (AL4, Kodak), durante 5 minutos. Finalmente, la placa se lava con abundante agua y se deja secar a temperatura ambiente.

Las bandas visualizadas por fluorografía se cuantifican utilizando un densitómetro LKB Ultrosan Laser, con un integrador Hewlett-Packard.

Inmunoprecipitación de proteínas específicas

Para identificar y aislar un polipéptido específico entre los productos de la síntesis de traducción, se utilizó un sistema de inmunoprecipitación en el que el agente precipitante de los complejos antígeno-anticuerpo formados, son células de S. aureus muertas y fijadas con formalina.

Se utilizó el método de Kessler (180), con ligeras

modificaciones. Las células de los S. aureus se tratan previamente con tampón de lavado TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) conteniendo 10 % β -mercaptoetanol, y 30 % SDS (p/v), incubándolos 20 minutos a 100 °C, y centrifugando posteriormente 2 min en una Eppendorf. Se repite esta operación una vez más y el sedimento celular se lava 3 veces con TBS. Tras el último lavado las células se resuspenden en tampón NET (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % Nonidet, 1 mg/ml de ovoalbúmina y 0.02 % azida sódica).

A continuación los S. aureus lavados se incuban con la síntesis "in vitro", en ausencia de anticuerpo, para eliminar los componentes que se adsorben inespecíficamente. Para ello una vez finalizada la síntesis se añade por cada 15 μ l, 1 μ l de PMSF, 5 μ l de 0.1 M L-metionina y 250 μ l de tampón NET. Se añaden 50 μ l de una suspensión al 10 % de los S. aureus lavados y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifuga 2 min en una Eppendorf y el sobrenadante se transfiere a un tubo, al que se añade el anticuerpo específico.

En este trabajo se utilizó antisuero contra OTC, obtenido de conejos inmunizados con OTC de hígado de rata.

Se incuban a 4 °C durante la noche. Para precipitar los complejos antígeno-anticuerpo formados se añaden al medio 100 μ l de una suspensión de S. aureus lavados, incubando a temperatura ambiente, con agitación. Tras centrifugar el sedimento se lava 3 veces con 500 μ l de solución de lavado (15 mM tampón fosfato pH 7.1, 1 mM EDTA 0.5 M NaCl, 0.5 % tritón X-100 y 0.05 % SDS).

Si las muestras se analizan mediante electroforesis, el último sedimento se resuspende en 75 μ l de tampón de muestra y se hierve a 100 °C, 3-5 min. Se dejan enfriar y se centrifugan en Eppendorf, recuperando el sobrenadante que está listo para ser analizado.

Aislamiento de mitocondrias

Se utiliza el método de Morimoto (181) que permite obtener una fracción mitocondrial con la mínima contaminación de lisosomas, que suele ser el orgánulo contaminante más habitual en estas extracciones.

Se sacrifican las ratas por decapitación y se extraen los hígados con ayuda de tijeras y pinzas. Se pesan y se lavan en la solución de aislamiento (medio H), compuesto de 220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM hepes pH 7.4, ajustado con KOH, en frío.

Se trocean y se resuspenden en 2 volúmenes de medio H, homogenizándose en un homogenizador de vidrio Potter Elvehjem, durante 4 ciclos completos a 1,000 rpm.

El homogenado resultante se diluye 1:3 en medio H y se centrifuga a 600 g en una Sorvall RC-5B, durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recoge con cuidado y se centrifuga de nuevo a 7,000 g, 15 min en la misma centrífuga. El sobrenadante de esta centrifugación se recupera, constituyendo el sobrenadante post-mitocondrial (extracto citosólico) que se guarda a 4 °C hasta su uso.

El sedimento se resuspende en un pequeño volumen de medio H utilizando un "dedo frío". Una vez resuspendido se diluye con un volumen de medio H igual a la mitad del volumen de homogenado inicial y se centrifuga a 7,000 g, 15 min. Se repite el lavado, resuspendiendo finalmente en un volumen mínimo de medio H, manteniéndose a 4 °C hasta su uso.

El contenido en proteína de la suspensión mitocondrial y del sobrenadante post-mitocondrial se determina mediante el método de Biuret-deoxicolato (182).

La capacidad respiratoria de las mitocondrias se determina midiendo la relación ADP/O mediante el método de Estabrook (183).

Ensayos de transporte a la mitocondria

Para estudiar el transporte de precursores

citosólicos a la mitocondria, se lleva a cabo una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm correspondiente, en las condiciones indicadas en el apartado correspondiente. Un pequeño volumen de la misma (habitualmente 2 μ l) se incuba con mitocondrias recién aisladas en un medio que contiene 0.25 M sacarosa y 5 mM tampón Hepes pH 7,6 y las adiciones que en cada caso se especificarán.

La incubación se lleva a cabo a 30 °C con agitación, durante 60 min, salvo que se indique lo contrario. Finalizada la incubación se centrifuga 5 min en una Eppendorf y si interesa se guarda el sobrenadante. El sedimento mitocondrial se lava con 1 ml de medio H frío y se centrifuga de nuevo. El sedimento final se resuspende en 50 μ l de tampón de muestra para ser analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior fluorografía.

Si el sobrenadante recuperado se va a analizar también mediante electroforesis y fluorografía se le adicionan 100 μ l de tampón de muestra y se procesan para ser analizados mediante electroforesis.

Se estima la conversión del precursor a la forma madura mediante análisis densitométrico de la fluorografía, integrando los picos correspondientes a ambas formas.

Cuando se desea determinar si los productos asociados a la mitocondria se encuentran en su interior, habiendo sido por lo tanto transportados al orgánulo, al finalizar la incubación de la síntesis con las mitocondrias, se centrifuga 5 min en una Eppendorf y el sedimento se resuspende en 500 μ l de medio H. Se trata con 70 μ g/ml de tripsina en hielo, durante 15 min. Posteriormente se adiciona inhibidor de la tripsina de soja a una concentración final de 140 μ g/ml, incubando 10 minutos en hielo. Finalmente se adicionan 500 μ l más de medio H, se centrifuga y el sedimento mitocondrial se resuspende en el tampón de muestra para ser analizado.

RESULTADOS

1) OBTENCION DEL ARNm DEL PRECURSOR DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HIGADO DE RATA (pOCT).

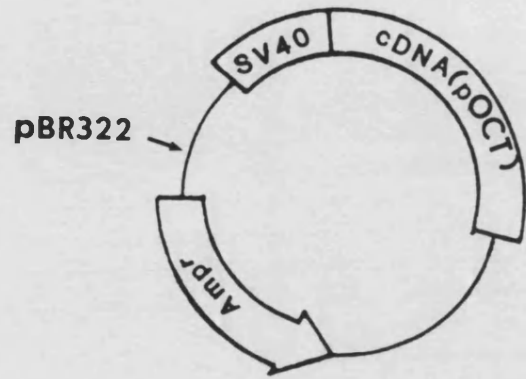
1.1) Transcripción "in vitro"

Para obtener cantidades apreciables del precursor de la ornitina transcarnbamilasa de hígado de rata (pOCT), en un estado homogéneo y funcional, se sintetizó el ARNm específico para pOCT mediante transcripción "in vitro" de su ADNc completo, utilizando el sistema SP6 (164).

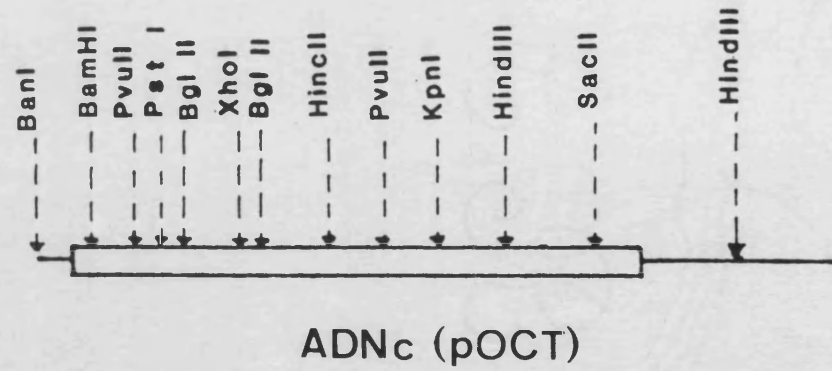
El ADN que codifica pOCT fué cedido por el Dr. G. Shore (Universidad McGill, Montreal, Canadá), inserto en un vector de clonación del sistema de Okayama y Berg (184). Este plásmido recombinante, denominado pMN152, tiene un tamaño de 4300 pb y está constituido por una porción del plásmido pBR322 (conteniendo el gen que confiere resistencia a la ampicilina), un fragmento de ADN del virus SV40 y un inserto de 1600 pb constituido por la secuencia codificadora completa para pOCT de hígado de rata y secuencias del gen no codificadoras, a ambos lados del ADNc (110 pb en el extremo 5' y 360 pb en el 3') (Figura 7).

La estrategia seguida para obtener el ARNm de pOCT se indica en la figura 8. El ADN que codifica la pOCT se insertó en el vector de transcripción pSP64 siguiendo el protocolo descrito por Nguyen y col (185) y se transcribió en el sistema SP6 tal como se describe a continuación :

El plásmido pMN152 se linealizó mediante digestión con el enzima AccI, que reconoce un sitio único 250 pb después del inserto del ADNc de pOCT; los extremos 5' protuberantes generados por esta digestión se hicieron romos utilizando la ADN polimerasa I (fragmento Klenow) en presencia de los desoxiribonucleósidos trifosfato. El plásmido lineal se digirió con el enzima Xba I, que reconoce un sitio único 40 nucleótidos antes del codón de iniciación de la traducción (ATG) del ADNc de pOCT. Se obtiene así un fragmento de 1.7 Kb con extremo 5' Xba I y 3' Acc I relleno con Klenow.



pMN152



ADNc (pOCT)

FIGURA 7

Esquema del clon pMN152 que contiene el ADNc de pOCT. Se indica un mapa parcial de restricción del ADNc de pOCT.

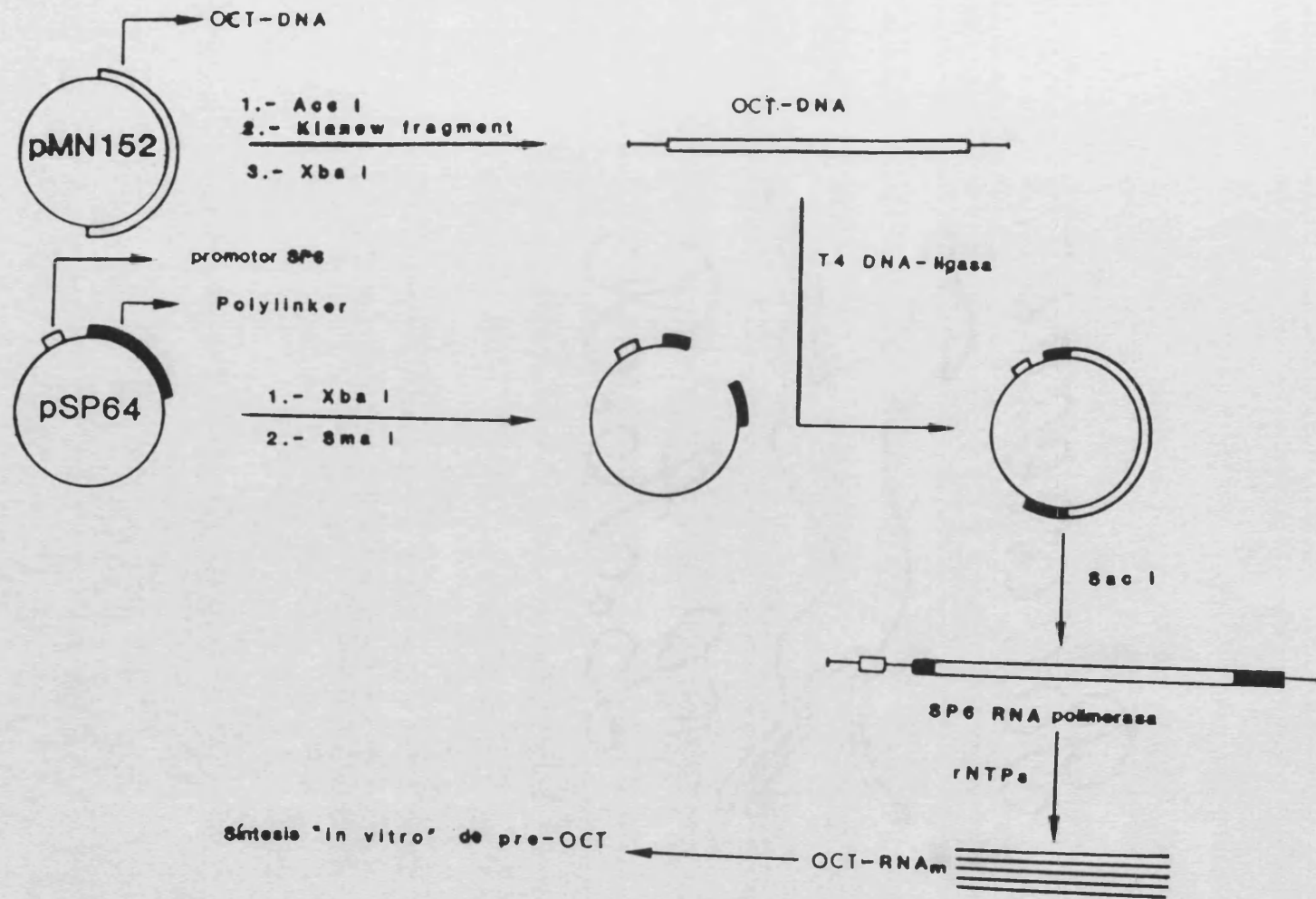


FIGURA 8

Esquema de la clonación del ADNc de pOCT en el vector pSP64 y su posterior transcripción en el sistema SP6.

Este fragmento se insertó entre los sitios Xba I y Sma I del "polylinker" del vector de transcripción pSP64 (164), y se utilizó para transformar una cepa de E. coli K12 (C600).

La identificación del clon recombinante se llevó a cabo cultivando las bacterias transformadas en un medio selectivo conteniendo ampicilina (40 µg/ml), y analizando el ADN plasmídico de las colonias crecidas.

Tras extraer el ADN plasmídico de 40 colonias, por lisis alcalina, tal como se describe en métodos, y analizarlo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % se comprobó que 2 de ellas contenían un plásmido de 4.7 Kb, que correspondía al tamaño esperado para el clon recombinante deseado (Figura 9).

Se determinó la orientación del inserto en estos plásmidos mediante digestión con las endonucleasas de restricción PvuII y HindIII. Los productos de las digestiones se analizaron en un gel de agarosa al 0.8 % y se comprobó que sólo uno de los plásmidos había integrado el fragmento en la orientación adecuada, respecto al promotor SP6, como se muestra en la figura 10.

Este clon se denominó pIC1552 y se guardó en cultivos de reserva para ser utilizados como fuente del ADN en los ensayos posteriores. En la figura 10 se muestra un esquema del clon recombinante.

Para la transcripción "in vitro" se aisló el plásmido pIC1552 mediante purificación en gradiente de cloruro de cesio, tal como se indica en métodos, y se linealizó mediante digestión con el enzima de restricción SacI, que reconoce un sitio único en el "polylinker" del vector pSP64, inmediatamente después del inserto del ADNc de pOCT.

Se utilizaron 0.2 µg de este plásmido lineal para llevar a cabo una transcripción "in vitro", en presencia de la ARN polimerasa SP6, tal como se describe en Métodos. Como control del buen funcionamiento del sistema de transcripción se llevó a

FIGURA 9.

