

**Biogénesis de Proteínas Mitocondriales:
Dinámica y Cooperaciones moleculares
de la translocasa TIM22**

Jorge Luis Bermejo Vázquez

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA

Dirigida por: Dra. María Luisa Campo Guinea

Cáceres 2015

Biogénesis de Proteínas Mitocondriales: Dinámica y Cooperaciones moleculares de la translocasa TIM22

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Extremadura,
presentada por:

Jorge Luis Bermejo Vázquez

Cáceres 2015

Este trabajo ha sido financiado por las siguientes instituciones y proyectos de investigación:

- Junta de Extremadura, AyudasPRI - PRE09



Ref.: PRE09186

- Junta de Extremadura, Consejería de Economía, Comercio e Innovación



Ref.: PRI07A072

- Gobierno de España, Ministerio de Ciencia e Innovación



Ref.: BFU2008-00475/BMC

- Gobierno de Extremadura y Unión Europea, a través del Fondo Social Europeo



Ref.: GRU0911 y GR10108

*“You have to learn the rules of the game. And then you
have to play better than anyone else”*

ALBERT EINSTEIN

¡Por fin estoy aquí!

¡Ya me dejaron concluir mis estudios!

Hace 12 años comencé a estudiar en la Universidad de Extremadura, todo este tiempo me ha permitido obtener mi licenciatura, másteres, cursos y por fin mi doctorado.

A lo largo de todo este tiempo he conocido a muchas personas, algunas mejores y otras peores, pero lo que desde luego saben todas aquellas personas que me han conocido, es que no soporto la hipocresía. Normalmente, este apartado de las tesis está lleno de menciones a instituciones y personas que en mayor o menor medida han colaborado o apoyado de una u otra forma al doctorando. Yo no puedo ser así, yo no puedo regalar agradecimientos a diestro y siniestro, necesito un motivo para que esas personas que han pasado por mi vida a lo largo de estos años figuren en esta página de mi tesis. Necesito que verdaderamente me hayan servido como apoyo o ayuda tanto en los momentos buenos como en los no tan buenos.

Por ello, mis agradecimientos serán diferentes.

Quiero agradecer en primer lugar al Gobierno de Extremadura la beca que me concedieron allá por 2009, sin la cual, ni tan siquiera me hubiera planteado estar ahora mismo escribiendo estas palabras. Su financiación me ha permitido dedicar todo mi esfuerzo a la consecución de esta investigación.

Y en segundo lugar, pero desde luego no menos importante, quiero agradecer a vosotros todo lo que habéis hecho por mí. El millón de veces

que me habéis ayudado a levantarme cuando no veía el motivo para hacerlo, y que a pesar de ser muy poquitos, me habéis dado más fuerzas que mil personas juntas. Sé que me conocéis como nadie más me conoce, y que no necesitáis que diga vuestros nombres, ni figurar en ninguna mención, para saber lo muchísimo que os agradezco todo lo que habéis hecho por mí... y por supuesto, que preferís que guarde mi carácter a un lado y me refiera a vosotros con un simple "vosotros"

Algunos lleváis conmigo desde que nací, otros me acompañáis desde que tenía tan solo 4 añitos y otros desde 2006 en adelante, pero lo que todos tenéis en común, es que desde el día que os conocí, ni un sólo día de mi vida me he sentido sólo. Muchísimas gracias, sin vosotros no hubiera sido todo esto posible, esta tesis lleva vuestros nombres junto al mío, porque sois tan partícipes de ella como yo.

¡Esto es por vosotros!

¡Gracias!

ÍNDICE

ÍNDICE	I
I. Índice de tablas.....	IV
II. Índice de figuras	IV
ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Transporte de macromoléculas a la mitocondria.....	3
1.1. Transporte de proteínas	4
1.1.1. Secuencias señal para el transporte.....	5
1.1.3. Translocasas de la Membrana Externa.....	7
1.1.3.1. Complejo TOM	8
1.1.3.2. Complejo SAM	10
1.1.3.3. Biogénesis de proteínas con estructura α -hélice.....	12
1.1.4. Translocasas de la Membrana Interna.....	14
1.1.4.1. Translocación a través de la membrana interna mitocondrial	14
1.1.4.2. Biogénesis de proteínas en la membrana interna.....	17
1.1.4.3. Complejo TIM23.....	17
1.1.4.4. Complejo TIM22.....	18
1.1.4.5. Complejo OXA	21
1.1.4.6. Ruta MIA	22
1.2. Transporte de ácidos nucleicos.....	23
1.2.1. Transporte de ARN.....	23
1.2.2. Transporte de ADN.....	24
1.2.3. Canal Aniónico Dependiente de Voltaje, VDAC	25
2. Cooperaciones entre translocasas y maquinarias celulares.....	27
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Material	41
1.1. Instrumental.....	41
1.2. Material Biológico.....	42
1.2.1. Mutaciones en TIM22.....	42
1.2.2. Mutaciones en Tim23	44
1.2.3. Mutaciones en TOM	45
1.2.4. Mutaciones en VDAC.....	46
1.3. Reactivos	47
1.4. Medios de cultivo	50
1.4.1. SDLac	50
1.4.2. YPD	52
1.4.3. YPG	53
1.4.4. YPEG.....	53
1.4.5. SD	54
1.4.6. SSLac.....	55
1.5. Tampones y soluciones de uso común.....	56
1.5.1. Aislamiento de mitocondrias	56
1.5.1.1. Tampón 0,1 M Tris-H ₂ SO ₄ , pH 9,4/ 10 mM ditiotreitól.....	56

1.5.1.2.	Tampón Sorbitol 1,2 M, pH 7,4	56
1.5.1.3.	Tampón Sorbitol 1,2M/ fosfato 20 mM, pH 7,4.....	57
1.5.1.4.	Tampón de Homogenización.....	57
1.5.1.5.	Gradiente de sacarosa.....	58
1.5.1.6.	Tampón 2X.....	60
1.5.1.7.	Tampón Sacarosa 35%/Tris 10 mM, pH 7,4	60
1.5.2.	Lisado mitocondrial	61
1.5.2.1.	NativePAGE Sample Buffer 4X.....	61
1.5.2.2.	Tampón de lisis mitocondrial, 0,5% de digitonina (p/v)	62
1.5.3.	Cuantificación de proteínas.....	62
1.5.3.1.	Solución de BSA	62
1.5.3.2.	Reactivo de Bradford.....	63
1.5.4.	Electroforesis desnaturalizante	63
1.5.4.1.	Tampón de carga de la muestra	63
1.5.4.2.	Tampón TGS (Tris/Glicina/SDS).....	63
1.5.4.3.	Tampón de transferencia (Tris/Glicina/Metanol)	64
1.5.4.4.	Geles SDS-PAGE.....	65
1.5.4.4.1.	Tampón Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8	65
1.5.4.4.2.	Tampón Tris/HCl 1,0 M, pH 6,8	65
1.5.4.4.3.	Solución SDS 10%.....	66
1.5.5.	Electroforesis nativa	67
1.5.5.1.	Reactivo G-250 sample additive	67
1.5.5.2.	Tampón de la muestra para BN-PAGE	67
1.5.5.3.	NativePAGE™ 20X Running Buffer	68
1.5.5.4.	NativePAGE™ 20X Cathode Buffer Additive.....	68
1.5.5.5.	Dark Blue Cathode Buffer.....	68
1.5.5.6.	Light Blue Cathode Buffer	69
1.5.5.7.	Tampón Running Buffer	69
1.5.5.9.	Geles BN-PAGE	71
1.5.5.9.1.	Tampón Gel 3X.....	71
1.5.5.9.2.	Acrilamida/bisacrilamida	71
1.5.6.	Tinción de geles de poliacrilamida	72
1.5.6.1.	Azul de Coomassie.....	72
1.5.6.2.	Solución de desteñido.....	73
1.5.7.	Western Blot	74
1.5.7.1.	Tampón TBS/Tween	74
1.5.7.2.	Solución de bloqueo	74
1.5.8.	Revelado de geles	75
1.5.8.1.	Solución Reveladora y Fijadora	75
1.5.9.	Electroforesis de ácidos nucleicos	75
1.5.9.1.	Tampón de electroforesis TBE.....	75
1.6.	Anticuerpos.....	76
1.7.	Primers.....	77
1.8.	Soporte informático	78
2.	Métodos.....	79

2.1.	Mantenimiento de las líneas celulares	79
2.1.1.	Congelación de las líneas celulares.....	79
2.1.2.	Descongelación de las líneas celulares	79
2.2.	Elaboración de las curvas de crecimiento	80
2.3.	Cultivos celulares	81
2.4.	Obtención de mitocondrias	82
2.5.	Preparación de membranas mitocondriales	85
2.6.	Extracción de proteínas mitocondriales	87
2.7.	Cuantificación de proteínas	88
2.8.	Preparación de geles de poliacrilamida	89
2.8.1.	Gel de SDS-PAGE.....	89
2.8.2.	Gel de BN-PAGE.....	91
2.9.	Co-Immunoprecipitación	93
2.10.	Electroforesis de proteínas	95
2.10.1.	SDS-PAGE	95
2.10.2.	BN-PAGE.....	96
2.10.3.	Bidimensional	97
2.10.5.	Tinción del gel de poliacrilamida.....	100
2.10.6.	Tinción de membrana	100
2.10.7.	Bloqueo de membrana	101
2.10.8.	Inmunoblot.....	101
2.11.	Extracción de ácidos nucleicos: ADN y ARN.....	102
2.12.	Retrotranscripción de ARN a ADNc	102
2.13.	Electroforesis de ácidos nucleicos.....	103
2.13.1.	Geles para ácidos nucleicos	103
RESULTADOS		107
1.	Caracterización fenotípica de las estirpes celulares.....	109
1.1.	Mutantes en translocasas de la membrana interna mitocondrial.....	109
1.2.	Mutantes en translocasas de la membrana externa mitocondrial	112
1.3.	Mutantes en la porina mitocondrial	113
2.	Curvas de crecimiento	115
2.1.	Mutantes en las translocasas TIM22 y TIM23	115
2.2.	Mutantes en la translocasa TOM	117
2.3.	Mutantes en la porina mitocondrial	118
3.	Caracterización proteica de las estirpes celulares.....	120
3.1.	Mutantes en TIM22 y TIM23	120
3.2.	Mutantes en la porina mitocondrial	130
4.	Caracterización bioquímica de las translocasa TIM22	133
4.1.	Estructura nativa y composición molecular de la translocasa TIM22	139
4.2.	Efecto de las mutaciones en TIM22 sobre la estructura de translocasas y porina mitocondriales	148
4.3.	Interacción molecular entre TIM22 y VDAC.....	158
4.3.1.	Estudios de Colocalización	159
4.3.2.	Estudios de electroforesis bidimensional e inmunodetección	162
4.3.3.	Estudios de Co-inmunoprecipitación	166

4.3.4.	Especificidad de la interacción	168
4.3.4.1.	Estudios de Co-inmunoprecipitación	177
4.3.4.2.	Efecto de la digitonina.....	181
4.3.4.3.	Análisis de la interacción VDAC1-TIM22 en mitoplastos.....	188
4.4.	Interacciones de TIM22 con otros componentes mitocondriales.....	193
4.5.	Efecto de la eliminación de Tim54p sobre la estructura de TIM22.....	205
4.5.1.	Caracterización de las estirpes mutantes en Tim54p	206
4.5.2.	Efecto sobre la estructura nativa	208
4.5.3.	Estudios de electroforesis bidireccional e inmunodetección.....	209
4.5.4.	Co-inmunoprecipitación de Tim22p y Tim18p.....	214
4.5.5.	Efecto de la eliminación de Tim54p sobre VDAC1	216
	DISCUSIÓN.....	221
1.	De la caracterización de las líneas celulares.....	225
2.	De la caracterización de la translocasa TIM22.....	229
3.	De la interacción de VDAC y TIM22	236
3.1.	De la interacción de TIM22 con otros componentes mitocondriales.....	239
4.	De las funciones de la interacción de VDAC1 con TIM22	242
4.1.	De la biogénesis de VDAC1.....	242
4.2.	Oligomerización de VDAC	243
4.3.	Del transporte de proteínas	245
4.4.	Del transporte de ácidos nucleicos.....	246
	CONCLUSIONES.....	249
	BIBLIOGRAFÍA.....	253

I. Índice de tablas

Tabla 1.	Cepas mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , complejo TIM22.....	43
Tabla 2.	Cepas mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , complejo TIM23.....	44
Tabla 3.	Cepas mutantes en TOM.	45
Tabla 4.	Cepas mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , VDAC.	46
Tabla 5.	Diluciones de anticuerpos primarios	76
Tabla 6.	Diluciones de anticuerpos secundarios.....	77
Tabla 7.	Sondas utilizadas en para los componentes mitocondriales	78
Tabla 8.	Recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas con Bradford	88
Tabla 9.	Preparación de geles SDS-PAGE.....	90
Tabla 10.	Preparación de geles BN-PAGE.....	93