Clonación del ADNc de pOCT en el vector de transcripción pSP64

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, del ADN plasmídico de las colonias crecidas en un medio selectivo (LAT-Amp), procedentes de la transformación llevada a cabo con los productos de la clonación del ADNc de pOCT en el vector de transcripción pSP64. Las flechas indican la posición de las bandas que corresponden a un ADN del tamaño esperado (4.7 Kb).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

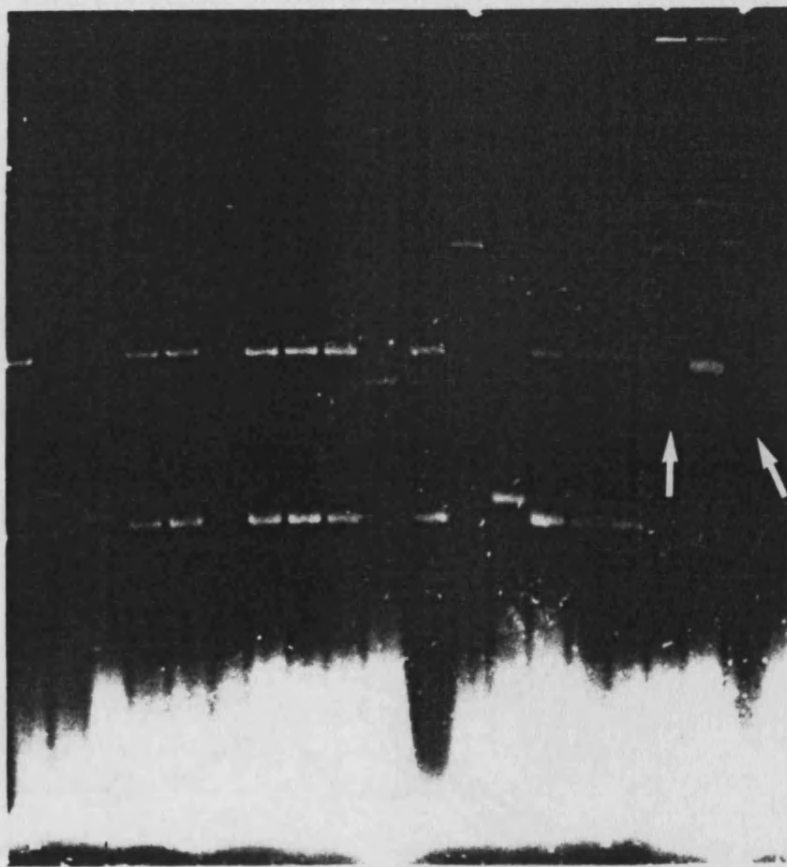
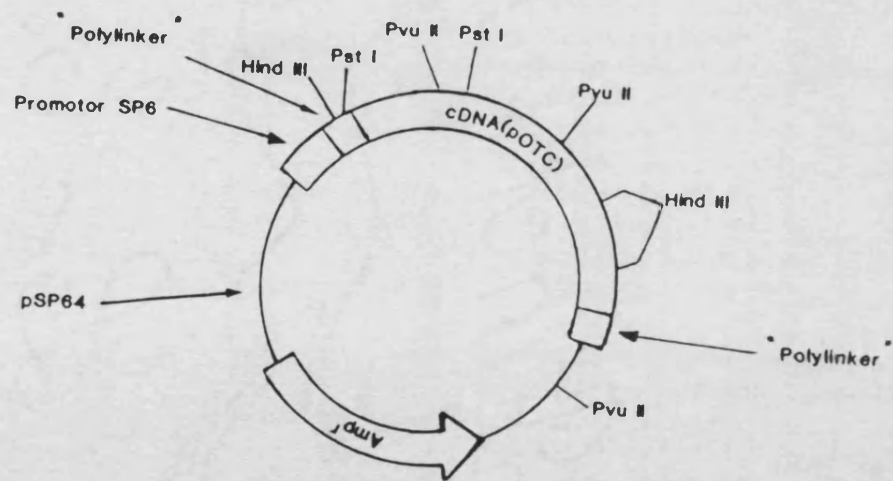


FIGURA 10.

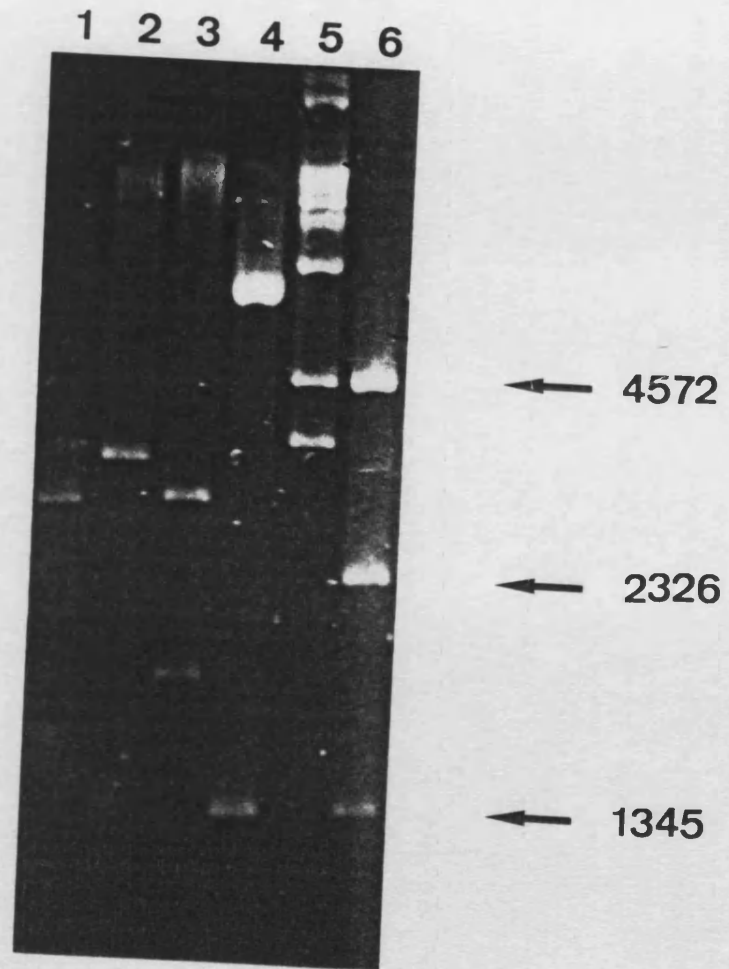
Estructura del plásmido pIC1552

a) Representación esquemática del plásmido pIC1552, resultante de la inserción del ADNc de pOCT en el "polylinker" del vector de transcripción pSP64. Únicamente se muestran los sitios de restricción, correspondientes a los enzimas utilizados para caracterizar la orientación del fragmento insertado.

b) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, que muestra las digestiones realizadas para averiguar la orientación del fragmento de 1,7 Kb, que contiene el ADNc de pOCT. La digestión del plásmido pIC1552 con el enzima Pvu II da lugar a tres fragmentos de 2,895, 1,337 y 468 pares de bases (pocillo 1), y la digestión con Hind III da lugar a tres fragmentos, de 3,331, 875 y 394 pares de bases (pocillo 2).



pIC1552



cabo una reacción en las mismas condiciones, utilizando el plásmido pSP64-Lys que es codifica el ARNm de la pre-lisozima de pollo.

Caracterización del transcrito obtenido

El transcrito obtenido a partir del ADNc de pOCT se analizó mediante electroforesis en gel de poliarilamida-urea. Se comprobó que se sintetizaba un solo producto, cuyo tamaño correspondía al del ARNm de pOCT ($\approx 1,800$ nucleótidos), como se observa en la figura 11.

También el transcrito obtenido a partir del ADN pSP64-Lys usado como control presentaba el tamaño esperado.

Se verificó además que el transcrito obtenido correspondía al ARNm de pOCT ya que fué reconocido específicamente por el ADNc de pOCT cuando éste se utilizó como sonda, en un ensayo de hibridación "dot blot". En la figura 12, se observa el filtro donde se llevó a cabo la hibridación, mostrando las zonas donde el ADNc de pOCT detecta secuencias complementarias, y que corresponden al transcrito de pOCT. El reconocimiento fué específico, ya que la sonda no hibridó con un ARN que carecía del ARNm de pOCT.

Se estimó que se obtenían $1.5 \mu\text{g}$ de ARNm de pOCT a partir de $0.2 \mu\text{g}$ del ADNc utilizado como molde, tras 5 horas de incubación, llevando a cabo una transcripción en presencia de $20 \mu\text{Ci}$ de ^{32}P -UTP (800 Ci/mmol) y estimando la radiactividad asociada a productos precipitados con TCA, a distintos tiempos de incubación.

2) SINTESIS «IN VITRO» DEL PRECURSOR DE LA OCT A PARTIR DE SU ARNm ESPECIFICO.

2.1) Obtención del polipéptido precursor

Una vez determinado que el transcrito obtenido correspondía al ARNm para pOCT, se determinó si era

FIGURA 11.

Caracterización del transcrito obtenido a partir del ADnc de pOCT de hígado de rata

Electroforesis en gel de poliacrilamida(5%)-5M urea, que muestra el producto de la transcripción del plásmido pIC1552, en el sistema SP6 (pocillo 2). También se observa el transcrito obtenido a partir del plásmido pSP64-Lys, usado como control del sistema de transcripción.

1 2



← 3566

← 1776

FIGURA 12.

Hibridación del transcrito obtenido a partir del pIC1552, con el ADNc de pOCT de hígado de rata

Para determinar si el transcrito obtenido correspondía al ARNm de pOCT de hígado de rata, se llevó a cabo una hibridación "dot blot". Para ello se aplicaron al filtro de nitrocelulosa, distintas cantidades del transcrito : 3, 1.5 y 0.75 ng (línea B, 1, 2 y 3 respectivamente). Como control de la especificidad de la reacción, se aplicaron también al filtro 10, 1 y 0.1 µg de ARN total de levadura ("Baker Yeast" de Sigma) (línea A, 1, 2 y 3 respectivamente), que carece de este ARNm específico.

A

B



1

2

3

4

funcional, siendo capaz de dirigir la síntesis de dicho precursor

Se utilizó el sistema de síntesis "in vitro" de proteínas que hace uso del lisado de reticulocitos tratado con nucleasa. Las condiciones óptimas se determinaron utilizando el ARN total de hígado de rata, tal como se describe en Métodos. Utilizando 1 mg/ml del ARN total se obtenía una incorporación de radiactividad a material TCA precipitable, de aproximadamente 60,000 cpm/ μ l de síntesis (\approx 20 veces el blanco).

En estas condiciones óptimas se llevó a cabo una síntesis utilizando el ARNm de pOCT. Se ensayaron distintas cantidades del transcrito (1, 2 y 3 μ l) que correspondían aproximadamente a 8.3, 16.6 y 25 ng respectivamente y se determinaron los productos TCA precipitables.

Se obtuvo la máxima incorporación cuando se utilizaron 25 ng del transcrito (\approx 16,000 cpm por microlitro de síntesis (7.6 veces el nivel del blanco). Al utilizar 16.6 ng se incorporaron \approx 14,000 cpm/ μ l (6.8 veces el blanco) y con 8.3 ng se obtuvieron \approx 5,700 cpm/ μ l (3.5 veces el blanco).

Cuando se analizaron los productos de la síntesis mediante electroforesis y posterior fluorografía, se comprobó que al utilizar el ARNm de pOCT se sintetizaba un polipéptido mayoritario cuya masa molecular correspondía a la del precursor de la OCT (39,400 daltons). (Figura 13).

En las mismas condiciones de síntesis se ensayó el ARNm de pre-lisozima obtenido como control de la transcripción, obteniéndose la máxima incorporación al utilizar 3 μ l de transcrito (\approx 5,900 cpm/ μ l)(4.7 veces el blanco). Mediante electroforesis y fluorografía se comprobó que el polipéptido sintetizado presentaba el tamaño esperado.

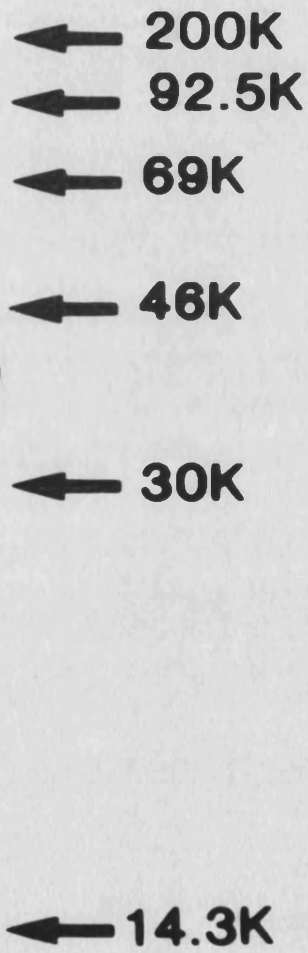
El ARNm de pOCT obtenido por este procedimiento es estable tras prolongados periodos de almacenamiento a -80 °C, manteniendo su capacidad de dirigir la

FIGURA 13.

Síntesis "in vitro" del precursor de la OCT de hígado de rata a partir de su ARNm específico

Se llevó a cabo una síntesis de proteínas "in vitro", utilizando el sistema de lisado de reticulocitos, descrito en Métodos, dirigida por el ARNm de pOCT obtenido mediante transcripción "in vitro". Finalizada la síntesis, se tomó una alícuota de la misma ($\approx 55,000$ cpm asociadas a productos TCA precipitables), y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS, y posterior fluorografía (pocillo 1). Como control se utilizó ^{14}C -OCT marcada por metilación reductiva ($\approx 100,000$ cpm) (pocillo 2).

1 2



síntesis del precursor con gran eficiencia.

2.2) Inmunoprecipitación con anti-OCT .

Se verificó que el polipéptido sintetizado a partir del ARNm de pOCT correspondía efectivamente al precursor de la OCT de hígado de rata, ya que fue reconocido por un antisuero específico contra OCT de hígado de rata.

Para ello se llevó a cabo una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT y una alícuota de la misma se sometió a inmunoprecipitación con el antisuero contra OCT, tal como se describe en Métodos. Otra alícuota idéntica se incubó con suero control. Como control de la especificidad de la reacción se sometió a inmunoprecipitación con el mismo antisuero contra OCT y en las mismas condiciones, una preparación de ^{14}C -OCT (100,000 cpm) marcada por metilación reductiva.

Se analizaron los productos de las inmunoprecipitaciones mediante electroforesis y posterior fluorografía, y se comprobó que el polipéptido mayoritario de la síntesis del ARNm de pOCT era reconocido específicamente por el antisuero contra OCT con gran eficiencia, mientras que en presencia de un antisuero control no se produjo la inmunoprecipitación del polipéptido (Figura 14). La gran eficiencia con que fue inmunoprecipitada en estas condiciones la ^{14}C -OCT utilizada como control, confirmó la especificidad del proceso.

3) TRANSPORTE DE pOCT A MITOCONDRIAS AISLADAS DE HIGADO DE RATA.

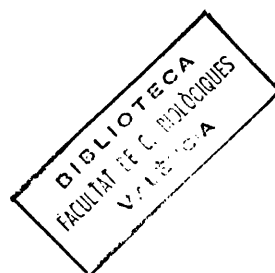
3.1) Ensayo preliminar.

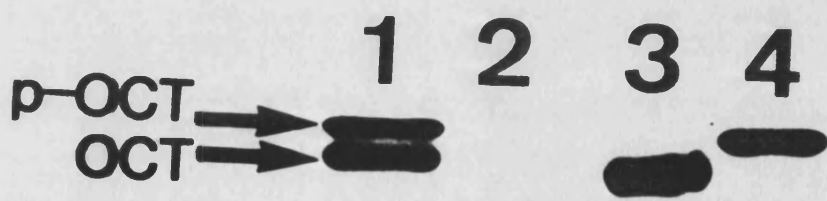
Una vez establecido que el polipéptido sintetizado era el precursor de la OCT, se determinó si era funcional siendo importado y procesado a su forma madura en presencia de mitocondrias aisladas de hígado

FIGURA 14.