II. Índice de figuras

Figura 1.	Rutas para la biogénesis de proteínas mitocondriales.....	7
Figura 2.	Receptores de la translocasa de membrana externa mitocondrial TOM	9
Figura 3.	Vía de inserción de las proteínas con conformación β -barril en la membrana externa mitocondrial	12
Figura 4.	Resumen de los múltiples mecanismos para la integración de proteínas con diferente topología transmembrana en la membrana externa mitocondrial	13
Figura 5.	Mecanismos de transporte a través de la translocasa TIM23	16

Figura 6. La proteína Mdm10 es miembro del complejo ERMES de interacción con el RE	29
Figura 7. Gradiente de concentración de sacarosa.....	84
Figura 8. Geles de poliacrilamida para electroforesis BN-PAGE	92
Figura 9. Crecimiento de las estirpes de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mutantes en las proteínas componentes de las translocasas de membrana interna mitocondria TIM22 y TIM23	111
Figura 10. Crecimiento de las estirpes de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mutantes en las proteínas componentes de las translocasas de membrana interna mitocondria TIM22 y TIM23	112
Figura 11. Crecimiento celular de las estirpes de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mutantes en las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC o porina mitocondrial.....	114
Figura 12. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en la translocasa TIM22.....	116
Figura 13. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en TIM23	117
Figura 14. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en el complejo TOM.....	118
Figura 15. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en las porinas mitocondriales.....	120
Figura 16. Composición proteica de la translocasa TIM22 en las estirpes mutantes en proteínas de los complejos TIM22 y TIM23	121
Figura 17. Caracterización proteica de las líneas celulares mutantes en TIM22 y TIM23.....	127
Figura 18. Nivel de expresión de los componentes de la translocasa TIM22 en las estirpes de levadura utilizadas en el estudiado.....	128
Figura 19. Composición proteica de la translocasa TIM23 en las estirpes mutantes en los complejos TIM22 y TIM23	129
Figura 20. Nivel de expresión de los componentes integrales de la translocasa TIM23 en las estirpes mutantes en el complejo TIM22 o en la proteína Tim23.....	130
Figura 21. Composición proteica de la translocasa TIM22 y de las isoformas de VDAC en las estirpes mutantes en las porinas mitocondriales	131
Figura 22. Nivel de expresión de los componentes integrales de la translocasa TIM22 en las estirpes mutantes en las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje	132
Figura 23. Efecto de la digitonina sobre la integridad molecular de la translocasa TIM22	135
Figura 24. Efecto de la digitonina sobre la integridad molecular de las translocasas TOM y TIM23.....	138
Figura 25. Co-inmuprecipitación de la proteína Tim22p con el anticuerpo α Tim22p	140
Figura 26. Co-inmuprecipitación de las proteínas Tim54p y Tim18p con α Tim22p	143
Figura 27. Co-inmuprecipitación de la proteína Tim23 con el anticuerpo α Tim22p	145
Figura 28. Efecto de las alteraciones en el nivel de expresión de los componentes de la translocasa TIM22 sobre la biogénesis del complejo.....	147
Figura 29. Co-inmuprecipitación de los componentes de la translocasa TIM23 con el anticuerpo α Tim23p.....	150
Figura 30. Efecto de las alteraciones en la expresión de los componentes de TIM22 sobre la biogénesis de TIM23.....	152
Figura 31. Efecto de las alteraciones en la expresión de los componentes de la translocasa TIM22 sobre la biogénesis de TOM.....	154
Figura 32. Efecto de las alteraciones en la expresión de los componentes de la translocasa TIM22 sobre la estructura supramolecular de VDAC1	157
Figura 33. Efecto de la digitonina sobre las formas supramoleculares de VDAC1.....	160
Figura 34. Efecto de la digitonina sobre la colocalización de las estructuras supramoleculares de TIM22 y VDAC1.....	161
Figura 35. Electroforesis bidimensional de las estructuras supramoleculares de VDAC1 y Tim22p	163
Figura 36. Diagrama de barrido y superposición de las señales de VDAC1 y Tim22p	165
Figura 37. Co-inmuprecipitación de VDAC1 y Tim22p.....	167

Figura 38. Co-inmuprecipitación de VDAC1 y Tim22p en las estirpes mutantes en la translocasa TIM22	170
Figura 39. Inmuprecipitación de Tim22p en las estirpes mutantes en la translocasa TIM22	172
Figura 40. Co-inmuprecipitación de Tim22p con anticuerpos frente a Tim22p, VDAC1 y Tim23p	174
Figura 41. Co-inmuprecipitación de VDAC1 con los anticuerpos frente a Tim22, VDAC1 y Tim23p..	175
Figura 42. Co-inmuprecipitación de Tim23p con los anticuerpos α Tim22, α VDAC1 y α Tim23p	176
Figura 43. Efecto de eliminación de VDAC sobre la biogénesis de TIM22.	178
Figura 44. Co-inmuprecipitación de las proteínas Tim22p y VDAC1 en los mutantes en las isoformas de VDAC.....	180
Figura 45. Composición proteica de VDAC1 y Tim22p en la mezcla de estirpes Δ Por1 y \downarrow Tim22p.....	182
Figura 46. Nivel de expresión de las proteínas VDAC1 y Tim22p en los extractos mitocondriales de mezclas de las estirpes Δ Por1 y \downarrow Tim22p	183
Figura 47. Co-inmuprecipitación de Tim22p y VDAC1 en mitocondrias de mezclas de células Δ Por1 y \downarrow Tim22p	184
Figura 48. Determinación de VDAC1 y Tim22p en mezclas de mitocondrias de la estirpe Δ Por1 con cantidades crecientes de mitocondrias de \downarrow Tim22p	186
Figura 49. Co-inmuprecipitación de Tim22p y VDAC1 en mezclas de mitocondrias de Δ Por1 con cantidades crecientes de mitocondrias de \downarrow Tim22p	187
Figura 50. Composición proteica de Tim22p y VDAC1 en mitocondrias y mitoplastos	190
Figura 51. Efecto de la eliminación de la mayor parte de la membrana externa sobre TIM22 y VDAC1	191
Figura 52. Densitometría de barrido y superposición de las estructuras nativas de VDAC1 y Tim22p en mitocondrias y mitoplastos.....	192
Figura 53. Estructuras nativas de la translocasa TIM22, VDAC1 y ANT	195
Figura 54. Co-inmuprecipitación de la proteína ANT con los anticuerpos frente a Tim22, VDAC1 y Tim23p	197
Figura 55. Co-inmuprecipitación de Tim10p con los anticuerpos frente a las proteínas Tim22, VDAC1 y Tim23p	200
Figura 56. Electroforesis bidimensional de las estructuras nativas de TOM y Tim22p	202
Figura 57. Diagrama de barrido y superposición de las estructuras nativas de Tom40p y Tim22p	203
Figura 58. Co-inmuprecipitación de las proteínas Tom40p y Tom20p junto a las proteínas Tim22p, Tim23p y VDAC1	205
Figura 59. Composición proteica de la translocasa TIM22 en las estirpes mutantes en Tim54p	207
Figura 60. Efecto de las alteraciones en el nivel de expresión de Tim18p y Tim54p sobre la biogénesis de TIM22.....	208
Figura 61. Electroforesis bidireccional de TIM22 de mitocondrias de estirpes mutantes en Tim54p.....	210
Figura 62. Diagrama de barrido con superposición de los complejos nativos que contienen Tim22p y Tim18p en mitocondrias mutantes en Tim54p	213
Figura 63. Co-inmuprecipitación de Tim18p junto a Tim22p.....	215
Figura 64. Electroforesis bidireccional de las estructuras nativas de VDAC1 y Tim22p.....	217
Figura 65. Densitometría de barrido con superposición de las estructuras nativas de VDAC1 y Tim22p	219

ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre completo
AAC	<i>Del inglés: ADP/ATP carrier</i> , complejo intercambiador de nucleótidos ADP/ATP (También llamado ANT)
ADE	Adenina
ADE2	Gen que codifica la adenina. Las líneas celulares que presentan este gen son viables en ausencia de adenina
ANT	<i>Del inglés: Aromatic and neutral amino acid transporter</i> , Complejo intercambiador de nucleótidos ADP/ATP (También llamado AAC, <i>del inglés: ADP/ATP carrier</i>)
Atp6	<i>Del inglés: ATP synthase F0 subunit 6</i> , Subunidad 6 de la F ₀ -ATPsintetasa
Atp6	Gen que codifica la subunidad 6 de la F ₀ -ATPsintetasa
BN-PAGE	<i>Del inglés: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas
BSA	<i>Del inglés: Bovine serum albumin</i> , Albúmina de suero bovino
COX	<i>Del inglés: Cytochrome c oxidase</i> , Complejo citocromo c oxidasa
Cox1	Subunidad 1 de la Citocromo c oxidasa
Cox1	Gen que codifica la subunidad 1 del complejo Citocromo c oxidasa
DHFR	<i>Del inglés: Dihydrofolate reductase</i> , Dihidrofolato reductasa
EDTA	<i>Del inglés: Ethylenediaminetetra-acetic acid</i> , ácido etilendiaminotetracético
EGTA	<i>Del inglés: Ethylene glycol tetraacetic acid</i> , Ácido etilenglicol bis(2-aminoetiléter) tetracético

ERMES	<i>Del inglés: Endoplasmic Reticulum – Mitochondria Encounter Structure</i> , Estructura de encuentro entre el retículo endoplasmático y la mitocondria (Complejo ERMES)
GAL10	Promotor Gal10, inducible por la presencia de galactosa
HEPES	<i>Del inglés: Titration (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> , 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico
HIS	Histidina
HIS3	Gen que codifica la histidina. Las líneas celulares que presentan este gen son viables en ausencia de histidina
Hsp60	<i>Del inglés: Heat shock protein 60</i> , Proteína de choque osmótico 60
IgG	Inmunoglobulina G
IMS	<i>Del inglés: Intermembrane space</i> , Espacio intermembrana
LEU	Leucina
LEU2	Gen que codifica la leucina. Las líneas celulares que presentan este gen son viables en ausencia de leucina
MDM	<i>Del inglés: Mitochondrial Dynamics and Morphology</i> , Complejo de dinámica y morfología mitocondrial (Complejo MDM)
Mdm1	Subunidad 1 del complejo MDM
MIA	<i>Del inglés: Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly</i> , Complejo de importación y ensamblaje del espacio intermembrana mitocondrial (Complejo MIA)
MICOS	<i>Del inglés: MItochondrial COntact-Site</i> , Complejo de los sitios de contacto mitocondrial (Complejo MICOS)

MINOS	<i>Del inglés: Mitochondrial Inner membrane Organizing System,</i> Sistema organizador del espacio intermembrana mitocondrial (Complejo MINOS)
MISS	Señal de localización en el espacio intermembrana mitocondrial
MitOS	<i>Del inglés: MITochondrial Organizing Structure,</i> Organizador de la estructura mitocondrial (Complejo MitOS)
Mmm1	Subunidad 1 del complejo ERMES
MPTP	<i>Del inglés: Mitochondrial Permeability Transition Pore,</i> Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
mtHsp70	<i>Del inglés: Mitochondrial Heat shock protein 70,</i> Proteína de choque osmótico mitocondrial 70
OXA	<i>Del inglés: Mitochondrial export translocase,</i> Translocasa de exportación mitocondrial (Complejo OXA)
OXPHOS	Fosforilación Oxidativa
P2	Péptido señal interno P2 (TSTTLLNLLSGLT) (1)
PAM	<i>Del inglés: Presequence translocase-Associated import Motor,</i> Motor asociado a la translocasa TIM23
PMSF	<i>Del inglés: Phenylmethylsulfonyl Fluoride,</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Por1/Por2	Porina mitocondrial o VDAC. Los números 1 y 2 hacen referencia a la correspondiente isoforma: VDAC1 y VDAC2 (Como norma general se utiliza la nomenclatura “Por” al referirse a estirpes celulares, utilizando “VDAC” al referirse a la proteína de interés)
<i>Por1/Por2</i>	Genes que codifican las isoformas VDAC1 y VDAC2, respectivamente

POTRA	<i>Del inglés: POlypeptide-TRansport-Associated</i> , Transportador de polipéptidos asociados
SAM	<i>Del inglés: Sorting and Assembly Machinery</i> , Maquinaria de asociación y ensamblaje (Complejo SAM)
SDH	<i>Del inglés: Succinate dehydrogenase cytochrome b</i> , Complejo Succinato deshidrogenasa (complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial)
Sdh3	Subunidad 3 del complejo Succinato deshidrogenasa
SDS	<i>Del inglés: Sodium dodecyl sulfate</i> , Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	<i>Del inglés: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SGD	Bases de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i>
TEMED	<i>Del inglés: Tetramethylethylenediamine</i> , N,N,N,N-tetrametiletilendiamina
TIM22	<i>Del inglés: Translocase of the Inner Membrane 22</i> , Translocasa de membrana interna mitocondrial 22 (Complejo TIM22)
TIM23	<i>Del inglés: Translocase of the Inner Membrane 23</i> , Translocasa de membrana interna mitocondrial 23 (Complejo TIM23)
TIM23^{CORE}	Núcleo de la translocasa TIM23
TIM23^{SORT}	Núcleo de la translocasa TIM23 unido a Tim21p
Tim22p	Subunidad 22 del complejo TIM22 (nomenclatura aplicable a todas las proteínas del complejo TIM22 y TIM23)
Tim22p	Gen que codifica la subunidad Tim22p (nomenclatura aplicable a los genes de todas las proteínas del complejo TIM22 y TIM23)