Inmunoprecipitación con anti-OCT de los productos de la síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT

Se llevó a cabo una síntesis "in vitro" en las condiciones habituales, dirigida por el ARNm de pOCT y se tomó un volumen correspondiente a, aproximadamente, 150,000 cpm y se sometió a inmunoprecipitación con 20 μ l del antisuero específico contra OCT, en las condiciones descritas en Métodos. El inmunoprecipitado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS y posterior fluorografía (pocillo 4). Paralelamente, una cantidad idéntica de síntesis se inmunoprecipitó con 20 μ l de antisuero control, en las mismas condiciones (pocillo 2). Como control de la especificidad del proceso, se inmunoprecipitó 14 C-OCT (\approx 200,000 cpm) marcada por metilación reductiva, con el antisuero contra OCT (pocillo 3).





de rata.

Como se observa en la figura 15, la incubación de pOCT con mitocondrias aisladas de hígado de rata dió lugar a la aparición de un polipéptido adicional, que migró en el gel a la misma altura que la OCT de hígado de rata marcada con ^{14}C por metilación reductiva y utilizada como control. La banda de pOCT que se observó tras la incubación con mitocondrias correspondía a la forma precursora que no había sido importada en estas condiciones.

Se determinó que el producto procesado se encontraba en el interior del orgánulo porque al someter las mitocondrias, tras la incubación, a un tratamiento suave con tripsina tal como se describe en métodos, el polipéptido de 36 kilodaltons fue resistente a la acción de la proteasa añadida (Figura 16).

3.2) Caracterización de la etapa de transporte.

3.2.1) Requerimiento de la mezcla de traducción.

Se comprobó que para que tuviera lugar el importe y procesado de pOCT a mitocondrias aisladas, se requería la presencia del medio de traducción utilizado en la síntesis del precursor, tal como habían descrito Miura y col.(131).

Se incubó un pequeño volumen de la síntesis con mitocondrias aisladas de hígado de rata, en las condiciones descritas en Métodos y se comprobó que en ausencia de otros componentes sólo se produjo la unión del precursor a la mitocondria sin detectarse transporte y paso a su forma madura (fig.17, pocillo 7).

Cuando en las mismas condiciones se adicionaron a la incubación los componentes del medio de traducción

FIGURA 15

Transporte a la mitocondria del precursor de la OCT sintetizado a partir de su ARNm específico: ensayo preliminar

Se llevó a cabo una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm específico para pOCT, y 6 μ l de la misma (\approx 100,000 cpm) se incubaron con mitocondrias aisladas de hígado de rata (36 μ g de proteína), en un volumen final de 24 μ l. Finalizada la incubación se analizó todo el medio de incubación mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (12%) - SDS y posterior fluorografía (pocillo 1). EL pocillo 2 corresponde a una alícuota de la síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 55,000 cpm), y los pocillos 3 y 4, a 14 C-OCT (250,000 y 100,000 cpm respectivamente).

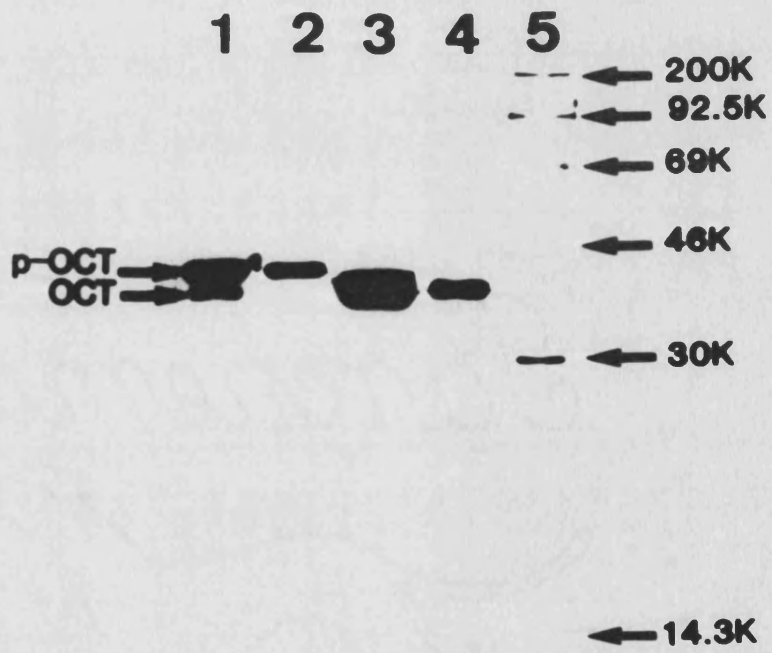


FIGURA 16.

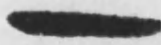
Verificación del transporte

Para determinar si el precursor que ha sido transportado y procesado a su forma madura, se encuentra en el interior de la mitocondria, al finalizar la incubación de pOCT con mitocondrias aisladas, se separan las mitocondrias mediante centrifugación y se someten a un tratamiento suave con tripsina, tal como se describe en métodos. Finalmente, las mitocondrias se analizan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS y posterior fluorografía (pocillo 2). En el pocillo 1 se muestran los productos asociados a la mitocondria tras la incubación con pOCT, sin el posterior tratamiento con tripsina.

1



2



← pOCT

← OCT

FIGURA 17.

Requerimiento del medio de traducción

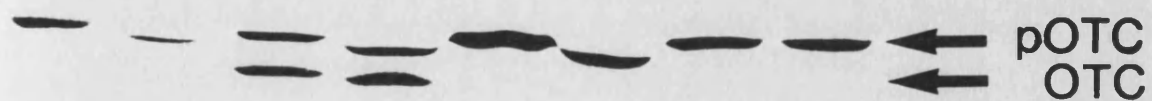
Se determinó el efecto que ejercen los componentes del medio de traducción, utilizado en la síntesis del precursor, en la importación de pOCT a la mitocondria.

Para ello se incubaron 2 μ l de una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 36,000 cpm), con mitocondrias aisladas de hígado de rata, en presencia de lisado de reticulocitos (2.9 mg de proteína) (pocillos 1 y 2), solución de traducción, excepto el ARNm de pOCT y la 35 S-metionina, (pocillos 5 y 6) y el medio de traducción completo, es decir lisado (2.9 mg de proteína) y la solución de traducción, menos el ARNm de pOCT y la 35 S-metionina (pocillos 3 y 4).

En todos los casos se llevó a cabo la incubación con dos cantidades de mitocondrias (200 μ g de proteína, pocillos 1, 3 y 5 y 400 μ g de proteína, pocillos 2, 4 y 6). El pocillo 7 corresponde a la incubación del precursor con mitocondrias, en ausencia de otros factores. El pocillo 8, corresponde a una alícuota de la síntesis "in vitro".

La migración distorsionada de las bandas, se debe al diferente contenido en proteína mitocondrial en cada caso.

1 2 3 4 5 6 7 8



(lisado de reticulocitos y solución de traducción), a la concentración a la que se encuentran presentes en la síntesis del precursor, se produjo la importación y paso del mismo a su forma madura. (Figura 17, pocillos 3 y 4).

Para determinar qué componentes del medio de traducción eran necesarios para que se transportara el precursor, se ensayaron por separado el lisado de reticulocitos y la solución traducción a la misma concentración a la que se encontraban presentes en el medio de traducción y se comprobó que en estas condiciones no estimulaban el transporte, produciéndose sólo la unión del precursor a la mitocondria, que en el caso del lisado incluso fue menor que cuando se utilizó el precursor sólo (fig. 17, pocillos 1, 2, 5 y 6).

Esto confirmaba que se requería la presencia conjunta del lisado de reticulocitos y de la solución de traducción para que se produjera el importe y procesado del precursor a mitocondrias aisladas.

La concentración a la que este medio de traducción producía la máxima estimulación del transporte correspondía a la que era utilizada en la síntesis del precursor, tal como se observa en la figura 18.

3.2.2) Eficiencia del transporte en función de la cantidad de mitocondrias

Se determinó que la cantidad de mitocondrias presentes en el medio de incubación no constituía un factor limitante en la unión y el transporte del precursor a la mitocondria, ya que al incubar una cantidad fija del precursor con cantidades crecientes de mitocondrias, en presencia del medio de traducción, se produjo el transporte con la misma eficiencia en todos los casos. (fig. 19, pocillos 1-3). Se observó que con la máxima cantidad de mitocondrias utilizada, se unió más precursor a la mitocondria, sin embargo no mejoró el transporte observado.

Esto sugiere que en las condiciones de transporte

FIGURA 18.

Transporte en presencia de cantidades crecientes de medio de traducción

Se incubaron 2 μ l de una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 70,000 cpm), con mitocondrias aisladas de hígado de rata (200 μ g de proteína), en presencia de cantidades crecientes de medio de traducción. Al finalizar la incubación se separaron las mitocondrias y el sobrenadante mediante centrifugación, y se analizaron en un gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

Las cantidades de medio de traducción utilizadas fueron 9 μ l (pocillos 1 y 2), 17 μ l (pocillos 3 y 4) y 42 μ l (pocillos 5 y 6), correspondiendo esta última, a la proporción en que el medio de traducción se encuentra presente en la reacción de síntesis del precursor. Los pocillos 1, 3 y 5 corresponden a los sobrenadantes de la incubación, mientras que los pocillos 2, 4 y 6 corresponden a las mitocondrias.

1 2 3 4 5 6



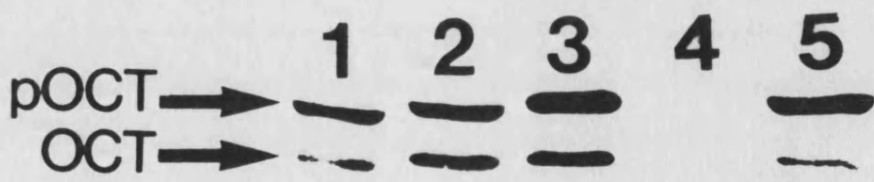
← p OCT
← OCT

FIGURA 19

Eficiencia del transporte en función de la cantidad de mitocondrias

Se determinó si la cantidad de mitocondrias presentes en el medio de incubación, podía constituir un factor limitante en el transporte del precursor. Para ello se incubaron 2 μ l de la síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 40,000 cpm), con cantidades crecientes de mitocondrias aisladas de hígado de rata, correspondientes a 100 μ g de proteína mitocondrial (pocillo 1), 200 μ g (pocillo 2) y 400 μ g (pocillo 3). Las mitocondrias se separaron por centrifugación y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS, y posterior fluorografía.

También se comprobó si el medio de traducción podía sustentar más transporte del observado, incubando el sobrenadante de la incubación llevada a cabo con 400 μ g de proteína mitocondrial, (pocillo 3) con 2 μ l de precursor recién sintetizado (pocillo 5). También se adicionaron mitocondrias (200 μ g de proteína) al sobrenadante de la incubación del precursor con 200 μ g de proteína mitocondrial, que corresponde al pocillo 2 (pocillo 4).



empleadas, no es la saturación del sistema del transporte de la mitocondria el motivo de que no se transporte todo el precursor presente en el medio de incubación.

Se determinó que tampoco los componentes del medio de traducción constituían el factor limitante del transporte ya, que cuando se incubó precursor recién sintetizado con un medio de transporte ya utilizado en un ensayo de transporte, se producía el importe y procesado con la misma eficiencia que si se utilizaba un medio nuevo.

3.2.3) Eficiencia del precursor para ser transportado

El hecho de que sólo se transporte parte del precursor adicionado al medio, en unas condiciones en que ni las mitocondrias ni los factores requeridos parecían ser limitantes, sugería que podía haber una limitación inherente a las características del precursor sintetizado.

Se comprobó que la presencia de cantidades crecientes de precursor en el medio de incubación daba lugar a un aumento tanto en la cantidad de precursor unido como en el nivel de transporte, pero en ningún caso se logró transportar todo el precursor presente en el medio. El hecho de utilizar precursor sintetizado durante tiempos distintos no influyó en el resultado. (Figura 20).

También se comprobó que el precursor tenía que utilizarse recién sintetizado, ya que tras su almacenamiento a -80°C perdía su capacidad para ser transportado, incluso en las condiciones óptimas, como se observa en la figura 21.

Sin embargo el polipéptido era estable, en cuanto a su masa molecular aparente, tras prolongados períodos de almacenamiento a -80°C . (Figura 22).

3.2.4) Eficiencia del transporte en función del

FIGURA 20

Eficiencia del transporte en función de la cantidad de precursor

Se llevó a cabo una síntesis "in vitro" con el ARNm de pOTC a dos tiempos de síntesis (20 y 60 minutos) y cantidades crecientes de las mismas se incubaron con mitocondrias aisladas de hígado de rata (400 μ g de proteína). En todos los casos los componentes de la mezcla de traducción se encontraban en la misma proporción, ya que dependiendo del volumen de síntesis presente en el ensayo se adicionaron diferentes cantidades de estos componentes. Al finalizar la incubación las mitocondrias se separaron mediante centrifugación y se procesaron para su análisis mediante electroforesis y posterior fluorografía.

Los pocillos 1-3, corresponden a 2, 4 y 8 μ l de la síntesis llevada a cabo durante 30 minutos. Los pocillos 4-6 corresponden a las mismas cantidades, pero de una síntesis de 60 minutos.



FIGURA 21

Ensayo de transporte del precursor tras su almacenamiento a -80 °C

Se comprobó si el precursor sintetizado, era competente para el transporte a la mitocondria tras ser almacenado a -80 °C, evitando así la necesidad de sintetizarlo inmediatamente antes de llevar a cabo cada experimento de transporte.

Para ello se llevó a cabo una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT, y una alícuota de 2 μ l (\approx 40,000 cpm), se incubó con mitocondrias (400 μ g de proteína) en las condiciones habituales, en presencia del medio de traducción. Finalizada la incubación las mitocondrias se separaron mediante electroforesis y posterior fluorografía (pocillo 1). Otras alícuotas idénticas, se almacenaron a -80 °C durante 24 horas y, transcurrido este tiempo, una de ellas se incubó con mitocondrias aisladas, en las mismas condiciones que la anterior (pocillo 2). Otra de las alícuotas almacenadas a -80 °C se analizó directamente por electroforesis y fluorografía (pocillo 3).

1 2 3

pOCT
OCT



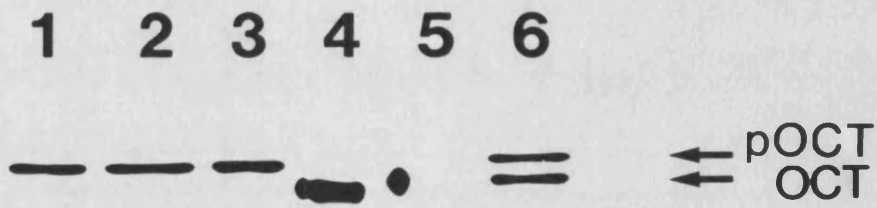
FIGURA 22

Estabilidad del precursor tras su almacenamiento a -80 °C

Se determinó si el polipéptido sintetizado "in vitro" era estable tras su almacenamiento a -80 °C, durante diferentes periodos de tiempo. Para ello, una vez finalizada la síntesis "in vitro" en las condiciones habituales, se hicieron alícuotas de 2 μ l y se guardaron a -80 °C. Transcurridos 7, 15 y 30 días de almacenamiento se descongelaron y se les añadió el tampón de muestra para ser analizados mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (12 %)-SDS (pocillos 1-3, respectivamente).

En el pocillo 6 se observa una alícuota del precursor recién sintetizado, junto a ^{14}C -OCT (\approx 100,000 cpm), marcada por metilación reductiva, como controles. En el pocillo 4 también se observa, ^{14}C -OCT control (\approx 200,000 cpm).

control
p.oct



tiempo de incubación

El máximo transporte obtenido en presencia del medio de traducción se obtuvo tras 30 minutos de incubación, sin producirse un aumento significativo cuando la incubación se prolonga hasta 60 minutos. También en esta ocasión se llevó a cabo la síntesis del precursor a distintos tiempos y se comprobó que se obtenía la misma eficiencia en el transporte cuando se utilizó precursor sintetizado a 30 y 60 minutos. (Figura 23).

3.2.5) Efecto de los distintos componentes de la solución de traducción

Se determinó qué componentes de la mezcla de traducción eran los responsables del efecto estimulador observado en presencia del lisado de reticulocitos.