TOM	<i>Del inglés: Translocase of the Outer Membrane</i> , Translocasa de membrana externa mitocondrial (Complejo TOM)
Tom40p	Subunidad 40 del complejo TOM (nomenclatura aplicable a todas las proteínas del complejo TOM)
<i>Tom40p</i>	Gen que codifica la subunidad Tom40p (nomenclatura aplicable a los genes de todas las proteínas del complejo TOM)
TRP	Triptófano
<i>TRP1</i>	Gen que codifica el triptófano. Las líneas celulares que presentan este gen son viables en ausencia de triptófano
URA	Uracilo
<i>URA2</i>	Gen que codifica la uracilo. Las líneas celulares que presentan este gen son viables en ausencia de uracilo
VDAC	<i>Del inglés: Voltage-Dependent Anion Channel</i> , Canal Aniónico Dependiente de Voltaje (también llamado Porina mitocondrial)
VDAC1/VDAC2	Canal Aniónico Dependiente de Voltaje, el número 1 y 2 hace referencia a la correspondiente isoforma: VDAC1 y VDAC2 (Como norma general se utiliza la nomenclatura “Por” al referirse a estirpes celulares, utilizando “VDAC” al referirse a la proteína de interés)

Nota: Como norma general se ha utilizado la siguiente nomenclatura:

- La palabra completa en MAYUSCULAS, para referirse al complejo proteico, ejemplo: TIM22.
- La inicial del nombre de la proteína en mayúscula y terminado en “p”, para referirse a cada una de las proteínas de los respectivos complejos, ejemplo: Tim22p.
- El nombre de la proteína en *cursiva* para referirse al gen codificante de dicha proteína, ejemplo: *Tim22p*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la investigación de la mitocondria se ha colocado en la vanguardia, ya no solo por la crucial importancia de este orgánulo en la bioenergética de las células eucariotas, llevándose a cabo vías metabólicas como ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos, sino por el papel que desempeñan en numerosos procesos críticos para la viabilidad celular, tales como; el metabolismo de aminoácidos y lípidos, la biogénesis del grupo hemo y de los centros sulfoféricos (Fe-S) presentes en gran variedad de metaloproteínas, de capital importancia en procesos redox mitocondriales, la homeostasis del Ca^{2+} , o su decisiva participación en los procesos de apoptosis (Wallace and Fan 2009, Schmidt, Pfanner et al. 2010). De ahí, que el deterioro de la función mitocondrial esté asociado a numerosas enfermedades genéticas, así como al envejecimiento, la diabetes del tipo II, el cáncer, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Dolezal, Likic et al. 2006).

La aparición de este orgánulo en la célula eucariota supuso un gran punto de inflexión. Permitió obtener a los organismos eucariotas un aumento de la producción de energía química y en consecuencia, un aumento en la complejidad del propio organismo. Independientemente de qué teorías se consideren, para intentar explicar el origen de la simbiosis entre la mitocondria y las células hospedadoras en los principios de la evolución, actualmente se acepta que ambos se han especializado para sobrevivir juntos, de forma que la célula invasora, mitocondria, ha acabado por convertirse en parte de la célula hospedadora. A lo largo de este proceso, la mitocondria ha ido perdiendo la información genética redundante, y la mayor parte de su material genético ha sido transferido al núcleo celular. De tal manera, que la mitocondria se encuentra bajo el control de dos sistemas genéticos distintos: el suyo propio y el del núcleo celular. Siendo inviable la vida de una sin la otra.

1. Transporte de macromoléculas a la mitocondria

Esta provechosa relación de interdependencia se ha especializado a lo largo de la evolución, de tal forma que no es sorprendente que rápidamente aparecieran mecanismos de comunicación entre la mitocondria y la célula hospedadora.

Del análisis proteómico se estima que las mitocondrias de mamíferos contienen aproximadamente unas 1500 proteínas diferentes y en levadura unas 1000 (Sickmann, Reinders et al. 2003, Reinders, Zahedi et al. 2006, Pagliarini, Calvo et al. 2008). De este origen endosimbiótico, en la mitocondria, se alberga un pequeño genoma que codifica principalmente proteínas que forman parte de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria y de F₁F₀-ATP sintetasa, 13 y 8 proteínas, en mamíferos y levaduras, respectivamente, algo menos de un 1% del proteoma de este orgánulo. De tal forma, que prácticamente la totalidad de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en los genes nucleares. Estas proteínas son sintetizadas en forma de precursores en los ribosomas citosólicos y posteriormente transportadas a la mitocondria, he incorporadas a uno de los cuatro subcompartimentos mitocondriales formados por membrana externa mitocondrial, espacio intermembrana (IMS), membrana interna mitocondrial y finalmente la matriz mitocondrial.

Por eso la homeostasis y el recambio de las proteínas mitocondriales dependen mayoritariamente del transporte desde el citoplasma de las diferentes proteínas. De esta forma, los procesos de transporte de proteínas resultan cruciales para la biogénesis y el mantenimiento de la función mitocondrial. A pesar de lo cual, los mecanismos moleculares de estos procesos no están completamente establecidos.

Dicha comunicación entre la mitocondria y la célula hospedadora no termina ahí, ya que esta permite el intercambio necesario no solo de proteínas, sino que también de moléculas más pequeñas, tales como iones, metabolitos intermediarios y de moléculas no tan pequeñas como ADN y ARN.

1.1. Transporte de proteínas

Los conocimientos que hoy se tienen sobre los principios generales del transporte de proteínas en la mitocondria, se han basado principalmente en estudios genéticos y bioquímicos, tomando como modelo de estudio las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). La mayoría de estos mecanismos descritos en *Saccharomyces*, se han demostrado posteriormente en eucariotas, lo cual nos da una idea del alto nivel de conservación que han tenido estos mecanismos en la evolución.

1.1.1. Secuencias señal para el transporte

Actualmente, se acepta que el transporte de precursores proteicos a la mitocondria se produce como norma general de forma post-transduccional. Si bien, recientemente se han descubierto ciertos indicios de que algunas proteínas, como la fumarasa, tienen un mecanismo de importación cotraduccional (Luk, Yang et al. 2005, Yogev, Karniely et al. 2007). De tal forma, que la mayoría de las proteínas con destino, la mitocondria, se sintetizan en forma de preproteína (Kellems, Allison et al. 1975, George, Walsh et al. 2002, MacKenzie and Payne 2004).

Se ha demostrado, que regiones específicas en el extremo 3' de estos ARNm participan en el direccionamiento de las proteínas, con destino, la mitocondria (Corral-Debrinski, Blugeon et al. 2000, Margeot, Blugeon et al. 2002, Margeot, Garcia et al. 2005, Garcia, Delaveau et al. 2010). Demostrándose en levadura que el reclutamiento de los ARNm en la superficie mitocondrial, implica a los receptores de proteínas mitocondriales de membrana externa Tom20p y Tom70p (García-Rodríguez, Gay et al. 2007, Saint-Georges, Garcia et al. 2008, Eliyahu, Pnueli et al. 2010, Gadir, Haim-Vilmovsky et al. 2011).

La orientación de los precursores proteicos a la mitocondria y su posterior direccionamiento a uno de los subcompartimentos mitocondriales, requiere la presencia de señales específicas de importación dentro de los polipéptidos transportados (Hase, Muller et al. 1984), que son reconocidos por los receptores de la superficie de la membrana externa. Actualmente se reconocen dos tipos principales de secuencias señal: las presecuencias y las secuencias señal internas.

La señal de importación mitocondrial más común en estos polipéptidos consiste en una extensión del extremo N-terminal denominada "presecuencia", constituidas por una α -hélices anfipáticas con una carga neta positiva, y de longitud variable (entre 15 y 55 aminoácidos) (Abe, Shodai et al. 2000, Kohda 2004, Vögtle, Wortelkamp et al. 2009). Aunque, existen excepciones, en las cuales se ha detectado la presecuencia en su extremo C-terminal (Lee, Sedman et al. 1999). De forma general, estas presecuencias son eliminadas proteolíticamente tras su importación (Roise and Schatz 1988, Taylor, Smith et al. 2001, Mossmann, Meisinger et al. 2012). Aproximadamente un 30% de las proteínas

destinadas a la mitocondria no poseen estas presecuencias, sino que en su lugar, contiene secuencias señal internas con carácter hidrofóbico (Wiedemann, Kozjak et al. 2003).

Los complejos proteicos, que reconocen las presecuencias y las secuencias señal internas en la mitocondria, se encuentran presentes tanto en la membrana externa como interna mitocondrial. Estas translocasas, están formadas por el ensamblaje de diferentes subunidades proteicas, las cuales encierran un poro acuoso a través de la barrera hidrofóbica, que suponen las membranas mitocondriales. En la membrana externa se encuentran: el complejo TOM (Translocase of the Outer Membrane), encargado de transportar las proteínas destinadas a cualquiera de los compartimentos mitocondriales, y SAM (Sorting and Assembly Machinery), a través del cual, se integran en la membrana externa, las proteínas con conformación β -barril.

Muchas proteínas tienen como destino final el IMS. MIA (Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly), acopla la liberación de las proteínas en este, con su plegamiento oxidativo, través de un mecanismo de formación de puentes disulfuro (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004, Naoé, Ohwa et al. 2004, Allen, Balabanidou et al. 2005, Mesecke, Terziyska et al. 2005, Grumbt, Stroobant et al. 2007, Milenkovic, Gabriel et al. 2007) y liberación en el IMS.

En la membrana interna se distinguen las translocasas TIM22 (Translocase of the Inner Membrane 22), que reconoce, secuencias señal internas e inserta las proteínas con estructura β -barril en la membrana interna mitocondrial, y TIM23 (Translocase of the Inner Membrane 23), que transporta proteínas con presecuencias, tanto a la membrana externa como a la matriz mitocondrial, para lo cual, requiere de un motor de importación asociado a la translocasa, PAM (Presequence translocase-Associated import Motor), condicionando su funcionamiento, a la hidrólisis de ATP. Finalmente, las proteínas mitocondriales sintetizadas en la matriz por los ribosomas de matriz, se exportan en la membrana interna a través del complejo OXA.

Todos estos sistemas y rutas de importación de proteínas mitocondriales quedan resumidos en la Figura 1:

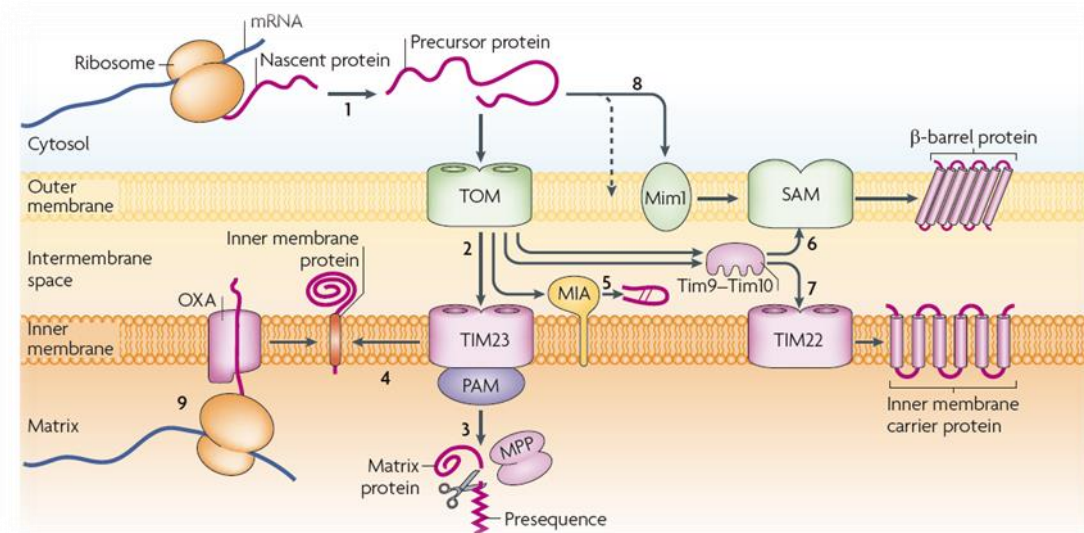


Figura 1. Rutas para la biogénesis de proteínas mitocondriales

La mayoría de las proteínas mitocondriales son sintetizadas en los ribosomas citosólicos y han de ser importadas a través de la translocasa TOM (1). Tras el paso a través del canal de TOM, los precursores proteicos pueden utilizar diferentes mecanismos de clasificación (2). Proteínas con “presecuencia” de transporte cuyo destino final es la matriz son importadas por la translocasa de membrana interna TIM23. El motor de la translocasa, PAM, se asocia al complejo y a la presecuencia. La peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) se encarga de eliminar las presecuencias (3). Algunas proteínas son liberadas lateralmente desde el complejo TIM23 en la fase lipídica de la membrana interna (4). La maquinaria de ensamblaje de proteínas del espacio intermembrana mitocondrial (MIA) impulsa la importación y plegamiento oxidativo de muchas proteínas del espacio intermembrana (5). Las chaperonas Tim9p-Tim10p transfieren a las proteínas precursoras hidrófobas a través del espacio intermembrana, ya sea al complejo SAM, en el caso de las proteínas β-barril de la membrana externa (6), o a través de la vía de transportadores al complejo TIM22 (7). Los precursores de proteínas de membrana externa con estructura α-helicoidal no utilizan el canal de TOM para su inserción en la membrana. Esta se realiza por distintas vías, en algunos casos con Mim1 (8). Algunas proteínas se sintetizan por los ribosomas de la matriz y se exportan en la membrana interna por el complejo OXA (9). (Imagen tomada de Schmidt, O., N. Pfanner, and C. Meisinger, *Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. 11(9): p. 655-67 (Schmidt, Pfanner et al. 2010)).

1.1.3. Translocasas de la Membrana Externa

Se han caracterizado dos sistemas de importación e incorporación de proteínas a la membrana externa mitocondrial. Uno de ellos integrado por Tom40p, el complejo TOM, puerta de entrada común a la mitocondria de la mayor parte las proteínas destinadas a cualquiera de los compartimentos mitocondriales. El segundo, complejo SAM, al que

se dirigen los precursores de proteínas con conformación β -barril cuyo destino final es la membrana externa. Estos son transferidos por las chaperonas del espacio intermembrana, conocidas como “complejos Tim pequeños” del IMS.

1.1.3.1. Complejo TOM

Tom40p, es el componente central del complejo TOM, está integrado en la membrana externa en una conformación β -barril y forma un poro acuoso, a través del cual pasan los precursores de las proteínas mitocondriales (Hill, Model et al. 1998, Künkele, Heins et al. 1998, Model, Meisinger et al. 2008). Junto a esta, una serie de subunidades adicionales apoyan o modulan la estructura cuaternaria de TOM, y/o funcionan como receptores, entre ellas: Tom20p, Tom70p/Tom71p, Tom22p y las proteínas pequeñas Tom: Tom5p, Tom6p y Tom7p.

Los primeros receptores en interactuar con los precursores proteicos son: Tom20p y Tom70p/Tom71p, los cuales diferencian selectivamente entre los diferentes subconjuntos de proteínas precursoras mitocondriales (Brix, Dietmeier et al. 1997). Tom20p reconoce principalmente las “presecuencias” N-terminales (Figura 2.A) (Abe, Shodai et al. 2000, Saitoh, Igura et al. 2007). Por su parte, los precursores proteicos con señales de orientación internas hidrofóbicas, se unen preferentemente a Tom70p/Tom71p (Figura 2.B) (Wiedemann, Pfanner et al. 2001, Wu and Sha 2006). Tom70p y Tom71p tienen una alta homología de secuencia y superponen sus funciones, sin embargo Tom71p se expresa en muy pequeñas proporción (Schlossmann, Dietmeier et al. 1994, Bömer, Pfanner et al. 1996, Koh, Hájek et al. 2001). Además de su papel en la importación de proteínas, los receptores de Tom70p y Tom71p se han relacionado con el mantenimiento de la morfología mitocondrial, mediante su unión a los factores de morfogénesis de superficie del orgánulo (Kondo-Okamoto, Shaw et al. 2008).

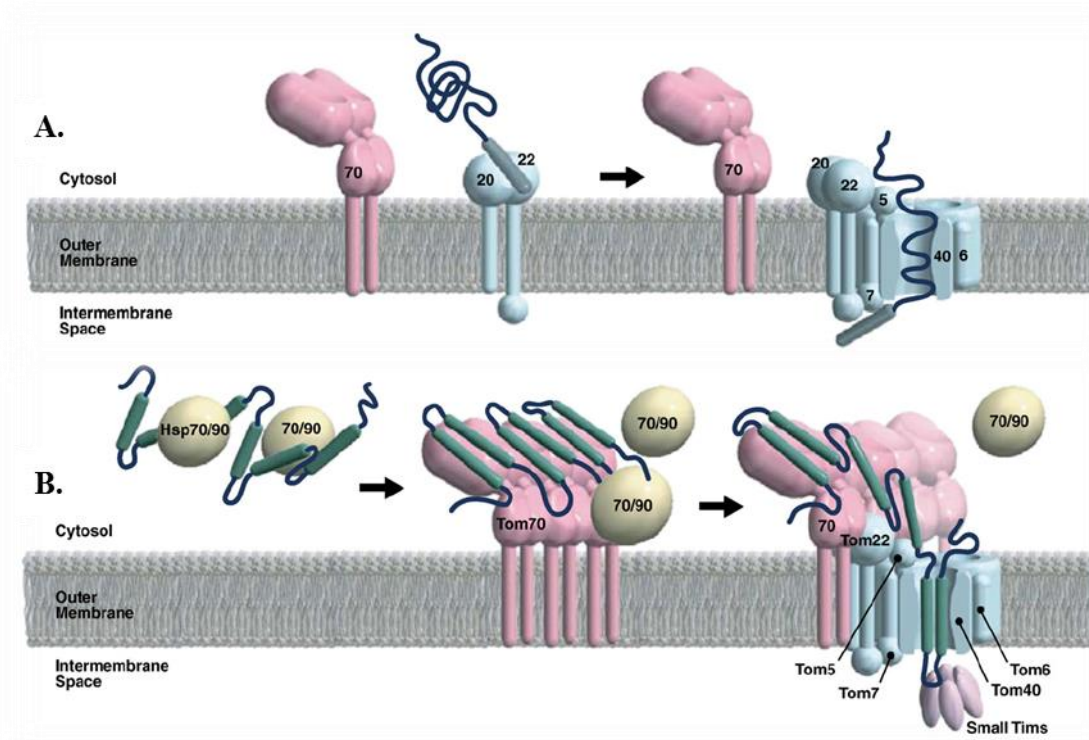


Figura 2. Receptores de la translocasa de membrana externa mitocondrial TOM

(A) Las proteínas que contienen la presecuencia son directamente reconocidos por Tom20p y Tom22p a través de sus interacciones con la presecuencia. A continuación, las proteínas precursoras se transfieren al canal de formado por Tom40p a través de Tom5p. La pared interior del canal de Tom40p puede funcionar como una chaperona para la parte desplegada de las proteínas precursoras. (B) Muchas proteínas transportadas requieren de las chaperonas Hsp70/Hsp90 para evitar su agregación. Hsp70/Hsp90 cede las proteínas precursoras a Tom70p. A continuación, las proteínas precursoras se transfieren al canal Tom40p a través de Tom22p y Tom5p. Después de la translocación a través del canal TOM40 en una conformación de lazo, las proteínas precursoras se unen a proteínas pequeñas Tim del IMS. (Endo, T. and K. Yamano, *Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1803(6): p. 706-14 (Endo and Yamano 2010)).

Tom22p es el receptor central. Tiene un papel crítico para la integridad del complejo, así como también expone sus dominios de unión a la “presecuencia” tanto hacia el citosol como hacia el IMS (Moczko, Bömer et al. 1997, Komiya, Rospert et al. 1998, van Wilpe, Ryan et al. 1999, Shiota, Mabuchi et al. 2011). Tom5p ayuda a la transferencia de los precursores desde Tom22p al canal formado por Tom40p. Pero también se ha relacionado con la biogénesis de Tom40p (Dietmeier, Hönlinger et al. 1997, Becker, Guiard et al. 2010).

Tom6p y Tom7p regulan antagónicamente el ensamblaje dinámico de TOM. Se ha considerado que Tom6p promueve su biogénesis a través de su asociación con intermediarios del montaje, mientras que Tom7p desestabiliza tanto la forma madura como intermedia del complejo TOM (Dekker, Ryan et al. 1998, Model, Meisinger et al. 2001, Dukanovic, Dimmer et al. 2009, Becker, Wenz et al. 2011).

Recientemente, se ha sugerido que la existencia de un gran poro central formado por varias moléculas Tom40p en el complejo TOM, parece estar asociada con la liberación lateral de las proteínas precursoras con estructura α -hélice, en la membrana externa (Harner, Neupert et al. 2011).

1.1.3.2. Complejo SAM

La presencia de proteínas con conformación β -barril, es una de las características clave de las membranas externas de las bacterias Gram-negativas. En las células eucariotas, estas proteínas β -barril, se encuentran exclusivamente en las membranas externas de orgánulos con origen endosimbiótico (Dolezal, Likic et al. 2006).

Las porinas, Tom40p, Sam50 y Mdm10 son las proteínas β -barril de la membrana externa mitocondrial. Los precursores de estas proteínas β -barril, son reconocidos por los receptores del complejo TOM, y guiados a través del poro Tom40p por una serie de sitios de unión hidrófobos previniendo la agregación del precursor (Künkele, Heins et al. 1998, Esaki, Kanamori et al. 2003, Wiedemann, Kozjak et al. 2003). Posteriormente, los precursores son cedidos a los complejos Tim pequeños del IMS.

Dentro de estas chaperonas Tim, nos encontramos con dos tipos de complejos homólogos de IMS, formados por Tim9p-Tim10p y Tim8p-Tim13p, respectivamente. Tim9p-Tim10p juega un papel crucial en la translocación de proteínas β -barril y transportadores de metabolitos (Curran, Leuenberger et al. 2002, Vasiljev, Ahting et al. 2004, Wiedemann, Truscott et al. 2004, Webb, Gorman et al. 2006), mientras que Tim8p-Tim13p se ha relacionado principalmente con la biogénesis de la proteína Tim23p (Paschen, Rothbauer et al. 2000, Curran, Leuenberger et al. 2002, Hoppins and Nargang

2004, Davis, Alder et al. 2007). Ambos complejos Tim pequeños se organizan en estructuras hexaméricas, formando un anillo de subunidades alternantes, que se asemejan a una hélice de seis palas con una cavidad central (Webb, Gorman et al. 2006, Beverly, Sawaya et al. 2008).

La inserción, de las proteínas con estructura β -barril en la membrana externa se produce desde el lado del IMS, iniciándose por una señal específica de importación, dentro de la última cadena β de estos precursores (Kutik, Stojanovski et al. 2008). Las proteínas precursoras, se ceden desde las proteínas Tim pequeñas al complejo SAM, en la membrana externa mitocondrial para su plegado e inserción en la bicapa lipídica (Figura 3) (Paschen, Waizenegger et al. 2003, Wiedemann, Kozjak et al. 2003, Gentle, Gabriel et al. 2004, Kutik, Stojanovski et al. 2008).

Los componentes básicos del complejo de SAM, se encuentran muy conservados entre eucariotas. Comprenden la proteína integral de membrana externa Sam50 y dos proteínas periféricas de membrana, denominadas Sam35 y Sam37 en la levadura, que se encuentran expuestas hacia la cara citosólica del complejo SAM (Kozjak, Wiedemann et al. 2003, Paschen, Waizenegger et al. 2003, Wiedemann, Kozjak et al. 2003, Gentle, Gabriel et al. 2004, Ishikawa, Yamamoto et al. 2004, Milenkovic, Kozjak et al. 2004, Waizenegger, Habib et al. 2004, Dolezal, Likic et al. 2006, Walther, Papic et al. 2009).

Sam50, está integrado en la membrana. Las medidas electrofisiológicas han demostrado que la proteína Sam50 recombinante, forma poros acuosos a través de membranas (Paschen, Waizenegger et al. 2003, Kutik, Stojanovski et al. 2008). Los modelos actuales, sugieren que Sam35 sobresale de dentro de estos poros, desde el lado citosólico del complejo SAM, proporcionando un sitio de unión para los precursores con señal β (Kutik, Stojanovski et al. 2008). De igual manera, se ha sugerido que los oligómeros de Sam50, constituyen una cámara hidrofílica dentro de la membrana externa que promueve el plegamiento de estos precursores con estructura β -barril (Paschen, Waizenegger et al. 2003, Kutik, Stojanovski et al. 2008). Finalmente, la liberación de los sustratos plegados en la bicapa lipídica es apoyada por la proteína Sam37 y el dominio N-terminal del transportador de polipéptidos asociados, o POTRA (POLypeptide-TRansport-Associated) de Sam50 (Chan and Lithgow 2008, Stroud, Becker et al. 2011). Aunque el mecanismo molecular de liberación de estos sustratos desde el complejo de

SAM, está aún por aclarar, aunque parecen ser necesarios reordenamientos profundos del complejo para permitir la liberación de una proteína β -barril desde la cámara de plegamiento, compuesta en su mayor parte por moléculas de Sam50 (Figura 3).