Para ello se llevó a cabo la incubación en las condiciones habituales, adicionando al medio los distintos constituyentes de la solución de traducción, a la concentración a la que se encuentran en la misma, en presencia de lisado de reticulocitos.

Se comprobó que de todos los componentes ensayados sólo la espermidina 0.5 mM, y los iones potasio (110 mM) y magnesio (1.5 mM) estimulaban el transporte del precursor (Figura 24 : pocillos 2 y 6).

El efecto estimulador de los iones potasio y magnesio en presencia del lisado de reticulocitos ya había sido descrito por Miura y col (131), sin embargo era la primera vez que se relacionaba una poliamina con el transporte "in vitro" de un precursor mitocondrial.

3.2.6) Requerimientos energéticos

Puesto que está descrito que el transporte de pOCT a mitocondrias aisladas requiere que éstas se encuentren energizadas se verificó si en las

FIGURA 23

Eficiencia del transporte en función del tiempo de incubación

Se llevó a cabo una síntesis "in vitro" con el ARNm de pOTC y a diferentes tiempos de incubación (15, 30 y 60 minutos) se tomaron alícuotas de 2 μ l (\approx 35,000 cpm), y se incubaron con mitocondrias aisladas de hígado de rata (400 μ g de proteína), en presencia de los componentes de la mezcla de traducción, durante diferentes periodos de tiempo (15, 30 y 60 minutos). Al finalizar cada incubación las mitocondrias se separaron por centrifugación y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12 %)-SDS y posterior fluorografía.

Pocillo 1: 15 min de síntesis, 30 min de transporte;
Pocillo 2: 15 min de síntesis, 60 min de transporte;
Pocillo 3: 30 min de síntesis, 30 min de transporte;
Pocillo 4: 30 min de síntesis, 60 min de transporte;
Pocillo 5: 60 min de síntesis, 30 min de transporte;
Pocillo 6: 60 min de síntesis, 60 min de transporte.

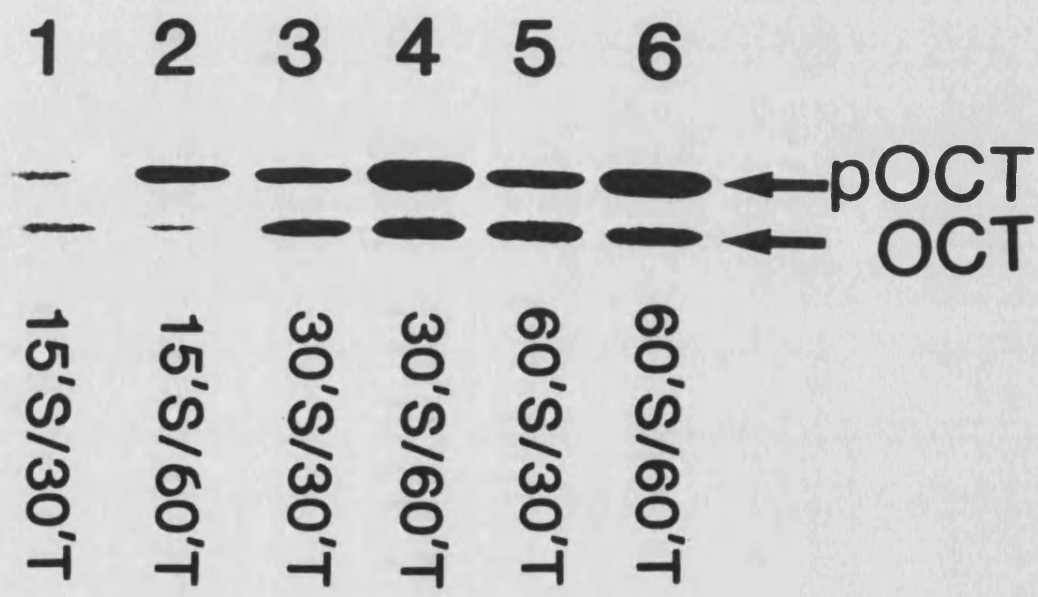


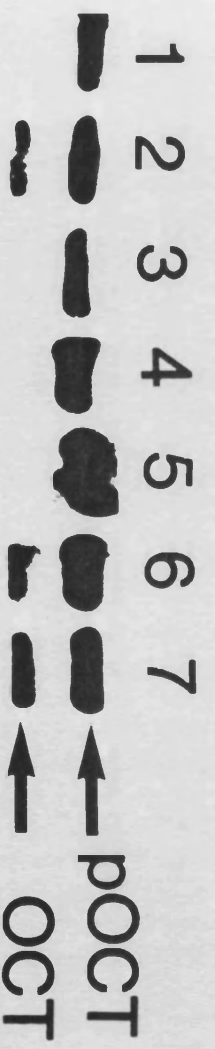
FIGURA 24

Efecto de los componentes de la solución de traducción

Para determinar los componentes de la solución de la traducción, responsables del efecto estimulador observado sobre el transporte de pOCT, se incubaron 2 μ l de la síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 36,000 cpm), con mitocondrias aisladas de hígado de rata (400 μ g de proteína), en presencia de lisado de reticulocitos (2.9 mg de proteína) y de los distintos componentes de la solución de traducción, a la concentración a la que se encuentran presentes en la mezcla de traducción completa: 0.5 mM espermidina (pocillo 2), 0.7 mM ATP, 0.3 mM GTP, 15 mM creatinfosfato, y 1.5 mg/ml de creatinfosfoquinasa (pocillo 3), 2.2 mM DTT (pocillo 4), 27 μ M de una mezcla de aminoácidos, (pocillo 5) y 0.75 mM acetato magnésico y 110 mM KCl (pocillo 6).

En el pocillo 1 se incluye el precursor incubado en ausencia de otros componentes. Como control se incubó el precursor en presencia del medio de traducción completo (pocillo 7).

La fluorografía corresponde a los productos asociados a la mitocondria tras la incubación, analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.



condiciones de ensayo utilizadas las mitocondrias mantenían su capacidad respiratoria a lo largo de la incubación y si los sustratos de la respiración podían constituir un factor limitante del transporte del precursor en las condiciones utilizadas.

Se comprobó que las mitocondrias mantenían su capacidad respiratoria a lo largo de la incubación, en las condiciones utilizadas en los ensayos de transporte, determinando la relación ADP/O a distintos tiempos, utilizando el método de Estabrook (183).

Los sustratos de la respiración tampoco parecían ser limitantes en las condiciones utilizadas ya que la adición al medio de succinato y ADP no mejoró el transporte, produciendo incluso una ligera disminución del mismo.

4) ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE TRADUCCION QUE FAVORECEN EL TRANSPORTE

4.1) Caracterización parcial de los factores requeridos

Ya que la presencia del lisado de reticulocitos estimula el transporte de pOCT se trató de caracterizar el factor(es) presentes en el lisado, que son responsables de este efecto. Miura y col.(131) observaron que el tratamiento con tripsina y a 100 °C, 3 minutos, eliminaba el efecto estimulador observado, mientras que el tratamiento con RNasa no parecía afectarle. El posible factor no era dializable por lo que concluyeron que debía ser de carácter proteico y de elevado peso molecular.

Para verificar este hecho se sometió el lisado de reticulocitos a los tratamiento con tripsina, RNasa y 100 °C, 3 minutos. Los lisados tratados se adicionaron al medio de incubación, en presencia de la solución de traducción y se comprobó que el

tratamiento con tripsina producía la inhibición del transporte, al igual que la incubación a 100 °C, 3 minutos (fig. 25, pocillos 2 y 4). El tratamiento con RNasa no afectó el transporte del precursor, aunque produjo un aumento en la unión a la mitocondria (fig. 25, pocillo 3). Estos resultados corroboraban los obtenidos por Miura y col.

Posteriormente se sometió el lisado de reticulocitos a un fraccionamiento con sulfato amónico, y se comprobó que la fracción no precipitada al 80 % de saturación, mostraba máximo efecto estimulador en presencia de la solución de traducción (fig. 26 pocillo 4).

4.2) Estimulación por iones potasio y magnesio

Ya que se había observado que la presencia de los iones potasio y magnesio en el medio de incubación, en presencia lisado de reticulocitos, estimulaba el transporte de pOCT se determinó si por separado estos iones ejercían el mismo efecto.

Se comprobó que ambos iones estimulaban el transporte cuando se adicionaban con lisado de reticulocitos y que este efecto era función de su concentración en el medio de incubación. El máximo efecto se lograba al adicionar al medio iones magnesio a una concentración final de 1.5 mM (1.5 mM acetato magnésico)(figura , pocillo) y 110 mM para los iones potasio (figura 27).

Al considerar las concentraciones a las que los iones son estimuladores hay que tener en cuenta que los lisados presentes en el medio de incubación contienen por término medio iones potasio a una concentración 37 mM y 1.7 mM de iones magnesio (186) lo que supone que los iones potasio aportados por el lisado son 7.4 mM y los iones magnesio 0.34 mM.

FIGURA 25.

Caracterización parcial de los factores del lisado de reticulocitos requeridos para el transporte

El lisado de reticulocitos se sometió a diferentes tratamientos y posteriormente fué utilizado en los ensayos de transporte, en presencia de la solución de traducción. Tras la incubación, las mitocondrias se analizaron mediante electroforesis y posterior fluorografía.

Así se trató con 100 µg/ml de tripsina, durante 30 minutos a 30 °C, deteniendo la reacción con 200 µg/ml de inhibidor de la tripsina aislado de soja (pocillo 2). Por otra parte se trató con 80,000 unidades de RNasa/ml a 37 °C, 10 min (pocillo 3) y a 100 °C durante 3 minutos (pocillo 4). También se trató con RNasa primero y posteriormente con tripsina (pocillo 5). Como control se llevó a cabo un ensayo de transporte en presencia de lisado de reticulocitos que no se había sometido a ningún tratamiento previo (pocillo 1).

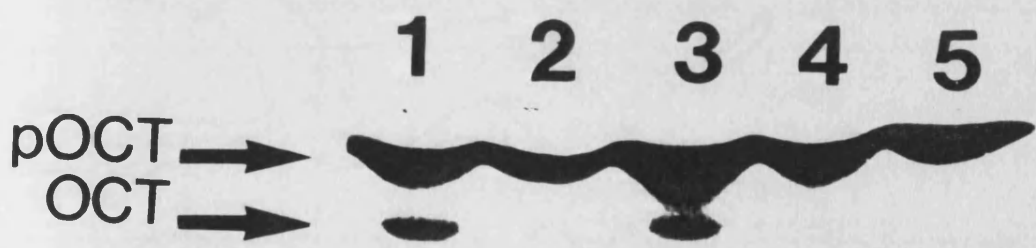


FIGURA 26

Transporte en presencia de lisado
de reticulocitos fraccionado con sulfato amónico

Para caracterizar mejor los factores del lisado de reticulocitos, responsables del efecto estimulador observado sobre el transporte de pOCT, se sometió el lisado de reticulocitos a un fraccionamiento con sulfato amónico, y las distintas fracciones obtenidas se utilizaron en un ensayo de transporte, en presencia de la solución de traducción.

En la fluorografía se muestran los productos asociados a las mitocondrias, tras su incubación en presencia de la fracción precipitada al 40 % de saturación (pocillo 1), a 40-80 % de saturación (pocillo 2) y del sobrenadante no precipitado (pocillo 3). Como control se llevó a cabo el transporte en presencia del lisado completo (pocillo 4).

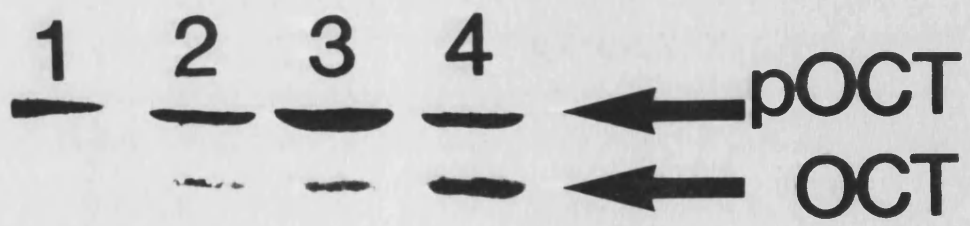


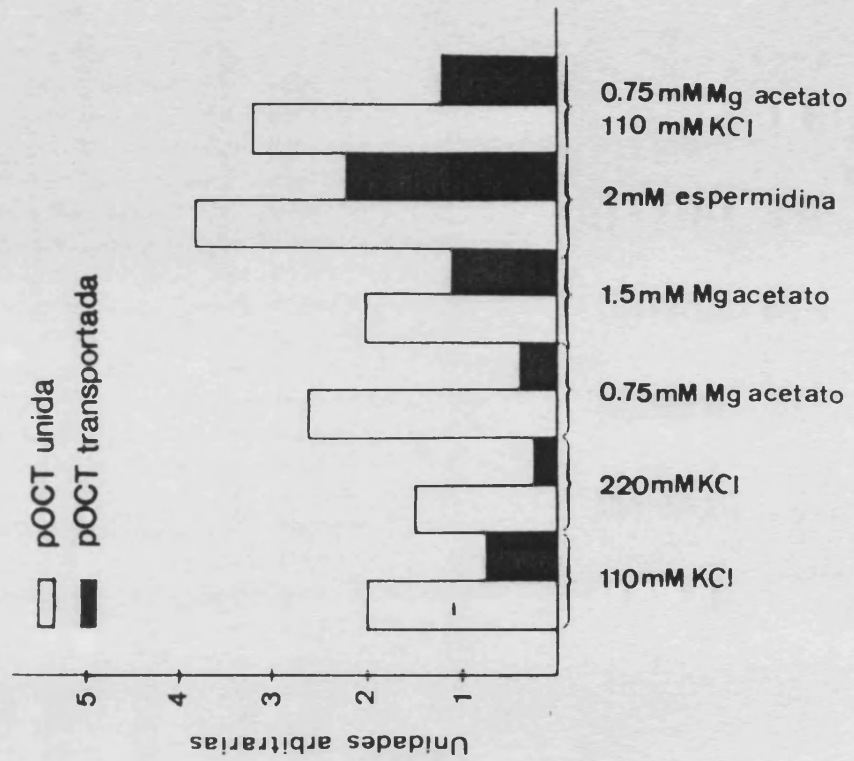
FIGURA 27

Estimulación por iones potasio y magnesio

Se estudió el efecto estimulador de los iones potasio y magnesio en función de la concentración. Para ello se incubaron 2 μ l de una síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 35,000 cpm), con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína) en presencia de 0.75 mM y 1.5 mM acetato magnésico (pocillos 3 y 4), 110 y 220 mM cloruro potásico (pocillos 1 y 2) y en presencia de 0.75 mM de acetato magnésico y 110 mM cloruro potásico (pocillo 6). Como control se utilizó 2 mM espermidina (pocillo 5).

La fluorografía corresponde al análisis de las mitocondrias, tras la incubación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

En el histograma se muestran los resultados cuantificados mediante análisis densitométrico de la fluorografía.



4.3) Estimulación por poliaminas.

4.3.1) Efecto de la espermidina y espermina en función de la concentración

Para caracterizar el papel desempeñado por la espermidina en el importe de pOCT se determinó si el efecto estimulador observado era función de su concentración en el medio y también si otras poliaminas relacionadas con ella estimulaban igualmente el transporte.

Se comprobó que un aumento en la concentración de espermidina en el medio en el rango de 0.2 a 4 mM produjo un incremento tanto en la unión como en el transporte del precursor. (Figura 28 , pocillos 3-6), encontrándose estas concentraciones dentro del rango fisiológico (186). Sin embargo cuando la espermidina se adicionó al medio a una concentración final de 20 mM se produjo una total inhibición del transporte, aunque en estas condiciones se produjo la máxima unión del precursor (fig 28, pocillo 7).

Se ensayó en las mismas condiciones la espermina, otra poliamina relacionada con la espermidina, y se comprobó que también ejercía un efecto estimulador sobre la unión y el importe de pOCT en función de su concentración en el medio.

Cuando la espermina se adicionó al medio a una concentración final de 0.2 a 1 mM, se produjo un aumento en la unión e importe del precursor (fig. 28 pocillos 8-10). Cuando se adicionó a 4mM, que ya se encuentra por encima de la concentración fisiológica, no se produjo transporte, aunque en estas condiciones se detectó la máxima unión del precursor (fig. 28 pocillo 11). Cuando se adicionó al medio a 20 mM se inhibió por completo tanto la unión como el importe del precursor (figura 28,pocillo 12).

Hay que tener en cuenta que las concentraciones de poliaminas consideradas corresponden a las adicionadas al medio y que el lisado de reticulocitos presente en el medio de incubación contiene por término medio, espermidina (0.45 mM) y espermina (0.042 mM) (186).

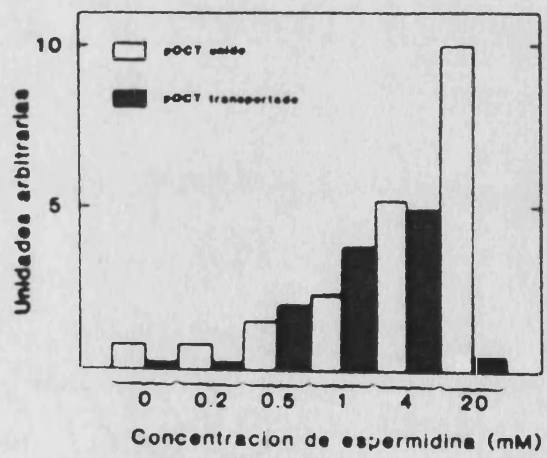
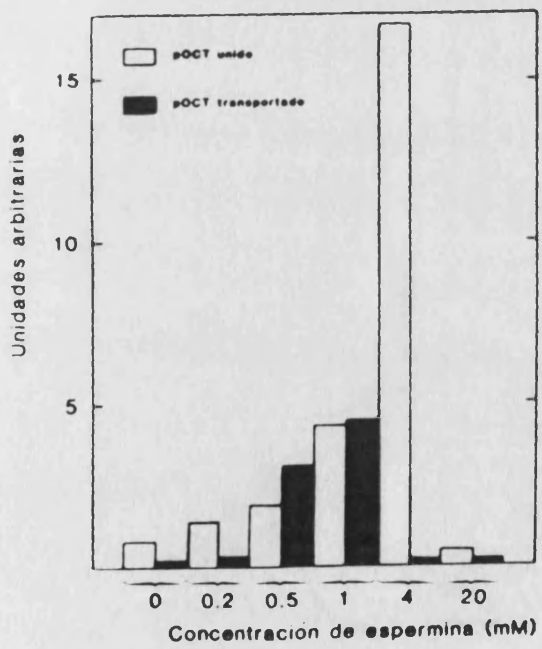
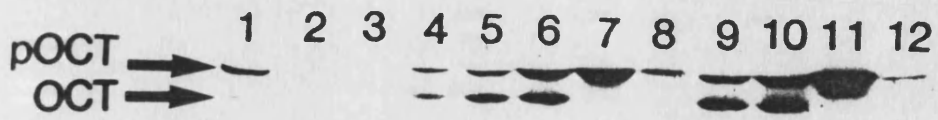
FIGURA 28

Efecto de la espermidina y la espermina en función de la concentración

Se determinó el efecto estimulador de las poliaminas espermidina y espermina, incubando 2 μ l de la síntesis dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 35,000 cpm), con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína), en presencia de 0.2 a 20 mM espermidina (pocillos 3-7) y de espermina 0.2-20 mM (pocillos 8 -12).

La fluorografía corresponde a los productos asociados a la mitocondria tras la incubación, analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

Los histogramas representan la estimulación producida por ambas poliaminas, tanto sobre la unión como sobre el transporte del precursor, cuantificada mediante análisis densitométrico de la fluorografía.



Ya que el lisado de reticulocitos presente en el medio de incubación representa 1/5 del volumen total, la concentración de espermidina y espermina aportada por el lisado es 0.09 mM y 8.4 μ M respectivamente.

4.3.2) Otras poliaminas

Se determinó si la ornitina y la putrescina, precursores en la biosíntesis de la espermidina y la espermina ejercían también algún efecto estimulador sobre el transporte de pOCT a concentraciones dentro del rango fisiológico. También se ensayó la L-carnitina, otra poliamina no relacionada con las anteriores.

La putrescina estimuló el transporte a todas las concentraciones ensayadas, siendo máximo a 20 mM (fig. 29 pocillos 1-3). La L-ornitina y la L-carnitina sin embargo, no estimularon el transporte a ninguna de las concentraciones ensayadas, a pesar de estar en el rango fisiológico (Fig. 29 pocillos 4-6 y 7-9, respectivamente).

4.3.3) Espermidina en presencia de iones magnesio

Se han descrito muchos procesos biológicos en los que tanto las poliaminas como los iones magnesio ejercen un efecto regulador en función de la concentración (187,188). Puesto que las poliaminas y los iones magnesio estimulan el transporte de pOCT se determinó el efecto que ejercían conjuntamente sobre este proceso. Los resultados obtenidos indican que la presencia de iones magnesio en el medio de incubación inhibía el efecto estimulador de la espermidina sobre el importe de pOCT, observándose también una disminución en la unión del precursor a la mitocondria en estas condiciones (Fig. 30, pocillos 3 y 4).

La inhibición se observó tanto en presencia de 1.5 mM acetato magnésico, que por sí solo muestra un efecto estimulador sobre el transporte (Fig. 30, pocillo 9), como de 0.75 mM que lo hace en mucha menor medida (Fig. 30, pocillo 10).

FIGURA 29

Efecto ejercido por otras poliaminas

Se estudió el efecto que ejercen otras poliaminas sobre el transporte de pOCT, llevando a cabo el transporte incubando 2 μ l de la síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT (\approx 40,000 cpm), con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína), en presencia de putrescina 10-30 mM (pocillos 1-3), L-ornitina 10-30 mM (pocillos 4-6) y L-carnitina (pocillos 7-9).

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%)-SDS.



FIGURA 30

Efecto de la espermidina en presencia de iones magnesio

Se estudió el efecto producido sobre el transporte de pOCT, en presencia espermidina e iones magnesio simultáneamente. Para ello se incubó el precursor recién sintetizado (2 μ l, \approx 35,000 cpm), con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína), en presencia de 1 mM espermidina, y 1.5 mM acetato magnésico (pocillo 3) y de 1 mM espermidina y 0.75 mM acetato magnésico (pocillo 4). Como control se incubó en presencia de espermidina de 1, 2 y 4 mM (pocillos 5-7), y de acetato magnésico 3, 1.5 y 0.75 mM (pocillos 8-10). También como control se utilizó una incubación en presencia de 1 mM espermina (pocillo 2).

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



pOCT
OCT



4.3.4) Efecto de la espermina en ausencia de lisado de reticulocitos

Se determinó que la espermina adicionada al medio, en ausencia de lisado de reticulocitos estimulaba el transporte de pOCT a mitocondrias aisladas con la misma eficiencia que en presencia del lisado. Este efecto estimulador también fué dependiente de la concentración ya que cuando se adicionó a una concentración final de 4 mM se inhibió el transporte, al igual que ocurre cuando se adiciona en presencia de lisado (figura 31).

5) TRANSPORTE EN PRESENCIA DE EXTRACTO CITOSOLICO DE HIGADO DE RATA.

5.1) Uso de un extracto citosólico como medio de transporte

Se estudió si el precursor de la OCT podía ser transportado a mitocondrias aisladas en un medio constituido por un extracto citosólico de hígado de rata, en sustitución del lisado de reticulocitos, lo cual permitiría estudiar esta etapa en un medio más fisiológico.

Se obtuvo un sobrenadante postmitocondrial de hígado de rata, tal como se describe en métodos y se llevó a cabo el transporte del precursor en las condiciones habituales, pero sustituyendo el lisado de reticulocitos por el extracto citosólico.

Se comprobó que el precursor de la OCT era transportado a la mitocondria en presencia del sobrenadante postmitocondrial de un modo tan eficiente como lo era en presencia de lisado de reticulocitos. El rendimiento del transporte era comparable al obtenido utilizando el lisado de reticulocitos, tal como se observa en la figura 32.

FIGURA 31

Efecto de la espermina en ausencia de lisado de reticulocitos

Se determinó el efecto que ejercía la espermina sobre el transporte de pOCT, en ausencia de lisado de reticulocitos. Para ello se incubó el precursor recién sintetizado (2 μ l, \approx 35,000 cpm), con mitocondrias (400 μ g de proteína), en presencia de 1 y 4 mM espermina (pocillos 1 y 3 respectivamente) y en presencia de lisado dializado (2.9 mg de proteína) junto a 1 y 4 mM espermina (pocillos 2 y 4 respectivamente).

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

1 2 3 4 5



← pOCT
← OCT

FIGURA 32

Uso de un extracto citosólico como medio de transporte

Se determinó si un extracto citosólico de hígado de rata, era tan eficiente como medio de transporte, como lo era el lisado de reticulocitos, utilizado normalmente en los estudios de transporte.

Para ello se incubó el precursor recién sintetizado, (2 μ l, \approx 50,000 cpm) en presencia de 10, 20 y 30 μ l de este extracto citosólico (50 mg/ml de proteína), en presencia del medio de traducción, para llevar a cabo un ensayo de transporte (pocillos 5-7). Como control, se incubó en presencia de 10, 20 y 30 μ l de lisado de reticulocitos (145 mg/ml de proteína) (pocillos 2-4). En el pocillo 1 se muestra una alícuota de la síntesis "in vitro".



5.2) Requerimientos del transporte

5.2.1) Efecto de la mezcla de traducción.

Se comprobó que el sobrenadante postmitocondrial requería la presencia de los componentes de la solución de traducción para que tuviera lugar el transporte de pOCT, al igual que ocurría con el lisado de reticulocitos, (figura 33).

En ausencia de la solución de traducción se produce la unión del precursor a la mitocondria pero el transporte no se produce. Este sólo tiene lugar cuando se añade también al medio la solución de traducción.

5.2.2) Efecto de las poliaminas

Ya que el sobrenadante postmitocondrial podía sustituir al lisado de reticulocitos en el medio de transporte y mostraba los mismos requerimientos que aquel, se ensayó si en su presencia las poliaminas también mostraban un efecto estimulador sobre el transporte de pOCT.

La espermidina a concentraciones dentro del rango fisiológico (1-4 mM) estimuló tanto la unión como el transporte de pOCT en presencia del extracto citosólico (fig. 34 pocillos 3,4 y 5).

Este efecto estimulador también lo mostró la espermina a una concentración 1mM (fig. 34, pocillo 6), aunque a concentraciones superiores (2 y 4 mM) sólo favoreció la unión del precursor sin que tuviera lugar el transporte (pocillos 7 y 8 respectivamente). En ausencia de poliaminas la unión del precursor fué mucho menor y no se produjo transporte.

5.3) Caracterización parcial de los factores requeridos para el transporte

Puesto que el extracto citosólico podía sustituir

FIGURA 33

Requerimiento del medio de traducción al utilizar un extracto citosólico

Se determinó si se requería el medio de traducción cuando se utilizaba el sobrenadante postmitocondrial de hígado de rata, tal como sucede con el lisado de reticulocitos.

Para ello se realizó un ensayo de transporte en el que se incubó el precursor recién sintetizado (2 μ l, 50,000 cpm), con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína) , con extracto citosólico de hígado de rata (1.25 mg de proteína) en ausencia (pocillo 2) y presencia (pocillo 1), de medio de traducción.

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

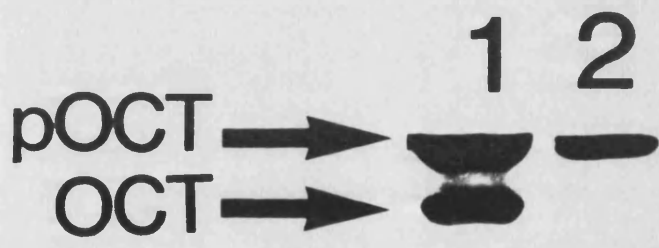


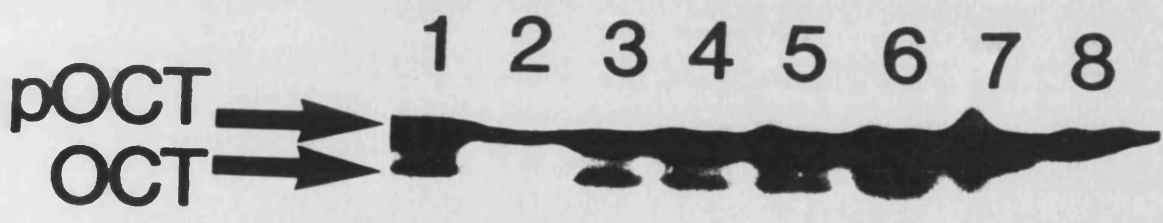
FIGURA 34

Efecto de las poliaminas sobre el transporte de pOCT, llevado a cabo en presencia de extracto citosólico

Se estudió si las poliaminas, mostraban un efecto estimulador, también en presencia del sobrenadante postmitocondrial. Para ello se incubó el precursor recién sintetizado (2 μ l, \approx 50,000 cpm) con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína), con sobrenadante postmitocondrial (1.25 mg de proteína), en presencia de 1, 2 y 4 mM espermidina, (pocillos 3-5) y de 1, 2 y 4 espermina (pocillos 6-8).

Como control se incubó con sobrenadante postmitocondrial en presencia del medio de traducción completo (pocillo 1). En el pocillo 2 se muestra la incubación con sobrenadante postmitocondrial, en ausencia del medio de traducción.

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.



al lisado de reticulocitos en el medio de incubación estimulando el transporte con la misma eficiencia que aquél, se trató de caracterizar el factor(es) que eran requeridos para que se produjera la estimulación.

El extracto se sometió a tratamiento con tripsina, con RNasa y a una incubación a 100 °C durante 3 minutos. Se comprobó que el tratamienor con tripsina y con RNasa, inhibía por completo el efecto estimulador sobre el transporte (fig 35 pocillos 2 y 4). El tratamiento a 100 °C, sin embargo, no alteró el efecto estimulador del transporte (fig. 35 pocillo 3).

Cuando se fraccionó con sulfato amónico el sobrenadante postmitocondrial, se comprobó que sólo se producía el transporte en presencia del sobrenadante no precipitado a un 80 % de saturación (fig. 36 pocillo 3).

6) ESTUDIO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE pOCT A LA MITOCONDRIA

6.1) Transporte en presencia de apocitocromo c: competencia por la entrada.

Aunque las evidencias actuales sugieren la existencia de receptores para los precursores citosólicos en la superficie de la mitocondria, se desconocen hasta el momento sus características concretas. Por ejemplo no se ha podido determinar con certeza si los receptores son comunes a todos los precursores o si existen receptores específicos para grupos de precursores con características comunes.

Algunos experimentos de competencia por la entrada a la mitocondria parecían sugerir que el precursor de la OCT compartía la ruta de entrada a la mitocondria con precursores de características similares (116).

Puesto que disponíamos de apocitocromo c, el precursor citosólico del citocromo c se realizó un experimento de competencia por la entrada en la mitocondria entre este precursor y pOCT.

FIGURA 35

Caracterización parcial de los factores presentes en el extracto citosólico, requeridos para el transporte

Se sometió el sobrenadante postmitocondrial a diferentes tratamientos, antes de ser usado como medio de transporte. Así se trató con tripsina 100 µg/ml durante 30 min, a 30 °C, inhibiendo finalmente la reacción con 200 µg/ml de inhibidor de tripsina aislado de soja (pocillo 2). También se trató a 100 °C, 3 min (pocillo 3) y con 80,000 unidades de RNAsa/ml (pocillo 4). Como control se incubó en presencia de extracto citosólico completo (pocillo 1).

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-S DS.