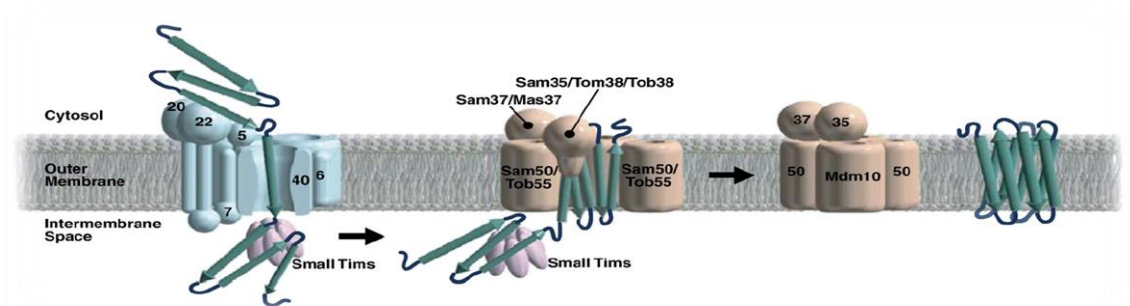


Figura 3. Vía de inserción de las proteínas con conformación β -barril en la membrana externa mitocondrial

Las proteínas de membrana con estructura β -barril son reconocidas por los receptores Tom20p y Tom22p, y son transferidas a través del canal de Tom40p hasta llegar al IMS. Una vez en el IMS, las proteínas de membrana β -barril se unen a las proteínas pequeñas Tim, que impiden su agregación. A continuación, se asocian con el complejo SAM sin Mdm10, que promueve la inserción de las proteínas β -barril en la membrana externa. Tom40p requiere Mdm10 en el complejo SAM para disociarse del complejo (Imagen tomada de Endo, T. and K. Yamano, *Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1803(6): p. 706-14 (Endo and Yamano 2010)).

1.1.3.3. Biogénesis de proteínas con estructura α -hélice

Se han identificado diferentes vías de orientación e inserción para la biogénesis, de numerosos tipos de proteínas, de membrana externa con segmentos transmembrana α -helicoidales. Los receptores Tom20p y Tom70p se anclan en la membrana a través de su dominio transmembrana N-terminal, conocido como “señal de anclado” (Becker, Pfanschmidt et al. 2008, Hulett, Lueder et al. 2008, Popov-Celeketić, Waizenegger et al. 2008).

Hasta la fecha, los mecanismos de inserción no proteicos (si necesidad del empleo de translocasas) se han relacionado solo, con la integración de proteínas de membrana externa con un solo segmento transmembrana C-terminal, como la proteína de fisión Fis1 (Setoguchi, Otera et al. 2006, Kemper, Habib et al. 2008), siendo crítica en este proceso

la composición lipídica de la membrana diana (Kemper, Habib et al. 2008). Los dominios transmembrana de estas, las señales de anclaje y la cola de anclaje de las proteínas a la membrana externa mitocondrial, son relativamente cortos e hidrófobo (Dukanovic and Rapaport 2011), y se cree que actúan como señales de importación mitocondrial. Los mecanismos por los cuales estas proteínas, no requieren de las translocasa para su inserción, siguen sin estar claros.

Los complejos TOM y SAM-Mdm10 se ha demostrado que están involucrados en la biogénesis de Tom22p (Stojanovski, Guiard et al. 2007, Thornton, Stroud et al. 2010). En contraste con lo que sucede con el ensamblaje de las proteínas β -barril de la membrana externa, no se han encontrado ningún factor del IMS que esté implicado en la biogénesis de las proteínas con topología α -hélice, lo que hace pensar, que su integración se produce desde el lado citosólico de la membrana externa.

Las tres rutas de importación, de proteínas mitocondriales, a través de la membrana externa mitocondrial descritas anteriormente se pueden resumir en la Figura 4:

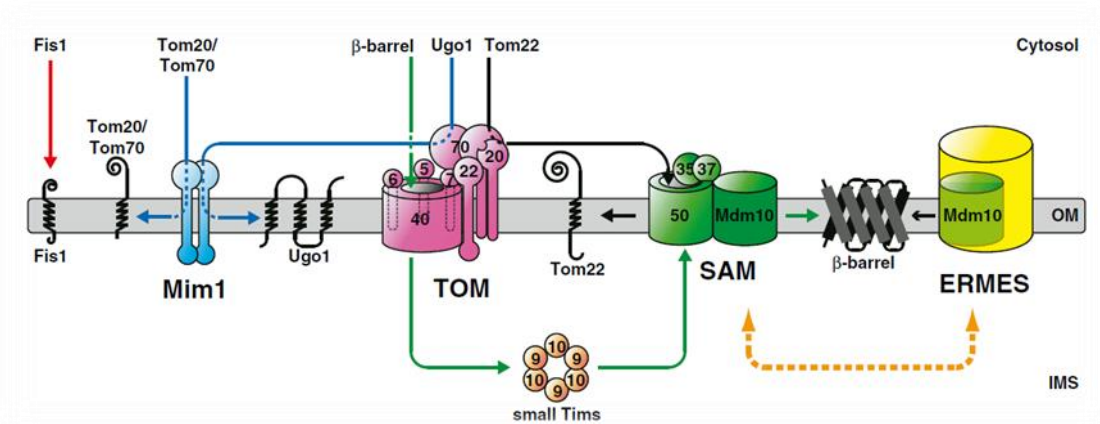


Figura 4. Resumen de los múltiples mecanismos para la integración de proteínas con diferente topología transmembrana en la membrana externa mitocondrial

(1) Unas pocas proteínas con estructura α -helicoidal de membrana externa, como Fis1, parecen insertarse sin la ayuda de translocasas. (2) Proteínas de membrana externa con un señal de anclado en el extremo N-terminal α -hélice, como Tom20p Tom70p o, (3) con múltiples segmentos α -helicoidal, como Ugo1, dependen Mim1 para su integración en la membrana. (4) Tom22p es el receptor central del complejo TOM, es reconocido por el mismo y, posteriormente, insertado en la membrana externa a través del complejo SAM. (5) El complejo SAM también media la integración de las proteínas con estructura β -barril en la membrana, estas son entregadas desde el TOM a SAM con ayuda de los pequeños complejos Tim, Tim9p-Tim10p. (6) Mdm10 tiene una doble función en el complejo de SAM y en el retículo endoplásmico, formando parte de la estructura ERMES. ERMES ha sido implicados en la biogénesis de proteínas β -barril (Imagen tomada de Dudek, J., P. Rehling, and M. van der Laan, *Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1833(2): p. 274-85 (Dudek, Rehling et al. 2013).

1.1.4. Translocasas de la Membrana Interna

Como previamente se ha descrito, en la membrana interna mitocondrial, se ha demostrado la existencia de cuatro sistemas transportadores de proteínas: MIA, TIM23, TIM22 y OXA, con funciones, en principio bien diferenciadas.

1.1.4.1. Translocación a través de la membrana interna mitocondrial

La mayoría de las proteínas precursoras mitocondriales en la levadura, llevan la ya mencionada presecuencia escindible N-terminal, que rige la orientación y la clasificación de estas proteínas a la membrana interna mitocondrial o matriz (Vögtle, Wortelkamp et al. 2009).

Estos precursores, con presecuencia, pasan a través del complejo TOM, de membrana externa y se asocian con el receptor central Tom22p por su dominio del espacio IMS (Moczko, Bömer et al. 1997, Komiya, Rospert et al. 1998). En esta primera etapa de importación, los precursores se encuentran muy próximos al complejo TIM23, de la membrana interna. La transferencia de la porción N-terminal del precursor a la proteína que forma el poro conductor de TIM23, se produce cuando la región C-terminal está aún dentro del complejo TOM. De tal manera se encuentran unidos los dos complejos

TOM y TIM23, conectados a través del polipéptido en tránsito. De forma que aparecen sitios de contacto entre las membranas externa e interna mitocondrial (Schleyer and Neupert 1985, Schwaiger, Herzog et al. 1987, Rassow, Guiard et al. 1989, Schülke, Sepuri et al. 1997). Este supercomplejo TOM-TIM23 se ha podido detectar, tanto *in vivo* como *in organello*, por la fusión de un dominio con una proteína plegada de forma estable, como la dihidrofolato reductasa, en la región C-terminal de una preproteína (Wienhues, Becker et al. 1991, Horst, Hilfiker-Rothenfluh et al. 1995, Dekker, Martin et al. 1997, Kanamori, Nishikawa et al. 1997, Sirrenberg, Endres et al. 1997, Schülke, Sepuri et al. 1999, Geissler, Chacinska et al. 2002, Chacinska, Rehling et al. 2003, Chacinska, van der Laan et al. 2010).

Tres subunidades esenciales e integrales de membrana: Tim23p, Tim17p y Tim50p, forman el núcleo catalítico del complejo TIM23, conocido como TIM23^{CORE}. Tim23p junto con Tim17p forman un poro proteico dependiente de gradiente de potencial a través de la membrana interna (Truscott, Kovermann et al. 2001, Meinecke, Wagner et al. 2006, van der Laan, Meinecke et al. 2007, Alder, Jensen et al. 2008). La región de N-terminal de Tim23p se encuentra orientada hacia el IMS, denominada Tim23pIMS, y forma parte del dominio del receptor para los precursores de TIM23 (Bauer, Sirrenberg et al. 1996, Komiya, Rospert et al. 1998). Tim17p está implicada en la estabilización y regulación del canal formado por Tim23p y Tim17p (Chacinska, Lind et al. 2005, Meier, Neupert et al. 2005, Martinez-Caballero, Grigoriev et al. 2007, Chacinska, van der Laan et al. 2010). Tim50p se ha propuesto que es la subunidad encargada de mantener el estado cerrado del canal TIM23, evitando así la fuga de iones y la disipación del gradiente de potencial, en ausencia de un precursor de proteína mitocondrial (Meinecke, Wagner et al. 2006). El gran dominio del IMS de Tim50p, Tim50pIMS, se asocia con el previamente mencionado Tim23pIMS para formar el módulo del receptor de TIM23 (Geissler, Chacinska et al. 2002, Yamamoto, Esaki et al. 2002, Mokranjac, Paschen et al. 2003, Gevorgyan-Airapetov, Zohary et al. 2009, Mokranjac, Sichting et al. 2009, Tamura, Harada et al. 2009, Marom, Dayan et al. 2011). Estudios de entrecruzamiento (Crosslinking) indican que Tim50pIMS se encuentra muy próximo a la subunidad Tom22p de TOM (Shiota, Mabuchi et al. 2011).

Esta disposición espacial permite que Tim50pIMS pueda interactuar con precursores proteicos en las primeras etapas de su importación, cuando la mayor parte del

mismo se encuentra todavía dentro del complejo TOM (Geissler, Chacinska et al. 2002, Yamamoto, Esaki et al. 2002, Mokranjac, Paschen et al. 2003). En Tim50pIMS se han identificado dos sitios de unión con los precursores. Uno de estos, se encuentra en el dominio del núcleo central, mientras que el otro, en la región C-terminal (Qian, Gebert et al. 2011, Schulz, Lytovchenko et al. 2011).

A diferencia de lo que sucede en la inserción de proteínas mitocondriales a la membrana interna, ya sea, a través de la translocasa TIM23 o de su homóloga TIM22, la translocación completa de los precursores solubles a la matriz requiere un aporte adicional de energía, procedente de la hidrólisis de ATP en la matriz mitocondrial (Figura 5.B.). Este paso, dependiente de ATP, precisa del motor de la translocasa TIM23, PAM (Presequence Translocase-Associated).

La fuerza, que dirige hacia dentro al precursor de la proteína entrante, es proporcionada por la actividad ATPasa de la proteína de choque térmico mitocondrial 70 (mtHsp70). Esta es atraída hacia el canal del complejo TIM23 y regulada por varias chaperonas que actúan junto a ella: Pam18 (Tim14p), Pam16 (Tim16p), Mge1, Tim44p y Pam17 (Figura 5) (Dudek, Rehling et al. 2013).

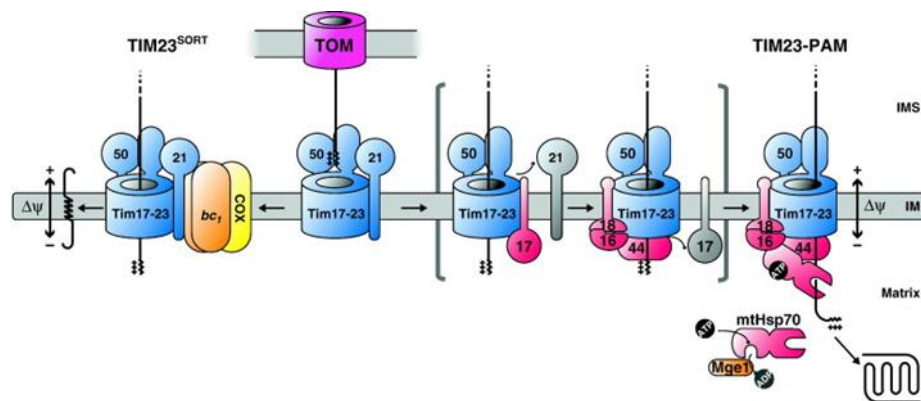


Figura 5. Mecanismos de transporte a través de la translocasa TIM23

El potencial de membrana ($\Delta\psi$) a través de la membrana mitocondrial interna (IM) impulsa la transferencia de las presecuencias de proteína desde el complejo TOM al poro de complejo TIM23, en un proceso mediado por Tim21p. Para la integración en la membrana de preproteínas, el complejo TIM23-Tim21p se asocia junto con los supercomplejos de la cadena respiratoria: citocromo bc1 y citocromo c oxidasa (COX). La translocación a la matriz requiere la activación del motor translocasa, PAM. Pam17 desplaza Tim21p desde el núcleo del complejo TIM23, y junto con Tim44 desencadena la unión del módulo de Pam16-Pam18. En la maquinaria PAM completamente activa, mtHsp70 coopera con Pam16-Pam18, Tim44p y Mge1 en el proceso de importación mediado por ATP. (Imagen tomada de Dudek, J., P. Rehling, and M. van der Laan,

Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. Biochim Biophys Acta, 2013. 1833(2): p. 274-85 (Dudek, Rehling et al. 2013).