1 2 3 4



FIGURA 36

Fraccionamiento del extracto citosólico con sulfato amónico

El sobrenadante postmitocondrial se fraccionó con sulfato amónico, y se ensayó el efecto estimulador de cada una de las fracciones obtenidas, en presencia del medio de traducción. Así se incubó el precursor recién sintetizado ($2 \mu\text{l}$, $\approx 50,000$ cpm) con mitocondrias aisladas ($400 \mu\text{g}$ de proteína), en presencia la fracción precipitada a 40% de saturación (pocillo 1), a 40-80% (pocillo 2) y el sobrenadante de la precipitación (pocillo 3).

La fluorografía corresponde a las mitocondrias analizadas tras la incubación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

El apocitocromo c a diferencia de la pOCT carece de secuencia señal adicional y su destino final en la mitocondria es la membrana interna.

El apocitocromo c se obtuvo a partir del citocromo c mediante procedimientos físicos y químicos que eliminan el grupo hemo y dan lugar a la apoproteína que se comporta como precursor en un estado funcional (189).

Se incubó una cantidad fija de pOCT con mitocondrias aisladas de hígado de rata, en presencia de un exceso de apocitocromo c no marcado (0.45 mg/ml), en las condiciones habituales de transporte. Como control se llevó a cabo la incubación en presencia de 0.45 mg/ml de citocromo c, que se sabe que no es transportado a la mitocondria.

La presencia en el medio de incubación del apocitocromo c produjo la completa inhibición del transporte de pOCT a la mitocondria (fig. 37, pocillo 3).

En presencia de citocromo c, en lugar de apocitocromo c, el transporte de pOCT no se vió afectado (fig. 37 , pocillo 4 , respectivamente).

El efecto inhibitor del apocitocromo c sobre el transporte de pOCT era dependiente de la concentración a la que se encontraba presente en el medio de incubación, mientras que el citocromo c no produjo inhibición a ninguna de las concentraciones ensayadas (figura 38).

6.3) Transporte a otras mitocondrias

Con el fin de explorar el grado de especificidad del mecanismo de transporte de los precursores de proteínas mitocondriales al interior de las mitocondrias, se llevaron a cabo experimentos de transporte "in vitro" de pOCT a mitocondrias de hígado de paloma, que por ser un animal no ureotélico, sus mitocondrias no contienen OCT. La incubación se llevó

FIGURA 37

Transporte de pOCT en presencia de apocitocromo c

Se realizó un experimento de competencia por la entrada a la mitocondria, incubando 2 μ l del precursor recién sintetizado, con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína), en presencia del medio de traducción, adicionando un exceso de apocitocromo c no marcado (0.45 mg/ml, pocillo 3) y de un exceso de citocromo c no marcado (0.45 mg/ml, pocillo 4), en un volumen final de 120 μ l. En el pocillo 1 se muestra una alícuota de la síntesis "in vitro".

La fluorografía corresponde a los productos asociados a la mitocondria, tras la incubación, analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

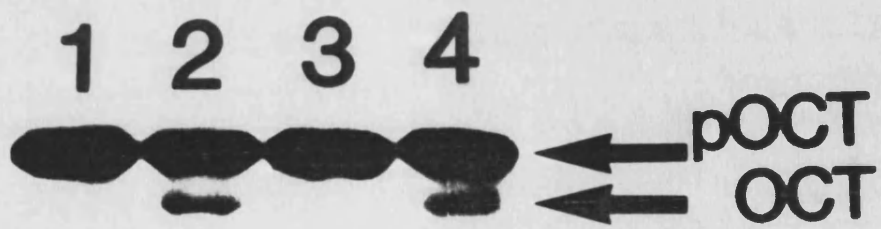


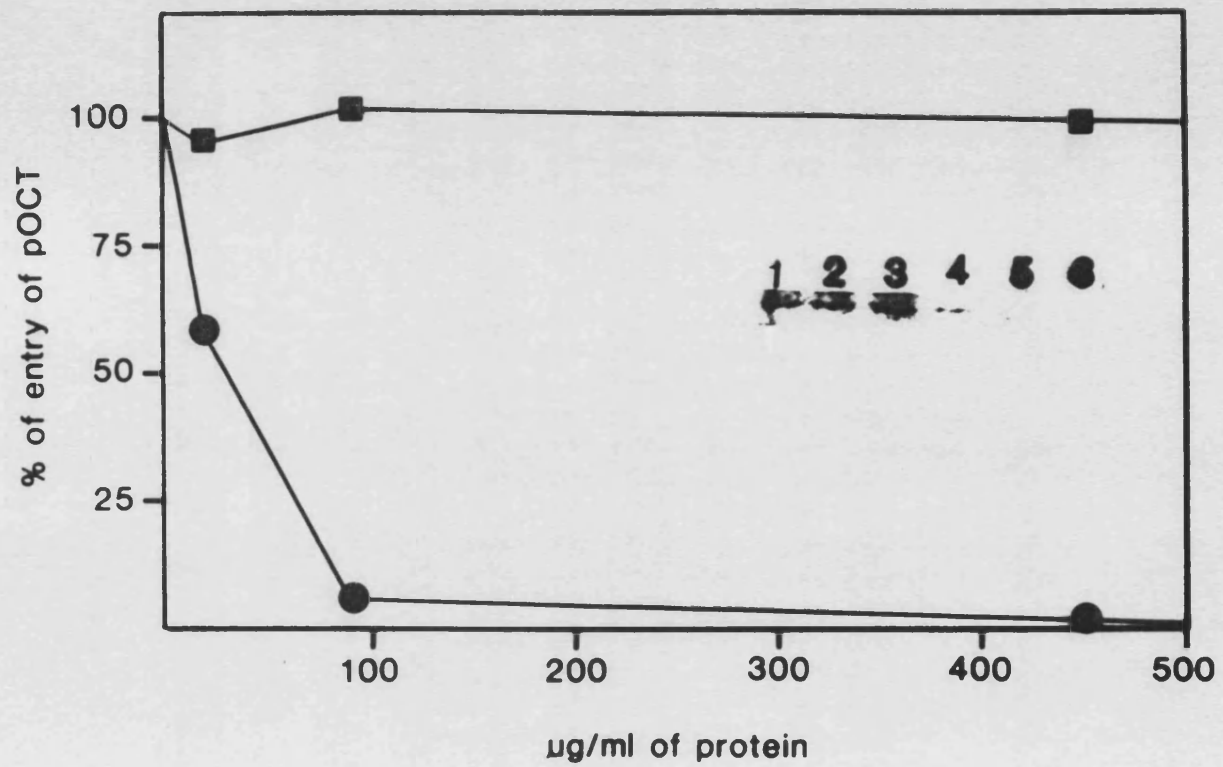
FIGURA 38

Efecto del apocitocromo c en función de la concentración

Se estudió el efecto inhibitor del apocitocromo c a diferentes concentraciones, determinando la cantidad de forma madura asociada a mitocondrias, tras un tratamiento suave con tripsina de las mismas tras la incubación y su posterior análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida(12%)-SDS.

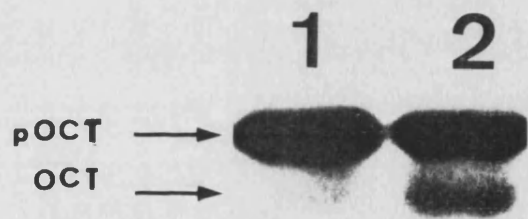
Se incubaron 2 μ l de la síntesis "in vitro" dirigida por el ARNm de pOCT, con mitocondrias aisladas (400 μ g de proteína), en presencia de 0.018, 0.09 y 0.45 mg/ml de citocromo c (pocillos 1-3, respectivamente) y de 0.018, 0.09 y 0.45 mg/ml de apocitocromo c (pocillos 4-6, respectivamente).

La gráfica muestra el transporte de pOCT, determinado cuantificando las bandas correspondientes a la forma madura de OCT, mediante análisis densitométrico de la fluorografía.



a cabo en presencia del medio de traducción en las condiciones habituales.

Se comprobó que el precursor se transportaba a mitocondrias de hígado de paloma, aunque con una eficiencia con ligeramente menor que a mitocondrias de hígado de rata (figura 39).



DISCUSSION

DISCUSION

Los precursores citosólicos de las proteínas mitocondriales son transportados rápidamente a la mitocondria, de tal manera que su vida media en el citosol, en condiciones normales, es inferior a 5 minutos (41). Esto implica que no llega a acumularse en el citosol cantidad suficiente de los mismos como para hacer viable su aislamiento directo a partir de los tejidos. Se tiene que recurrir por lo tanto a métodos indirectos de obtención de estas moléculas precursoras.

En el presente trabajo se ha recurrido a la síntesis del ARNm específico de pOTC de hígado de rata, mediante un sistema de transcripción "in vitro", a partir de su ADNc completo (164). Con el ARNm obtenido se ha sintetizado el polipéptido precursor utilizando un sistema de síntesis de proteínas "in vitro" (172).

El ARNm obtenido por este método, dirige la síntesis de pOTC de un modo eficiente y específico, de tal modo que el polipéptido precursor constituye el único producto de la síntesis, detectado mediante electroforesis y fluorografía. Esto hace innecesario llevar a cabo una etapa adicional de purificación, como ocurre cuando se obtiene a partir de una síntesis dirigida por el ARN total de hígado de rata, donde un precursor específico tiene que ser seleccionado por inmunoprecipitación con el anticuerpo específico entre los productos obtenidos en la síntesis, con rendimientos muy inferiores.

El precursor de la OCT sintetizado por este sistema, es precipitado por un anticuerpo dirigido contra OCT y es funcional, ya que en presencia de mitocondrias aisladas de hígado de rata es transportado y convertido a su forma madura (36 KDa).

Una vez obtenido el precursor, se ha estudiado la etapa de su transporte a la mitocondria, tratando de caracterizar los factores implicados en la misma.

El hecho de que la mayoría de las proteínas mitocondriales sean sintetizadas en el citosol y tengan que ser transportadas a la mitocondria, implica que estos polipéptidos tienen que ser reconocidos por el orgánulo y translocados en, o a través de, las membranas mitocondriales de un modo específico y eficaz.

Esta etapa de transporte puede constituir un factor regulador del nivel de enzimas mitocondriales y su caracterización es de gran interés, no sólo desde un punto de vista básico, sino también porque se han descrito enfermedades hereditarias cuya causa podría ser una deficiencia en el transporte de los precursores citosólicos a la mitocondria (156).

Como todos los procesos biológicos que implican el paso a través de membranas se plantea la cuestión de cómo los polipéptidos son dirigidos específicamente a la mitocondria, y una vez allí, cuál es el mecanismo que permite atravesar la bicapa lipídica de las membranas, asegurando a la vez la correcta localización final de la proteína en el orgánulo.

Con el uso del sistema de síntesis de precursores específicos, utilizado en este trabajo para la obtención de pOCT, se tiene la ventaja adicional de, que al ser el precursor el único producto de la síntesis y obtenerse con una elevada actividad específica, se puede utilizar un pequeño volumen de la síntesis en los estudios de la importación del precursor por las mitocondrias. De este modo el medio de traducción adicionado es prácticamente despreciable y se puede estudiar el efecto de distintos factores adicionándolos al medio por separado.

Se ha descrito que el transporte de pOCT a mitocondrias aisladas requiere la presencia del medio de traducción utilizado para llevar a cabo la síntesis del precursor (120,131). Sin embargo la naturaleza de los factores estimuladores no ha sido bien establecida. Así Miura y col (131) propusieron que eran los iones potasio y magnesio, y un componente del lisado de reticulocitos de naturaleza proteica y de elevada masa molecular, los responsables de este

efecto estimulador. Por su parte, Shore y col (120) consideraron que el factor o factores que estimulaban el transporte, estaban presentes en el lisado de reticulocitos y que se caracterizaban por quedar retenidos cuando el lisado se sometía a una cromatografía en sephadex G-25. Esto les hizo suponer que debía ser una molécula de pequeña masa molecular (< 5,000 daltons), o bien una molécula que quedaba retenida por adsorción inespecífica al sephadex.

En nuestras condiciones experimentales hemos comprobado que, efectivamente, la presencia del medio de traducción completo, es decir el lisado de reticulocitos y la solución de traducción conjuntamente, permite que el transporte del precursor tenga lugar de un modo eficiente. Sin embargo, al caracterizar qué componentes del medio de traducción eran los responsables de este efecto estimulador, los resultados obtenidos demuestran que la espermidina, en presencia del lisado de reticulocitos, estimula el transporte de pOCT, a niveles similares a los obtenidos por incubación de mitocondrias en el medio de traducción completo, siendo ésta la primera vez que se aportan evidencias de que las poliaminas están relacionadas con el transporte "in vitro" de un precursor citosólico a mitocondrias. También los iones potasio y magnesio mostraban un efecto estimulador tal como describieron Miura y col (131).

El efecto estimulador de la espermidina es dependiente de la concentración, siendo máximo dentro del rango de concentraciones fisiológicas (190). El hecho de que la espermina y la putrescina también estimulen el transporte a concentraciones fisiológicas, apoya la posible participación de estas poliaminas alifáticas en el proceso de transporte "in vivo".

Durante los últimos veinte años se ha establecido que las poliaminas espermina y espermidina, son necesarias para muchos de los procesos biológicos fundamentales tales como síntesis de ADN, ARN y proteínas (191). También se ha descrito que estabilizan las membranas mitocondriales (192), probablemente por interacción con los fosfolípidos de membrana, y que tienen un importante papel en la

protección de la fosforilación oxidativa (193,194). Asimismo están implicadas en procesos de transporte de iones a través de las membranas mitocondriales, como es el caso del efecto estimulador del transporte de iones calcio (188) y fosfato (187).

Por otra parte, estas poliaminas están presentes en la mayor parte de los organismos desempeñando múltiples funciones, aunque en la mayoría de los casos el mecanismo de actuación se desconoce por completo. Se ha relacionado en algunas ocasiones la naturaleza anfifílica de estas moléculas con el transporte de cationes a través de membranas (191).

Estaba descrito que en muchos de los procesos biológicos donde las poliaminas desempeñan una función reguladora, también estaban implicados los iones magnesio, habitualmente con un efecto regulador antagónico al de las poliaminas (195).

En el caso del transporte de pOCT a mitocondrias aisladas, hemos comprobado que el efecto estimulador de la espermidina es anulado en presencia de iones magnesio, a concentraciones donde ambos componentes por separado favorecen el transporte.

Es posible que este efecto observado se deba a una competencia por la unión al lugar donde ejercen su efecto estimulador. Así, en la síntesis de proteínas, se ha comprobado que la presencia de espermidina o espermina disminuye la concentración óptima de iones magnesio, y se supone que este efecto es debido a que compiten por la unión al ribosoma. También en el caso del transporte de iones fosfato y de iones calcio a la mitocondria se observa un efecto similar (191). En ambos casos se considera que los iones magnesio y las poliaminas compiten por un sitio de unión a la mitocondria.

El papel que desempeñan las poliaminas en el transporte del precursor de la OCT a mitocondrias aisladas no podemos determinarlo con los datos que poseemos actualmente, aunque se puede especular con cierto fundamento, a cerca de su participación en el importe del precursor de la OCT, a la vista de las propiedades de estas moléculas y de los datos de que

se dispone sobre el transporte del precursor.

Por otra parte, en la actualidad se considera muy probable que para que las proteínas sean transportadas a través de membranas, los polipéptidos deben tener una conformación extendida (107).

En el caso de las proteínas de secreción esto podría lograrse gracias a que el extremo amino-terminal de las cadenas nacientes se une a la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), quedando unida por el extremo c-terminal al ribosoma (72). Esto impediría que el polipéptido se plegara a su conformación definitiva antes de ser transportado al retículo endoplásmico.

En el caso de los precursores citosólicos de las proteínas mitocondriales hay evidencias de que éstos se encuentran en una conformación diferente a la de sus correspondientes formas maduras, y que se requiere que se encuentren (al menos parcialmente) desplegados, para que tenga lugar la translocación (109). Ya que la mayoría de los precursores contienen una secuencia amino-terminal adicional, se ha considerado, que entre otras funciones, podría favorecer el mantenimiento de esta conformación extendida.

Ohta y Schatz (132) describieron un factor citosólico que estimulaba el transporte del precursor de la subunidad β de la F_1 -ATPasa de levadura a mitocondrias aisladas. Las pruebas bioquímicas realizadas indicaban que tenía un carácter proteico, sin embargo los autores indicaron que no se podía descartar la posibilidad de que fuera una molécula de bajo peso molecular, unida o estabilizada por ella, la responsable del efecto observado. Consideran que su posible papel podría ser estabilizar la conformación del precursor haciéndolo competente para el transporte.

El hecho de que las poliaminas, "in vivo", se encuentren asociadas con frecuencia a proteínas, sugiere que podrían favorecer el mantenimiento de una conformación desplegada del precursor asociándose directamente con él, o bien estabilizando una proteína

que pudiera contribuir a este efecto estabilizador.

Otro posible papel de las poliaminas podría ser mantener el potencial electroquímico a través de la membrana interna, que parece requerirse para el importe del pOCT, así como para la mayoría de los precursores de las proteínas de la matriz y de la membrana interna.

Aunque no se sabe con exactitud qué etapa del proceso requiere el potencial de membrana, sí parece haberse demostrado en algunos casos, que es la translocación del extremo amino-terminal del polipéptido precursor, la etapa que necesita esta energía. Una vez esta parte de la molécula ha atravesado la membrana, el resto del polipéptido es translocado sin necesidad de que se establezca el potencial de membrana.

Se ha descrito que la espermina requiere una membrana interna energizada para ser transportada al interior de la mitocondria. En ausencia de un potencial de membrana se une a la mitocondria pero no se transporta (188). Por tanto una posibilidad a tener en cuenta es que este potencial pudiera requerirse, entre otras cosas, para favorecer la entrada de las poliaminas, que a su vez, estimularían la translocación del precursor. No se puede descartar que el efecto estimulador observado se deba, al menos en parte, a una estabilización del potencial de membrana, favoreciendo así el transporte.

El hecho de que en algunas ocasiones se haya relacionado la naturaleza anfifílica de las poliaminas con su participación en el transporte de iones a través de membranas (191), llama la atención sobre el hecho de que en los últimos años se ha determinado que la secuencia señal de la mayoría de los precursores citosólicos, adopten una conformación en α -hélice, de naturaleza anfifílica, en presencia de los fosfolípidos de membrana (51). La semejanza estructural entre las poliaminas y la secuencia señal podría ser un factor importante en el estímulo observado por parte de las poliaminas.

Otro aspecto interesante a tener en cuenta, es el hecho de que, recientemente se ha propuesto que los precursores podrían ser transportados al interior de la mitocondria a través de sitios de contacto establecidos entre ambas membranas mitocondriales (128). Desde hace ya algún tiempo, se ha descrito la existencia de zonas de contacto entre ambas membranas por observaciones realizadas mediante microscopía electrónica. No se conoce con exactitud qué es lo que origina la formación de estas zonas de contacto, pero se ha asociado normalmente a los diferentes estados de energización de la membrana interna.

Los autores que han descrito esta posible vía de entrada de los precursores defienden, sin embargo, que estos sitios de contacto no parecen requerir la existencia de un potencial de membrana. No obstante, sí se ha descrito que las poliaminas provocan la asociación de ambas membranas mitocondriales (196). Por tanto, un posible papel de las poliaminas, podría ser favorecer la formación de estos sitios de contacto, que permitirían el paso de los precursores a través de ambas membranas.

También se ha descrito, que hay componentes de naturaleza proteica en la superficie mitocondrial, que son necesarios para la unión y/o translocación de los precursores. Puesto que las poliaminas se asocian a proteínas de membrana, tanto por interacciones electrostáticas como por unión covalente catalizada por transaminasas, éste podría ser otro posible papel de las poliaminas.

Otra función propuesta para las poliaminas, es la de la estabilización de la estructura membranosa por unión a fosfolípidos de la misma membrana.

Por otra parte, el hecho de que se haya expresado la pOCT en E. coli, y se haya logrado transportar el precursor a mitocondrias aisladas de hígado de rata en un sistema constituido por un extracto bacteriano, sugiere que los factores necesarios para su importe se encuentran presentes en bacterias. Puesto que las poliaminas son compuestos presentes en la mayoría de los seres vivos, podrían ser los responsables de que

los precursores puedan ser transportados en un sistema heterólogo carente de mitocondrias.

En relación con las observaciones realizadas en estudios de transporte "in vitro", donde siempre permanece una proporción del precursor sin ser transportado a la mitocondria, podría deberse a que en estas condiciones no se mantiene la conformación adecuada para favorecer este proceso.

En este sentido, hemos comprobado, que en nuestras condiciones experimentales, siempre se observa que hay un porcentaje elevado del precursor, que aunque se une a la mitocondria, no es transportado a su interior.

En nuestro sistema de transporte, este hecho no parece debido a que la mitocondria sea un factor limitante, ya que la presencia de mayores cantidades de mitocondrias, no aumenta la eficiencia del transporte observado.

Por otra parte, también hemos comprobado, que los factores que estimulan el transporte, tampoco parecen resultar limitantes, puesto que un medio ya utilizado, puede sustentar el transporte de nuevo precursor añadido.

Todas las evidencias de que disponemos, apuntan a que, incluso en presencia de los factores que estimulan el transporte, permanece una gran proporción del precursor sin ser transportado a la mitocondria, sugiriendo que es alguna característica propia del precursor la responsable de este hecho. Esto parece confirmarlo, asimismo, la observación de que el precursor almacenado a -80°C no es transportado, a pesar, de que no parece haber sufrido una alteración en su tamaño. Esto podría indicar, que en estas condiciones, ha adquirido una conformación, que le impide transportarse eficientemente.

En relación con el nivel de especificidad del sistema(s) receptor de las mitocondrias, para los diferentes precursores de proteínas, nuestros resultados demuestran, que el apocitocromo c, compete

con pOCT por la entrada a mitocondrias aisladas de hígado de rata, lo que parece sugerir, que ambos precursores comparten una ruta común para su importe a la mitocondria.

Actualmente no se sabe con certeza, si los receptores de membrana son generales para todos los precursores citosólicos, o si hay, receptores específicos para grupos de precursores relacionados. Nuestros resultados apoyan la existencia de un mecanismo general de reconocimiento y transporte para los precursores, aunque no se puede descartar, que haya factores adicionales, que "in vivo" favorezcan la entrada de determinados precursores en la mitocondria. Hemos comprobado, que en nuestras condiciones, pOCT es transportado a mitocondrias de órganos donde la OCT no está presente, apoyando, igualmente, la idea de un mecanismo general de transporte.

Por otra parte, en un intento de que el transporte "in vitro", tuviera lugar en condiciones lo más fisiológicas posibles, hemos ensayado este proceso, sustituyendo los lisados de reticulocitos que constituyen el medio habitual de transporte, por sobrenadante post-mitocondrial (PMS) de hígado de rata,

Hemos comprobado que este extracto citosólico es tan eficiente como el lisado de reticulocitos. Miura y col (131), indicaron, que no habían logrado el transporte de pOCT en presencia de extracto citosólico, si bien, consideraron, que tal vez en la obtención del mismo, se había perdido el factor necesario para estimular el proceso, o había un inhibidor presente.

Nosotros hemos comprobado que cuando se utiliza PMS, se requiere la presencia de la mezcla de traducción para que tenga lugar el transporte, al igual que ocurre con el lisado de reticulocitos.

Al tratar de caracterizar los componentes del lisado y del PMS que se requieren para estimular el transporte, hemos comprobado que en el caso del lisado parece ser sensible a tripsina y a 100 °C 3', mientras

que en el PMS, parece sensible a RNasa y a tripsina. Cuando se fraccionan con sulfato amónico, en ambos casos, la máxima actividad estimuladora se obtiene en el sobrenadante de la precipitación. Nosotros consideramos que es necesario profundizar más en la caracterización de estos posibles factores, pues existe la posibilidad de que sean, al menos en parte, artefactos de los tratamientos.

Se ha descrito, que la presencia de péptidos pequeños producidos por un tratamiento con tripsina, puede producir un colapso en el potencial de membrana. Como consecuencia de ello podría inhibirse el transporte que depende de este potencial (130).

También se ha descrito recientemente, que existe una inhibición en el transporte de precursores citosólicos, al tratar el lisado de reticulocitos con RNasa (135). Los autores demuestran, que es un efecto debido a la presencia de ribonucleotidos, que se asocian a la membrana bloqueando el potencial de la misma, o que posiblemente se asocian a los precursores, impidiendo su importación. En cualquier caso, consideran que la inhibición observada es debida a un efecto inespecífico, más que a la degradación de un factor esencial para el transporte.

Asimismo, el hecho de que la espermina, en ausencia de otros factores adicionales, pueda estimular el transporte, sugiere que podría ser el componente aportado por los lisados y el PMS, o bien que estos hipotéticos factores no serían absolutamente necesarios, ya que en su ausencia la espermina puede sustentar el transporte.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Se ha clonado el ADNc que codifica el precursor de la ornitina transcarbimalasa (pOCT) en el sistema de transcripción "in vitro" SP6, lo que ha permitido sintetizar el ARNm específico de pOCT.

2.- Se ha sintetizado pOCT en un sistema de síntesis de proteínas "in vitro" de lisado de reticulocitos, constituyendo el único producto detectado mediante electroforesis y posterior fluorografía, en cantidad suficiente para poder realizar estudios sobre su transporte a la mitocondria.

3.- El precursor sintetizado es transportado al interior de mitocondrias aisladas de hígado de rata, donde es convertido a su forma madura.

4.- El estudio de las condiciones requeridas en el medio de incubación para que tenga lugar el transporte de este precursor, demuestran que:

- las poliaminas espermidina, espermina y putrescina estimulan el transporte del precursor de la OTC a mitocondrias aisladas, siendo la primera vez que se relacionan estas poliaminas biológicas con el transporte de precursores citosólicos a la mitocondria.

- es posible utilizar un extracto citosólico de hígado de rata como medio de incubación, constituyendo un medio más fisiológico.

- el apocitocromo c compete con pOCT por la entrada a mitocondrias aisladas, lo que sugiere que ambos precursores, a pesar de presentar características muy diferentes, comparten el sistema de transporte a la mitocondria.

- se ha comprobado que pOCT es importado a mitocondrias aisladas de hígado de paloma, un animal no ureotélico, que carece de OCT, lo cual apoya la idea de un sistema general de transporte para los precursores de las proteínas mitocondriales.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Suissa, M. and Schatz, G. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43: 51-58
- 2) Schatz, G. and Butow, R. A. (1983) Cell 32: 316-318
- 3) Tzagoloff, A. Mitochondria. New York, Ed Plenum Press (1982)
pp 261-263
- 4) Wallace, D. C. (1982) Microbiol. Rev. 46: 208-240
- 5) Anderson, S., Bankier, A. T., Barrel, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. and Young, I. G. (1981) Nature 290: 457-465
- 6) Grivell, L. A., Reijnders, L. and De Vries, H. (1971) FEBS Lett. 16: 159-163
- 7) Terpstra, P., Zanders, E. and Butow, R. A. (1979) J. Biol. Chem. 254: 653-661
- 8) Marzuki, S. and Hibbs, A. R. (1986) Biochim. Biophys. Acta 866: 120-124
- 9) McLean, J. R., Cohn, G. L. Brandt, I. K. and Simpson, M. V. (1958) J. Biol. Chem. 233: 657-663
- 10) Neupert, W., Brdiczka, D. and Bücher, Th. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27: 488-493
- 11) Mahler, H. R. and Perlman, P. S. (1971) Biochemistry 10: 2977-2990
- 12) Poyton, R. D. (1980) Curr. Top. Cell. Regul. 17: 231-295
- 13) Tzagoloff, A. and Myers, A. M. (1986) Ann.

Rev. Biochem. 55: 249- 285

14) Tzagoloff, A., Macino, G. and Sebald, W.
(1979) Ann. Rev. Biochem. 48: 419-444

15) Kellems, R. E. and Butow, R. A. (1972) J.
Biol. Chem. 247: 8043-8050

16) Kellems, R. E. Allison, V. F. and Butow,
R. A. (1974) J. Biol. Chem 249: 3297-3303

17) Kellems, R. E. and Butow, R. A. (1974) J.
Biol. Chem. 249: 3304-3310

18) Kellems, R. E., Allison, V. F. and Butow,
R. A. (1975) J. Cell. Biol. 65: 1-14.

19) Ades, I. Z. and Butow, R. A. (1980) J.
Biol. Chem. 255: 9925-9935

20) Kreil, G. (1981) Annu. Rev. Biochem. 50:
317-348

21) Suissa, M. and Schatz, G. (1982) J. Biol.
Chem. 257: 1348-1355

22) González-Cadavid, N. F. and Sáez de Cordova,
C. (1974) Biochem. J. 124: 685-694

23) Chua, N. H. and Schmidt, G. W. (1979) J.
Cell. Biol. 81: 461-483

24) Godinot, C. and Lardy, H. A. (1973)
Biochemistry 12: 2051-2060

25) Kawajiri, K., Harano, T. and Omura, T. (1977)
J. Biochem. 82: 1403-1416

26) Kawajiri, K., Harano, T. and Omura, T. (1977)
J. Biochem. 82: 1417-1423

27) Shore, G. C. (1979) J. Cell. Sci. 38:
137-153

28) Cascarano, J., Montisano, D. F., Pickett, C.

B. and James, T. W. (1982) Exp. Cell Res. 139: 39-50

29) Schmelzer, E. and Heinrich, P. C. (1980) J. Biol. Chem. 255: 7503-7506

30) Northemann, W. Schmelzer, E. and Heinrich, P. C. (1981) Eur. J. Biochem. 119: 203-208

31) Hay, R., Böhni, P. and Gasser, S. (1984) Biochim. Biophys. Acta 779: 65-87

32) Raymon and Shore, G (1979) J. Biol. Chem. 254: 9335-9338

33) Zimmermann, R., Paluch, V., Sprinzl, M. and Neupert, W. (1979) Eur. J. Biochem. 99: 247-252

34) Borst, P. and Grivell, L. A. (1978) Cell 15: 705-723

35) Schatz, G. (1968) J. Biol. Chem. 243: 2192-2199

36) Schatz, G, Groot, G. S. P., Mason, T. L., Rouslin, W., Wharton, D. C. and Saltzgaber, J. (1972) Fed. Proc. 31:21-29

37) Poyton, R. O. and Kavanagh, J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73: 3947-3951

38) Barath, Z. and Küntzel, H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1371-1374

39) Abraham, A. K., Vedeler, A., Reistad, R. and Phil, A. (1981) Exp. Cell. Res. 132: 265-272

40) Maccechini, M. L., Rudin, Y., Blobel, G. and Schatz, G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 343-347

41) Felipo, V. and Grisolia, S. (1984) Curr. Top. Cell. Regul. 23: 217-249

42) Ohashi, A. and Schatz, G. (1980) J. Biol. Chem. 255: 7740-7745

43 Thirunavukkarasu, C., Meenakshi, S. and Rajamanickam, C. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 218: 163-168

44) Gellissen, G., Bradfield, J. Y., White, B. N. and Wyatt, G. R. (1983) Nature 301: 631-634

45) Van den Boogaart, P., Samallo, J. and Agsteribbe, E. (1982) Nature 298: 187-189

46) Wright, R. M. and Cummings, D. J. (1983) Nature 302: 86-89

47) Lonsdale, D. M., Hodge, T. P., Howe, C. J. and Stern, D. B. (1983) Cell 34: 1007-1014

48) von Heijne, G. (1986) FEBS Lett. 198: 1-4

49) Colman, A. and Robinson, C. (1986) Cell 46: 321-32

50) Roise, D., Horvath, S. J., Tomich, J. M. Richards, J. H. and Schatz, G. EMBO J. 5: 1327-1334.