1.1.4.2. Biogénesis de proteínas en la membrana interna

La membrana interna mitocondrial, es una de las membranas con un mayor número de proteínas conocidas. Las proteínas integrales de membrana interna abarcan la bicapa lipídica en una conformación α -hélice y se distinguen principalmente por la presencia o ausencia de presecuencias N-terminales en su forma precursora. Los precursores de proteínas de membrana interna, se translocan a la matriz mitocondrial o se insertan en la bicapa lipídica, en función de sus señales específicas de importación. Así, la presencia de señales de clasificación hidrofóbicas “aguas abajo” de la secuencia N-terminal detiene la translocación y libera lateralmente los precursores a través del complejo TIM23. Un gran número de las proteínas, que integran la membrana interna, carecen de estas presecuencias y contienen en su lugar varias señales internas de importación, que cooperan estrechamente para guiar la orientación y su integración, en la membrana interna por TIM22. Finalmente, en la membrana interna nos encontramos con OXA, para la inserción de proteínas mitocondriales, en la membrana interna desde la matriz.

Es importante resaltar, que a pesar de las maquinarias y de las distintas secuencias señales de importación de estas preproteínas, la diferencia de potencial en la membrana, es el requisito indispensable para su correcta inserción en la membrana interna mitocondrial.

1.1.4.3. Complejo TIM23

Las señales de clasificación hidrófobas se encuentran “aguas abajo” de las presecuencias N-terminales, e inducen la detención de translocación y la liberación lateral de estos precursores, en la membrana interna mitocondrial, por un mecanismo de parada

de la transferencia (Figura 5.A.) (Glick, Brandt et al. 1992, Bömer, Meijer et al. 1997, van der Laan, Meinecke et al. 2007, Bohnert, Rehling et al. 2010).

La transferencia del precursor desde el complejo TOM, a TIM23, parece ser facilitada por Tim21p, componente adicional de la translocasa e integral de membrana, y se asocia dinámicamente con TIM23^{CORE}. Tim21p. Se ha demostrado que interactúa directamente con la subunidad Tom22p del complejo TOM *in vitro* y se une a la presecuencias saliente de TOM (Chacinska, Lind et al. 2005, Mokranjac, Popov-Celeketić et al. 2005, Albrecht, Rehling et al. 2006).

Esta forma, del complejo TIM23, compuesta por TIM23^{CORE} y Tim21p, se denomina TIM23^{SPORT}. El paso del precursor dependiente de la diferencia de potencial a través TIM23^{SPORT} se apoya por el bombeo de protones del complejo III (citocromo bc1) y IV de la cadena respiratoria (citocromo c oxidasa) (Martin, Mahlke et al. 1991, van der Laan, Wiedemann et al. 2006, Wiedemann, van der Laan et al. 2007, Saddar, Dienhart et al. 2008). Estos complejos de la cadena respiratoria, se asocian entre sí para formar diferentes supercomplejos en la membrana mitocondrial interna (Schägger and Pfeiffer 2000, Pfeiffer, Gohil et al. 2003, Stuart 2008). La unión, de tales supercomplejos a TIM23^{SPORT} es en parte mediada, por la interacción de Tim21p con subunidades del complejo III (van der Laan, Wiedemann et al. 2006, Wiedemann, van der Laan et al. 2007).

1.1.4.4. Complejo TIM22

Un gran número de las proteínas que integran la membrana interna carecen de estas presecuencias N-terminal, conteniendo en su lugar varias señales internas de importación, formadas por segmentos transmembrana de las proteínas maduras, y cooperan estrechamente para guiar la orientación y su integración en la membrana. La mayoría de estas proteínas pertenecen a la familia de los transportadores metabolitos mitocondriales, como son los transportadores ADP/ATP (AAC) o de fosfato (PIC).

Pertencen a esta vía de inserción, las tres proteínas homólogas: Tim17p, Tim22p y Tim23p que son subunidades básicas esenciales de los mecanismos de translocación de proteínas, de la membrana interna. Estas proteínas, presentan una organización estructural similar a los transportadores de metabolitos, pero contienen cuatro segmentos transmembrana.

Estudios experimentales de la ruta de importación de transportadores, condujeron a la identificación de cinco etapas diferentes en este proceso (Rehling, Model et al. 2003, Rehling, Brandner et al. 2004). Debido a la naturaleza hidrofóbica de estas proteínas es necesario que chaperonas, pertenecientes a las familias Hsp70 y Hsp90, escolten a los precursores desde el citosol, evitando así su agregación y ayudando a dirigirlas a la mitocondria (etapa I) (Young, Hoogenraad et al. 2003, Zara, Ferramosca et al. 2009).

Los complejos formados por el precursor, unido a la chaperona, son reclutados en la superficie mitocondrial a través de su unión al dominio citosólico del receptor Tom70p (Young, Hoogenraad et al. 2003, Chan, Likić et al. 2006, Wu and Sha 2006, Li, Qian et al. 2009, Mills, Trewhealla et al. 2009). Se cree, que los tres módulos estructurales del precursor transportado, atraen a tres dímeros de Tom70p (fase II) (Wiedemann, Pfanner et al. 2001).

Después de unirse a Tom70p, los precursores se entregan al canal de TOM. En el lado del IMS de este poro, los precursores proteicos son capturados por los pequeños complejos Tim9p-Tim10p (Koehler, Merchant et al. 1998, Sirrenberg, Endres et al. 1998, Endres, Neupert et al. 1999, Luciano, Vial et al. 2001, Truscott, Wiedemann et al. 2002). La unión del complejo Tim9p-Tim10p a los segmentos hidrófobos de los precursores, los protege de la agregación en el medio acuoso del IMS (fase IIIa) (Curran, Leuenberger et al. 2002).

Una vez los precursores se unan a estas pequeñas proteínas Tim, se dirigen al complejo TIM22 para su inserción en la membrana interna. Esta se inicia por la asociación de una pequeña proteína Tim, Tim12p, al complejo Tim9p-Tim10p. Tim12p media en la posterior inmovilización de la translocación del intermediario desde IMS a la translocasa membrana interna (Fase IIIb) (Sirrenberg, Endres et al. 1998, Gebert, Chacinska et al. 2008). En ausencia de un gradiente de energético través de la membrana mitocondrial

interna, la biogénesis del transportador no se produce más allá de esta etapa (Rehling, Model et al. 2003).

El núcleo, del complejo TIM22, embebido en la membrana interna se compone de un poro central formado para las subunidades Tim22p y posiblemente por Tim18p, junto con Tim54p, y Sdh3 (Sirrenberg, Bauer et al. 1996, Kerscher, Holder et al. 1997, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000, Kovermann, Truscott et al. 2002, Rehling, Model et al. 2003, Gebert, Gebert et al. 2011). Tim54p expone un gran dominio hacia el IMS proporcionando un sitio de unión para el complejo Tim9p-Tim10p-Tim12p (Hwang, Claypool et al. 2007, Wagner, Gebert et al. 2008). Tim18p apoya a Tim54p en la formación de complejo TIM22 (Wagner, Gebert et al. 2008). Tim18p es homóloga a Sdh4, una subunidad integral de la membrana del complejo II, de la cadena respiratoria (succinato deshidrogenasa) (Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000, Lemire and Oyedotun 2002). En el complejo II, Sdh4 está estrechamente asociada con la subunidad Sdh3. Un reciente estudio demostró que la Sdh3 no es sólo un componente de complejo II, sino que también, es una verdadera subunidad del complejo TIM22, donde interactúa con Tim18p (Gebert, Gebert et al. 2011). Este sorprendente hallazgo, arroja luz, sobre una posible coevolución de los mecanismos de transporte, de proteínas mitocondriales y complejos de la cadena respiratoria.

Después del acoplamiento del complejo Tim9p-Tim10p-Tim12p-sustrato al receptor Tim54p, el precursor, se inserta en el complejo TIM22, que contiene dos poros, con un diámetro estimado lo suficientemente grande como para acomodar dos α -hélices cada uno (Fase IV) (Rehling, Model et al. 2003).

El cómo estas señales de importación de los precursores de proteínas transportadoras son reconocidos por el complejo TIM22, aún está por definir. Del mismo modo que tampoco se ha podido relacionar directamente al complejo TOM con TIM22. La apertura de los poros, requiere una diferencia de potencial y las señales de orientación internas, dentro del precursor.

Por último, el precursor se libera lateralmente desde el complejo TIM22, en la membrana interna, por un mecanismo aún desconocido y se ensambla en su forma

madura, funcional, cuya estructura más probable, en el caso de los transportadores de metabolitos sea un homodímero (Fase V).

1.1.4.5. Complejo OXA

Además de los sistemas de transporte de proteínas ya descritos, existe otra máquina para la inserción de proteínas mitocondriales en la membrana interna desde la matriz (Stuart 2002, Herrmann 2003). Esta estructura de transporte, es similar al sistema bacteriano para la exportación de proteínas, y requiere de Oxa1, el cual es un miembro de la familia Oxa1/YidC/Alb3 (Ott and Herrmann 2010, Wang and Dalbey 2011), conservada tanto en procariotas como en eucariotas. En estos últimos se encuentra presente en mitocondrias y cloroplastos, exclusivamente (Kuhn, Stuart et al. 2003, Herrmann and Bonnefoy 2004).

Es importante señalar, que Oxa1, no es esencial para la inserción de todas las proteínas de membrana interna codificadas en el núcleo. Pudiendo estar implicadas otras rutas de transporte a través de los complejos TIM22 y TIM23. Sin embargo, algunas de las proteínas sintetizadas como precursores en el núcleo, con más de un dominio transmembrana, como por ejemplo la subunidad Su9 de la F₀F₁-ATPasa de *N. crassa*, Oxa1, Cox18/Oxa2, Mrs2, y Yta10, que son inicialmente transportadas hasta la matriz mitocondrial a través de TOM, y TIM23 se insertan en la membrana interna utilizando al complejo OXA (Rojo, Stuart et al. 1995, Herrmann, Neupert et al. 1997, Baumann, Neupert et al. 2002, Funes, Nargang et al. 2004). Estas proteínas utilizan a mtHsp70 para evitar su agregación y ser transportadas a OXA.

Pero, a pesar de su implicación en el transporte de proteínas originadas en el citoplasma, la función más relevante del complejo OXA es la inserción en la membrana interna de proteínas codificadas en la propia mitocondria. En este sentido se ha demostrado que Oxa1 interacciona con las proteínas recién sintetizadas en la matriz mitocondrial (Hell, Neupert et al. 2001), así como, con los propios ribosomas mitocondriales (Jia, Dienhart et al. 2003). Estudios posteriores han llegado incluso a proponer que Oxa1 promueva la asociación entre el proceso de traducción y la inserción de proteínas mitocondriales directamente en la membrana interna (Jia, Dienhart et al. 2003, Szyrach, Ott et al. 2003).

Trabajos recientes indican que Oxa1, aislada de *S. cerevisiae* o producida en *E. coli*, forma canales tras su reconstitución en bicapas lipídicas (Krüger, Deckers et al. 2012). Como cabe esperar, los canales son similares a los que se forman en condiciones experimentales análogas los componentes de TIM22, TIM23 y TOM. Los estudios definen el canal OXA por un tetrámero de subunidades de Oxa1, que participan cooperando en pares, formando un dímero de dímeros.

1.1.4.6. Ruta MIA

Muchas proteínas presentes en IMS contienen múltiples residuos de cisteína que están implicados en la formación de puentes disulfuro, como Tim9p y Tim10p, o la unión de cofactores e iones metálicos, como COX17. Estos residuos de cisteína se encuentran generalmente en los motivos CX3C o CX9C. En torno a estos motivos, se ha identificado una señal de organización en el IMS mitocondrial, llamada “MISS”, que tiene por objeto guiar a las proteínas a través de la vía de inserción MIA (Milenkovic, Ramming et al. 2009, Sideris, Petrakis et al. 2009). El receptor de importación Mia40 y la oxidasa de grupos sulfhidrilo ERV1, son los componentes esenciales de su maquinaria, funcionando como un sistema de intercambio de estos puentes disulfuro en el IMS (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004, Naoé, Ohwa et al. 2004, Allen, Balabanidou et al. 2005, Mesecke, Terziyska et al. 2005, Grumbt, Stroobant et al. 2007, Milenkovic, Gabriel et al. 2007).

Mia40 forma transitoriamente puentes disulfuros intermoleculares con los precursores proteicos al salir del complejo TOM, sujetandolos en el IMS (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004, Müller, Milenkovic et al. 2008, von der Malsburg, Müller et al. 2011). En *Saccharomyces*, esta interacción entre el sustrato y Mia40, se ve facilita por su interacción transitoria con mitofilin/Fcj1, proteína integral de membrana interna (von der Malsburg, Müller et al. 2011). Mitofilin/Fcj1 está implicado en múltiples sitios de contacto entre las membranas mitocondriales, de modo que facilitan el acercamiento entre Mia40 y TOM (von der Malsburg, Müller et al. 2011).

En el siguiente paso, Mia40 cataliza la formación de puentes disulfuro intramoleculares dentro de los precursores, lo que conduce a la liberación de los mismos en el IMS y la reducción de Mia40 (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004, Grumbt,

Stroobant et al. 2007, Milenkovic, Gabriel et al. 2007, Müller, Milenkovic et al. 2008). La reoxidación de Mia40 está mediada por ERV1 que transporta electrones al citocromo c y finalmente al complejo citocromo c oxidasa, de la cadena respiratoria (Mesecke, Terziyska et al. 2005, Bihlmaier, Mesecke et al. 2007, Dabir, Leverich et al. 2007, Stojanovski, Milenkovic et al. 2008, Bien, Longen et al. 2010, Banci, Bertini et al. 2011).

1.2. Transporte de ácidos nucleicos

La evolución de las mitocondrias desde sus ancestros bacterianos hasta su integración en la célula eucariota, ha conllevado numerosos cambios en la regulación de sus actividades bioenergéticas; la dinámica de las membranas, el control de calidad de las proteínas, el establecimiento de contactos con otros orgánulos celulares y desde luego, en la organización del ADN mitocondrial, con la consiguiente transferencia de numerosos genes mitocondriales al núcleo celular.

1.2.1. Transporte de ARN

El genoma mitocondrial de algunos organismos no es capaz de proporcionar todo el conjunto completo de ARNts necesarios para la síntesis de proteínas en los ribosomas del orgánulo. En estos casos, se hace necesario que los ARNts de los que carecen, se importen desde el citoplasma. Numerosos estudios han demostrado que este proceso de transporte de ARNts está altamente conservado en la gran mayoría de los organismos (Rubio, Rinehart et al. 2008). Además de estos, el ARNr de 5S en mamíferos, también se transfiere desde el citoplasma para formar parte de los mitorribosomas (Salinas, Duchêne et al. 2008).

Al contrario de lo que ocurre en el transporte de proteínas mitocondriales, el transporte de ARNts tiene un origen evolutivo polifilético, por lo que al parecer son varios los mecanismos que participan en el transporte de estas macromoléculas, cuyos detalles se están comenzando a descubrir.

En la actualidad se están definiendo varios tipos de sistema de transporte. El primero, en levaduras, se basa en una cotranslocación de los ARNt junto con el precursor

mitocondrial de la lisil-ARNt sintetasa. Este proceso parece implicar a componentes de las translocasas mitocondriales como son el receptor Tom20p de la translocasa TOM y a la proteína Tim44p de TIM23 (Tarassov, Entelis et al. 1995). En un segundo estudio realizado en mitocondrias de patata, también ha llegado a identificar a la porina mitocondrial, VDAC, dentro de la ruta de transporte, a través de la membrana externa, desconociéndose por completo el camino a través de la interna (Salinas, Duchêne et al. 2006).

Por último, también se han descubierto evidencias de la existencia, en *Leishmania*, de un transporte de ARNt totalmente independiente a las translocasas proteicas (Rubio and Hopper 2011), del cual la mayoría de sus componentes siguen siendo desconocidos (Salinas, Duchêne et al. 2006).

1.2.2. Transporte de ADN

En diversos estudios realizados por Dietrich y colaboradores, se ha demostrado que mitocondrias aisladas, de numerosas especies de plantas, así como también de levaduras y mamíferos, son capaces de importar moléculas de ADN linear de doble cadena, de hasta 10 kb, mediante un mecanismo activo que no es dependiente de la secuencia del ADN, pero cuya eficiencia disminuye en función del tamaño del fragmento (Koulintchenko, Konstantinov et al. 2003, Koulintchenko, Temperley et al. 2006). Este ADN foráneo puede llegar a replicarse y a transcribirse en la mitocondria, siempre que contenga las secuencias reguladoras mitocondriales. Estos mismos autores, también han conseguido llevar a cabo la integración en el genoma mitocondrial del ADN importado, mediante procesos de recombinación (Mileshina, Koulintchenko et al. 2011).

La información sobre los mecanismos que subyacen en el transporte mitocondrial de ADN es muy limitada, aunque parece apuntar a la existencia de maquinarias diferentes para plantas y animales. Lo que sí se ha comprobado es que la porina mitocondrial, VDAC, de la membrana externa se postula como intermediario en todos los casos (Salinas, Duchêne et al. 2006, Rubio and Hopper 2011, Homblé, Krammer et al. 2012, Niazi, Mileshina et al. 2013). Estos datos recientes, dan sentido y confirman hoy un

antiguo trabajo de Zoratti, quien hace quince años y mediante técnicas electrofisiológicas, estableció la desconcertante capacidad de VDAC purificado para transportar una doble cadena de ADN entre ambos lados de una bicapa plana, en la que se había reconstituido (Szabò, Bãthori et al. 1998). Sin embargo, sobre el tránsito del ADN a través de la membrana interna mitocondrial apenas se tienen datos. Solo el transportador de nucleótidos ANT de esta membrana, parece participar en la ruta que sigue el ADN a través de la membrana interna de las mitocondrias de plantas (Koulintchenko, Konstantinov et al. 2003). Por el contrario y a pesar de los numerosos intentos, nada se sabe de la estructura molecular que soporta el transporte de ADN a través de la membrana interna mitocondrial en el resto de organismos (Niazi, Mileshina et al. 2013). Resulta interesante también, al tiempo que un hecho distintivo entre el transporte en animales y plantas que los primeros, al igual que las levaduras, solo sean capaces de transportar ADN de doble hélice, mientras que en plantas el transporte se puede llevar a cabo tanto con ADN monocatenario como de doble hélice. Todo lo cual apunta a la existencia de más de una estructura o forma molecular diferente para el transporte de ADN a las mitocondrias.

En cualquier caso, no cabe duda de que conocer los mecanismos moleculares que subyacen bajo la competencia natural de las mitocondrias permitirá explorar estos fenómenos para conocer los detalles de la expresión génica *in organello* y en última instancia para poder llevar a cabo la ansiada transfección mitocondrial.

1.2.3. Canal Aniónico Dependiente de Voltaje, VDAC

El transporte de ácidos nucleicos parece converger en VDAC, como puerta de entrada común a la mitocondria, a través de la cual, atraviesan la membrana externa (Koulintchenko, Konstantinov et al. 2003, Koulintchenko, Temperley et al. 2006, Salinas, Duchêne et al. 2006, Rubio and Hopper 2011, Homblé, Krammer et al. 2012, Niazi, Mileshina et al. 2013).

VDAC, ha sido el primer canal descrito en mitocondrias, mediante estudios de pinzamiento de voltaje en bicapas (Schein, Colombini et al. 1976). Como resultado de las intensas investigaciones desde su descubrimiento, muchas isoformas y ortólogos de VDAC ya han sido purificadas o, en su defecto, la secuencia de aminoácidos ha sido deducida a partir de sus respectivos cDNA's (Mihara and Sato 1985, Kleene, Pfanner et

al. 1987). Además, su caracterización electrofisiológica, bioquímica y funcional, se ha llevado a cabo en distintos organismos, desde protistas (Schein, Colombini et al. 1976), hongos (Forte, BlachlyDyson et al. 1996), plantas (Mannella 1997) e incluso en mamíferos (Linden and Gellerfors 1983).

Estructuralmente, el canal VDAC está formado por una única cadena polipeptídica, muy conservada evolutivamente (Mannella 1997, Casadio, Jacoboni et al. 2002), de 30-32 kDa (Peng, Blachlydyson et al. 1992) que adopta una conformación cilíndrica, con un diámetro de poro de aproximadamente 3,2 nm en el estado totalmente abierto. Mediante estudios realizados con distintas técnicas, tales como, RMN multidimensional, un “hibrido” de RNM y cristalografía de alta resolución en membranas lipídicas, se ha podido determinar la estructura tridimensional de este canal (Bayrhuber, Meins et al. 2008, Hiller, Garces et al. 2008, Ujwal, Cascio et al. 2008).

Los estudios estructurales de esta proteína, determinan que su estructura está formada por un barril- β y una α -hélice en la región N-terminal. Otros estudios han revelado que esta región en forma de α -hélice es importante en la actividad del canal, actuando como sensor de voltaje, y posiblemente, regulando el tránsito de iones y metabolitos a través del poro de VDAC (Koppel, Kinnally et al. 1998, Bayrhuber, Meins et al. 2008, Ujwal, Cascio et al. 2008, Hiller and Wagner 2009).

VDAC en estado nativo tiene tendencia a la oligomerización (Lindén and Gellerfors 1983, Krause, Hay et al. 1986, Zalk, Israelson et al. 2005, Keinan, Tyomkin et al. 2010, Betaneli, Petrov et al. 2012, Noskov, Rostovtseva et al. 2013), si bien, los mecanismo a través de los cuales estas moléculas de VDAC se asocian para formar dímeros, trímeros, hexámeros y oligómeros (ya sean homo o heterooligómeros) sigue siendo desconocido. La estructura nativa de VDAC presenta tres bandas de masa molecular aproximada de, 400, 350 y 250 kDa (Krimmer, Rapaport et al. 2001).

Indudablemente, es el canal mitocondrial mejor estudiado. Su función como ruta pasiva de permeabilidad, mediando el intercambio de metabolitos de pequeño tamaño (< 6000kDa) a través de la membrana externa, ya no está bien aceptada. Actualmente, VDAC presenta un papel relevante en infinidad de procesos fisiológicos; regulaciones metabólicas y energéticas.

Un aspecto interesante a nivel fisiológico, es la interacción de VDAC con proteínas metabólicas tales como hexoquinasa, glucoquinasa o creatinquinasa, relacionada con la supervivencia celular y distintos tipos de cancer (Abu-Hamad, Zaid et al. 2008, Arzoine, Zilberberg et al. 2009). Algunos autores sugieren que VDAC podría participar en un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, que estaría relacionada con la despolarización de esta membrana (De Pinto, Tomasello et al. 2007), así como, de la liberación de citocromo c durante los procesos apoptóticos (Madesh and Hajnoczky 2001). De igual forma, también se ha relacionado con las proteínas de la familia Bcl-2, que tienen una función principal en la regulación de la apoptosis (Malia and Wagner 2007, Arbel and Shoshan-Barmatz 2010).

Adicionalmente, algunos autores lo han asociado con los sitios de contacto que se establecen entre las dos membranas mitocondriales (Vysokikh and Brdiczka 2003), así como en la constitución del denominado poro de transición de permeabilidad (PTP) (Haworth and Hunter 1980, Szabo, Depinto et al. 1993, Verrier, Mignotte et al. 2003).

2. Cooperaciones entre translocasas y maquinarias celulares

En la mitocondria, coexisten alrededor de unas 1500 proteínas, la gran mayoría de estas se encuentran formando complejos como la cadena respiratoria mitocondrial o las translocasa de proteínas mitocondriales previamente descritas. Es difícil creer que todos estos componentes y maquinarias celulares puedan funcionar como unidades independientes.

Si bien, aunque desconocemos la mayor parte de los detalles que explican la necesaria cooperación de las translocasas, en una determinada ruta de transporte. Algunas interacciones como la existente entre TOM y TIM23 han podido ser determinadas con más precisión. En este caso, se ha demostrado que ambos complejos no se encuentran unidos de forma estable y firme entre sí, sino que, establecen interacciones transitorias y flexibles, mediadas por la dinámica existencia de distintas formas moleculares y/o cambios conformacionales de las mismas (Dudek, Rehling et al. 2013).

Hasta el año 2003, solo se conocían dos rutas para el transporte de proteínas a la matriz y a la membrana interna mitocondrial, respectivamente. Pero en estos últimos años, los estudios de proteómica han permitido identificar nuevos componentes, integrados en

nuevas rutas de transporte, en especial al IMS y a la membrana externa. Asimismo, estos estudios han comenzado a desvelar cómo otros componentes mitocondriales, pero también extramitocondriales, pertenecientes a maquinarias o procesos muy diversos, se pueden encontrar asociados a las diferentes translocasas (Becker, Böttinger et al. 2012, Dudek, Rehling et al. 2013).