51) von Heijne, G. (1986) EMBO J. 5: 1335-1342

52) Hurt, E. C., Pesold-Hurt, B. and Schatz, G. (1984) FEBS Lett. 178: 306-310

53) Horwich, A. L., Kalousek, F., Fenton, A. W., Pollock, R. A. and Rosenberg, L. (1986) Cell 44: 451-459

54) van Loon, P.G.M., Brändli, A. W. and Schatz, G. (1986) Cell 44: 801-812

55) Hurt, E. C., Müller, V. and Schatz, G. (1985) EMBO J. 4: 2061-2068

56) Zimmermann, R. and Neupert, W. (1980) Eur. J. Biochem. 109: 217-229

57) Gasser, S.M. and Schatz, G. (1983) J. Biol.

Chem. 258: 3427-3430

58) Hase, T., Riezman, H., Suda, K., and Schatz, G. (1983) EMBO J. 2: 2169-2172

59) Hase, T., Müller, V., Riezman, H. and Schatz, G. (1984) EMBO J. 3: 3157-3164

60) Hurt, E. C., Müller, V., and Schatz, G. (1985) EMBO J. 4: 3509-3518

61) Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T. and Adesnik, M. (1982) J. Cell. Biol. 92 :1-22

62) Matsuura, S., Arpin, M., Hannum, Ch., Margoliash, E., Sabatini, D. and Morimoto, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4368-4372

63) Palade, G. (1975) Science 189: 347-358

64) Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) J. Cell. Biol. 67: 835-851

65) Milstein, C., Browlee, G. G., Harrison, T. M., Mathews, M. D. (1972) Nature 239:117-120

66) Schechter, I. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2256-2260

67) Perlman, D. and Harlvorson, O. (1983) J. Mol. Biol. 167: 391-409

68) von Heijne, G. (1983) Eur. J. Biochem. 133: 17-21

69) Walter, P. and Blobel, G. (1981) J. Cell. Biol. 91: 557-561

70) Meyer, D. I., Krause, E. and Dobberstein, B. (1982) Nature 297: 647-650

71) Walter, P. and Blobel, G. (1982) Nature 299: 691-698

72) Blobel, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1496-1500

- 73) Palmiter, R. D., Gagnon, K. A., Walsh (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 94-98
- 74) Braell, W. A. and Lodish, H. F. (1982)
Cell 28: 23-31
- 75) Hortsch, M. and Meyer, D. I. (1984) Biol.
Cell. 52: 1-8
- 76) von Heijne, G. and Blomberg, C. (1979) Eur.
J. Biochem. 97: 175-181
- 77) Wickner, W. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48:
23-45
- 78) Engelman, D. M. and Steitz, T. A. (1981)
Cell 23: 411-422
- 79) Singer, S. J., Maher, P. A. and Yaffe, M.
P. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:
1960-1964
- 80) Singer, S. J., Maher, P. A. and Yaffe, M.
P. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:
1015-1019
- 81) Ferro-luzzi, A. G. (1986) Ann. Rev.
Biochem. 55:397-425
- 82) Michaelis, S. and Beckwit, J. (1982) Ann.
Rev. Microbiol. 26: 435-465
- 83) Shiba, K., Ito, K., Yura, T. and Cerretti, D.
P. (1984) EMBO J. 3:631-635
- 84) Wolfe, P. B., Rice, M. and Wickner, W.
(1985) J. Biol. Chem. 260: 1836-1841
- 85) Wickner, W. and Lodish, H. F. (1985)
Science 230: 400-407
- 86) Kadonaga, J.C., Gautier, A.E., Strauss, D.R.,
Charles, A.D., Edge, M .E. and Knowles, J.R. (1984)
J. Biol. Chem. 259: 2149-2154

- 87) Stader, J., Benson, S. A. and Silhavy, T. J. (1986) J. Biol. Chem. 261: 15075-15080
- 88) Moreno, F., Fowler, A.V., Hall, M., Silhavy, T.J., Irving, Z. and Schar tz, M (1980) Nature 286: 356-359
- 89) Benson, S. A. and Silhavy, T. J. (1983) Cell 32:1325-1335
- 90) Cover, W. H. and Randall, L. L. (1987) J. Bacteriol. 169:1794-1800
- 91) MacIntyre, S. H., Freudl, R., Degen, M., Hidennach, I., and Henning, U . (1987) J. Biol. Chem. 262: 8416-8422
- 92) Randall, L. L. (1983) Cell 33: 231- 240
- 93) Wolfe, P. B., Wickner, W., and Goodman, J. M. (1983) J. Biol. Chem. 258: 12073-12080
- 94) Bakker, E. P. and Randall, L. L. (1984) EMBO J. 3: 895-900
- 95) Chen, L. and Tai, Ph. C. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4284-4388
- 96) Chen, L. and Tai, Ph. C. (1986) J. Bacteriol. 168: 828-832
- 97) Schmidt, G. W. and Mishkind, M. L. (1986) Ann. Rev. Biochem. 55: 879-912
- 98) Dobberstein, B., Blobel, G. and Chua, N. H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1082-1085
- 99) Mishkind, M. L., Wessler, S. R., Schmidt, G. W. (1985) J. Cell. Biol. 100: 226-234
- 100) van den Broeck, G., Timko, M. P., Kausch, A. P., Cashmore, A. R., van Montagu, M., Herrera-Estrella, L. (1985) Nature 313: 358-363
- 101) Shinozaki, K., Sugiura, M. (1983) Nucleic Acid. Res. 11: 6957-6964

- 102) Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K. and Weisbeek, P. (1986) Cell 46:365-375
- 103) Chua, N. H., Schmidt, G. W. (1979) J. Cell. Biol. 81: 461-483
- 104) Pain, D. and Blobel, G. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3288-3292
- 105) Robinson, C., Ellis, R. J. (1984) Eur. J. Biochem. 142: 237-242
- 106) Schatz, G. (1986) Nature 321: 108-109
- 107) Zimmermann, R. and Meyer, D. I. (1986) Trends. Biochem. Soc. Trans. 11:512-515
- 108) Maher, P.S., Singer, S. J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9001-9005
- 109) Eilers, M. and Schatz, G. (1986) Nature 322: 228-23
- 110) Rothman, J. E. and Kornberg, R. D. (1986) Nature 322: 209-210
- 111) Hennig, B. and Neupert, W. (1981) Eur. J. Biochem. 121: 203-212
- 112) Hennig, B. Koehler, H. and Neupert, W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4963-4967
- 113) Matsuura, M., Arpin, C., Hannum, E., Margoliash, D., Sabayini, D. and Morimoto, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4387-4372
- 114) Ono, H. and Tuboi, S. (1985) Biochem. Inter. 10: 351-357
- 115) Zwikinski, C., Schleyer, M. and Neupert, W. (1983) J. Biol. Chem. 258: 4071-4074
- 116) Mori, M., Matsue, Miura, Tatibana, Hashimoto (1985) Eur. J. Biochem. 149: 181-186

- 117) Zimmermann, R., Hennig, B. and Neupert, W.
(1981) Eur. J. Biochem. 116: 455-460
- 118) Riezman, H., Hay, R., Witte, C., Nelson, N.
and Schatz, G. (1983) EMBO J. 2: 1113-1118
- 119) Zwikinski, C., Schleyer, M. and Neupert, W.
(1984) J. Biol. Chem. 259: 7850-7856
- 120) Argan, C., Lusty, C. and Shore, G. (1983)
J. Biol. Chem. 258: 6667-6670
- 121) Hartl, F.U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss,
H. and Neupert, W. (1986) Cell 47: 939-951
- 122) Nelson, N., and Schatz, G. (1979) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 76: 4365-4369
- 123) Ono, H. and Ito, A. (1982) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 107: 258-264
- 124) Gasser, S. M., Daum, G. and Schatz, G.
(1982) J. Biol. Chem. 257: 13034-13041
- 125) Schleyer, M., Schmidt, B. and Neupert, W.
(1982) Eur. J. Biochem. 125: 109-116
- 126) Kolansky, D. M., Conboy, J. G., Fenton, W.
A. and Rosenberg, L. (1982) J. Biol. Chem. 257:
8467-8471
- 127) Pfanner, N. and Neupert, W. (1985) EMBO J.
4: 2819-2825
- 128) Schleyer, M. and Neupert, W. (1985) Cell
43: 339-350
- 129) Pfanner, N. and Neupert, W. (1986) FEBS
Lett. 209: 152-156
- 130) Pfanner, N. and Neupert, W. (1987) J. Biol.
Chem. 262: 7528-7536
- 131) Miura, S., Mori, M. and Tatibana, M.
(1983) J. Biol. Chem. 258: 6671-6674

- 132) Ohta, S. and Schatz, G. (1984) EMBO J. 3: 651-657
- 133) Firgaira, F. A. (1984) Science 226: 1319-1326
- 134) Argan, C. and Shore, G. C. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 289-298
- 135) Burns, D. and Lewin, A. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6153-6155
- 136) Pfanner, N. and Neupert, W. (1987) J. Biol. Chem. 262: 7528-7536
- 137) Schwaiger, M., Herzog, V. and Neupert, W. (1987) J. Cell. Biol. 105: 235-246
- 138) Epand, R.M., Hui, S. W., Argan, C., Gillespie, L.L. and Shore, G. C. (1986) J. Biol. Chem. 261: 10017-1020
- 139) Horwich, A. L., Kalousek, F., Fenton, W. A., Furtak, K., Polloc, R. A. and Rosenberg, L. E. (1987) J. Cell. Biol. 105: 669-677
- 140) Hurt, E. C. and Schatz, G. (1987) Nature 325: 499-503
- 141) Schatz, G. (1987) Eur. J. Biochem. 165: 1-6
- 142) Bohni, P., Gasser, C., Leaver, G. and Schatz, N. (1980) " The organization and expression of the mitochondrial genome, A. M. Kroon and C. Saccone, Eds. (Elsevier / North-Holland, Amsterdam) pp. 423-433
- 143) Bohni, P. C., Daum, G. and Schatz, G. (1983) J. Biol. Chem. 258: 4937-4943
- 144) McAda, P. C. and Douglas, M. G. (1982) J. Biol. Chem. 257: 3177-3182

- 145) Conboy, J. G., Fenton, W. A. and Rosenberg, L. E. (1982) Biochem. Bio phys. Res. Commun. 105: 1-7
- 146) Gasser, J. M., Ohashi, A., Daum, G., Böhni, C., Gibson, J., Reid, G. A., Yonetani, T. and Shatz, G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 267-271
- 147) Daum, G., Gasser, S. M and Shatz, G. (1982) J. Biol. Chem. 257: 13075-13080
- 148) Ohashi, A., Gibson, J., Gregor, J. and Schatz, G. (1982) J. Biol. Chem. 157: 13042-13047 157: 13042-13047
- 149) Gordon, C. S., Richard, A., Rachubinski, C. A., Rima, R., Marcel, P., Carol, J. L. and Yves, R. (1983) Method. Enz. 97: 396-408
- 150) Miura, S., Mori, M., Amaya, Y. and Tatibana, M. (1982) Eur. J. Biochem. 122: 641-647
- 151) Conboy, J. G. and Rosenberg, L.E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3073-3077
- 152) Kalousek, F., Orsulak, M. D and Rosenberg, L. E. (1984) J. Biol. Chem. 259: 5392-5395
- 153) Grisolia, S. and Cohen, P. P. (1952) J. Biol. Chem. 198: 561-571
- 154) Morita, T., Mori, H., Tatibana, M. and Cohen P. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99(2): 623-629
- 155) Lusty, C. J., Jilka, R. L. and Nietsch, E. M. (1979) J. Biol. Chem. 254: 10030-10036
- 156) Kolata, G. (1985) Science 228: 1517-1518
- 157) Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53: 159-162.

158) Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 2110-2114.

159) Clewell, D. B. and Hellinski, D. R. (1970) Biochemistry 9: 4428- 4440.

160) Silhavy, T. J., Berman, M. L. and Enquist, L. W. (1984). Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

161) Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.

162) Maniatis, T. , Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning : A Laboratory Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor, New York.

163) Butler, E. T. and Chamberlin, M. J. (1982) J. Biol. Chem. 257: 5772- 5778.

164) Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green M. R. (1984) Nucleic Acid Res. 12: 7035-7056

165) Shatkin, A. J. (1976) Cell 9: 645-653.

166) Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1984) Nucleic Acid Res. 12:7057-70.

167) Konarska, M. M., Padgett, R. A. and Sharp, P. A. (1984) Cell 38: 731-736.

168) Maniatis, T., Jeffrey, A., and Van de Sande, H. (1975) Biochemistry 14: 3787-3794

169) Garger, S. J., Turpen, T., Carrington J. C., Morris, T. J. and Dodds, J. A. (1983) Plant Mol. Biol. Rep. 1: 21-25.

170) Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977) J. Mol. Biol. 113: 237-251

171) Tse, T.P.H. and Taylor, J.M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 1272-1278

- 172) Pelham, H. R. B. and Jackson, R. J.
(1976) Eur. J. Biochem. 67: 247-256
- 173) Mori, M., Miura, S., Tatibana, M. and Cohen,
P.P (1981) J. Biol. Chem. 256: 4127-4132.
- 174) Cox, R.A. (1968) Methods Enzymol. 12 :
120-129
- 175) Aviv, H. and Leder, P. (1972) Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A. 69: 1408-12.
- 176) Jentoft, N. and Dearborn, D.G. (1979) J.
Biol. Chem. 254:4359-4365.
- 177) Penefsky, H. S. (1977) J. Biol. Chem.
252: 2891-2899.
- 178) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227: 680-685.
- 179) Bonner, W. M. and Laskey, R. A. (1974)
Eur. J. Biochem. 46: 83-88.
- 180) Kessler, S. W. (1981) Methods Enzymol. 73:
442-458
- 181) Morimoto, T., Matsuura, S. and Arpin, M.
(1983) Methods Enzymol. 97: 408-426
- 182) Jacobs, E., Jacobs, S., Sanadi, E. and
Bradkey S. (1956) J. Biol. Chem. 223: 147-156
- 183) Estabrook, R.W. (1967) Methods Enzymol. X:
41-47
- 184) Okayama, H., and Berg, P. (1982) Mol. Cell.
Biol. 2: 167-170
- 185) Nguyem, M., Argan, C., Lusty, C., and Shore,
G. (1986) J. Biol. Chem. 261: 800-805
- 186) Jackson, R. J., Campbell, E. A., Herbert,
P. and Hunt, T. (198?) Eur. J. Biochem. 131:
289-301

- 187) Lenzen, S., Hickenthier, R. and Panten, V.
(1986) J. Biol. Chem. 261:16478-16483
- 188) Toninello, A., Di Lisa, F., Siliprandi, D.
and Siliprandi, N (1985) Biochim. Biophys. Acta.
815: 399-404
- 189) Fisher, W. R., Tainuchi, H. and Anfinsen,
C. B. (1983) J. Biol. Chem. 248: 3188-3195
- 190) Tabor, H. and Tabor, C. W. (1964)
Pharmacol. Rev. 16: 245-300
- 191) Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984) Ann.
Rev. Biochem. 53: 749-790
- 192) Tabor, C. W. (1960) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 2: 117-120
- 193) Phillips, J. E. and Chaffee, R. R. J.
(1982) Biocem. Biophys. Res. Commun. 108: 174-181
- 194) Toninello, A., Di Lisa, F., Siliprandi, D.
and Siliprandi, N. (1984) Advances in Polyamines in
Biomedical Science (Caldarera, C. M. and Bachrach,
V., Eds.) pp.31-36. Clueb Press, Bologna, Italy.
- 195) Tabor, C. W. and Tabor, H. (1976) Ann.
Rev. Biochem. 45: 285-306
- 196) Byczkowski, J. Z., Zychlinski, L. Z. and
Porter, C. W. (1982) Biochem. Pharmacol.
31:4045-4053
- 197) Sheffield, W. Nguyen, M. and Shore, G. C.
(1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 134: 21-28