Desde hace tiempo, se conoce que los complejos de la cadena respiratoria se ensamblan formando supercomplejos. Al supercomplejo formado por los citocromos bc₁ y citocromo c oxidasa (complejos III y IV de la cadena respiratoria), recientemente se ha sumado el intercambiador de nucleótidos ADP/ATP (ANT); pero lo más llamativo es que la translocasa TIM23 también participa en esta unión (Dienhart and Stuart 2008). La relevancia funcional de esta asociación es desconocida. Teniendo en cuenta que en ausencia de ANT se detecta una disminución en la cantidad del supercomplejo citocromo bc₁-citocromo oxidasa, una posibilidad es que ANT, favorezca este ensamblaje, aunque se desconoce si este es también el caso, para la incorporación de TIM23 a esta superestructura.

De forma similar, la subunidad 3 del complejo succinato deshidrogenasa (Sdh3), se ha postulado recientemente como una nueva subunidad de la translocasa TIM22, a través de su interacción con Tim18p, otro de sus componentes (Gebert, Gebert et al. 2011).

Por último, aunque el campo del transporte y ensamblaje de proteínas, a priori parece no tener nada que ver con el área de la morfología y dinámica mitocondriales, lo cierto es que hallazgos recientes, demuestran lo contrario; ya que al menos una fracción del complejo SAM contiene una subunidad adicional, que es Mdm10. La misión de esta proteína parece ser la de promover la asociación de Tom40p con otras proteínas del complejo TOM, como Tom22p (Yamano, Tanaka-Yamano et al. 2010). Lo que además resulta interesante es que Mdm10 no solo se localiza en el complejo SAM, sino que es una de las subunidades del complejo de morfología y dinámica mitocondrial, o MDM (Mitochondrial Dynamics and Morphology), encargado de mantener la morfología mitocondrial y de propiciar la distribución de las mitocondrias entre las células en división. Estos hechos sin duda, permiten conectar estas dos áreas de estudio. La proteínas de mantenimiento y morfología mitocondrial 1, Mmm1 (Maintenance of mitochondrial

morphology 1) es otro de los componentes de MDM, responsable de la interacción física entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias (ERMES) (Figura 6), que interacciona transitoriamente con SAM y facilita la inserción de proteínas con una hélice transmembrana como el receptor Tom22p (Becker, Pfannschmidt et al. 2008). Las uniones ER-mitocondria formadas por el complejo MDM (de Brito and Scorrano 2010, Kornmann, Osman et al. 2011) podrían participar en el transporte de lípidos (biogénesis de membranas) y Ca^{2+} (señalización), replicación del genoma mitocondrial y en el transporte de proteínas, regulando así, numerosos aspectos de la biología mitocondrial (Kornmann and Walter 2010).

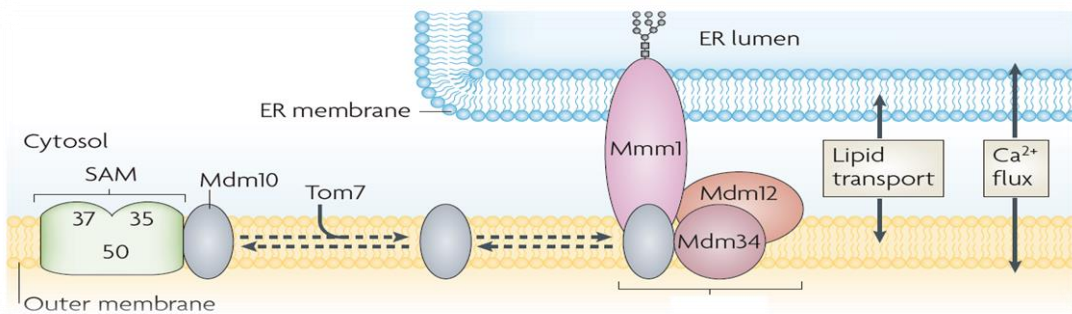


Figura 6. La proteína Mdm10 es miembro del complejo ERMES de interacción con el RE

La proteína Mdm10 se encuentra asociada con el complejo SAM, desempeñando un papel crucial en la maduración del precursor Tom40. Mdm10 también es uno de los miembros del complejo ERMES, junto con las proteínas Mdm12, Mdm34 y Mmm1, las cuales une físicamente el RE y la membrana externa mitocondrial (Imagen tomada de Schmidt, O., N. Pfanner, and C. Meisinger, *Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. 11(9): p. 655-67 (Schmidt, Pfanner et al. 2010)).

Tanto los estudios previos, sobre la biogénesis de las proteínas mitocondriales, como todas estas nuevas asociaciones e interacciones, indican que las translocasas de proteínas no funcionan como unidades independientes, sino que cooperan entre sí, pero también con otros componentes y maquinarias mitocondriales. Estas asociaciones son consistentes, en todo caso, con la integración de las translocasas mitocondriales en redes dinámicas de interacción, con un posible alcance multifuncional (Becker, Böttinger et al. 2012).

OBJETIVOS

Las mitocondrias son orgánulos omnipresentes constituidos por dos membranas, la exterior y la membrana interna, que confinan dos compartimentos acuosos, la matriz y el espacio intermembrana (IMS). Presentan un papel central en el metabolismo energético, como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos, que proporcionan a las células un gran número de metabolitos. También se encuentran involucradas en la formación de grupos hemo y sulfoféricos. El origen endosimbiótico de la mitocondria, que todavía contiene su propio genoma, que codifica una cantidad limitada de proteínas, principalmente subunidades de los complejos de la cadena transportadora, ha propiciado el desarrollo de un eficiente, aunque complejo, sistema de comunicación entre la mitocondria y la célula de la que forma parte. Así, se estima que la biogénesis y la viabilidad mitocondriales son absolutamente dependientes del transporte y la correcta localización de cerca de mil proteínas diferentes, codificadas por los genes nucleares. Este fundamental proceso celular de transporte de proteínas, resulta particularmente interesante como consecuencia de las complejas redes de interconexión, que en algunos casos, se han demostrado y en otros se presume, han de establecer las distintas translocasas o complejos transportadores de proteínas mitocondriales. Las técnicas de electroforesis en condiciones nativas y bidimensionales, así como las de co-inmunoprecipitación, pueden contribuir de forma decisiva en estos estudios.

La investigación del tráfico de proteínas a través de las membranas mitocondriales se ha convertido también, en un instrumento fundamental para entender los mecanismos que subyacen, en el mantenimiento de la biogénesis y viabilidad mitocondriales, procesos, que sustentan la presencia de este orgánulo en las células eucariotas y su participación decisiva en la viabilidad celular.

Con objeto de responder a alguna de las cuestiones fundamentales, pero todavía por resolver, acerca de la estructura y mecanismos moleculares de funcionamiento de las translocasas mitocondriales, así como, de las interconexiones que establecen estos complejos, bien sea, entre sí, como con otros componentes mitocondriales. En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos específicos relacionados con este más general:

1. Determinar el efecto que sobre la biogénesis de la translocasa de proteínas de la membrana interna mitocondrial, TIM22, ejerce cada una de las tres proteínas

integrales de membrana descritas en este complejo: Tim22p, Tim18p y Tim54p, respectivamente. Para ello y mediante aproximaciones genéticas y bioquímicas, se determinarán, los efectos estructurales sobre TIM22 inducidos por la disección molecular de esta translocasa.

2. Establecer, en su caso, la dinámica de las interrelaciones que la translocasa TIM22 pudiera mantener con distintos componentes y sistemas mitocondriales, considerados relevantes, ya sea por su abundancia o por su implicación en las diferentes rutas de transporte de proteínas mitocondriales. Para ello se analizarán:
 - a. El grado de interrelación o independencia de la biogénesis de las translocasas de la membrana interna TIM22 y TIM23, mediante el efecto producido por la eliminación de uno o más de sus componentes esenciales.
 - b. La existencia de posibles interacciones entre las dos membranas mitocondriales, a través de sus respectivas translocasas de proteínas: TOM perteneciente a la externa y TIM22 localizada en la interna. Para ello, se estudiará el efecto producido en TOM por la alteración de la biogénesis de TIM22.
 - c. La existencia de posibles interacciones entre las dos membranas mitocondriales, a través de la translocasa TIM22 en la membrana interna y de la proteína más abundante de la membrana externa, la porina mitocondrial. Para ello se estudiará el efecto recíproco de la alteración de sus respectivas biogénesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. Instrumental

- Agitador de balanceo Elmi modelo SkyLine™ Shaker S-4
- Agitador de tubos Heidolph Reax 2000
- Agitador magnético analógico BOECO Magnetic Stirrer MS-3000
- Agitador orbital Digital Heidolph modelo Unimax 1010
- Autoclave Raypa Steam Sterilizer modelo AES 110
- Balanza analítica Sartorius modelo BP 61
- Bidestilador MILLIPORE modelo Mili-Q Biocel Ultrapure Water Purifier Purification System
- Campana de flujo laminar TELSTAR modelo MH-100
- Centrífuga refrigerada Beckman Avanti modelo J-25i Floor
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R
- Congelador a -80°C Heraeus modelo HERA freeze
- Espectrofotómetro Varian Cary-300 BIO/SCAN/CONC Uv-Vis
- Equipo de electroforesis Bio-Rad modelo Mini-Protean® III Cell
- Equipo de transferencia Bio-Rad modelo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
- Frigorífico a 4°C y -20°C Edesa modelo Style
- Fuente de alimentación Bio-Rad modelo POWER PAC 300
- Fuente de alimentación ISCO Electrophoresis Power Supply modelo 494
- Incubador digital SELECTA con control de temperatura entre 30 – 80 °C y 19 litros
- Incubador Raypa Incuterm Digital ID-150 Trade
- Incubador Multitron HT Infors Triple Stacked Incubator Shaker I10102
- Lector de placas ELISA VICTOR³ Multilabel Counter modelo 1420-011
- Máquina de hielo granizado Scotsman modelo AF-80
- pH-metro modelo CRISON modelo Meter Basic 2002
- Potter Glashomogenizer B. Braun 853202
- Prensa de French® Pressure Cell Press
- Sistema transiluminador de Bio-Rad modelo Gel Doc 2000 Chemi Doc
- Sonicador BRANSON, Digital Sonifier 250 & 450

- Termostato de bloque metálico calor/frío Dry Block modelo CH-100
- Termociclador Applied Biosystems/Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler P/N N8050200
- Ultracentrífuga BECKMAN Coulter modelo L8-80M

1.2. Material Biológico

En este trabajo se han utilizado estirpes genéticamente transformadas de *Saccharomyces cerevisiae*, con el objetivo de correlacionar dichas alteraciones y la biogénesis del complejo TIM22, así como poner de manifiesto las posibles interrelaciones de esta translocasa con otros complejos o proteínas mitocondriales.

1.2.1. Mutaciones en TIM22

La estirpe Tim22_(Gal10) contienen el marcador *LEU2* y el promotor *Gal10* en el extremo 3', delante de los genes que codifican para la proteína Tim22p (cedidas por Irina Milisav del Institut für Physiologische Chemie, Univ. Munique, Alemania). En esta cepa el marcador *LEU2* permite asegurar que solamente las levaduras transformadas sobrevivan en ausencia de leucina, mientras que la inserción del promotor *Gal10* implica en que la expresión de Tim22p pasa a ser dependiente de la activación del mismo (Milisav, Moro et al. 2001). La cepa control utilizada, carece de alteraciones genéticas, lo que le permite mantener niveles inalterados de las proteínas a estudio.

Además, para el control sobre la expresión de Tim18p se han utilizado dos estirpes diferentes. La primera de ellas, Tim18p_(Gal10), en la que la expresión de Tim18p también se encuentra regulada por un promotor *Gal10* (Kerscher, Sepuri et al. 2000), y como en el caso anterior su expresión está subordinada a la de este promotor. La segunda, Δ Tim18p (RJ993), presenta la delección de la mayor parte del gen que codifica esta proteína, sustituyéndolo por el gen marcador *HIS3* (Kerscher, Sepuri et al. 2000).

Por su parte, las cepas Δ Tim54p \uparrow Tim22p y Δ Tim54 permiten analizar el carácter esencial de Tim54p mediante otras dos estirpes diferentes. La cepa Tim54p_(Leu2)Tim22p_(Trp1) (RJ967), en la cual, la mayor parte del gen que codifica a Tim54p se encuentra sustituido por el gen marcador *LEU2*, al tiempo que la inserción el plásmido *TRP1* junto al gen de *Tim22* lo que acarrea una enorme sobre expresión de la proteína Tim22p (Kerscher, Holder et al. 1997) (cedidas por R. E. Jensen, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, EEUU). Δ Tim54p es termosensible y en ella el gen que codifica a Tim54p se ha sustituido mediante recombinación con el gen marcador *ADE2* (Kerscher, Sepuri et al. 2000) (cedido por Peter Rehling, del Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Univ. Friburgo, Alemania).

Mutación	Estirpe	Abreviatura	Descriptiva	Parental	Temperatura °C	Medio de Cultivo Sólido	Medio de Cultivo Líquido
<i>Control</i>	Control	CDD38	Control		30	YPD + Gal	YPD + Gal
<i>Tim18p</i>	Tim18p _(Gal10)	CDD40	\uparrow Tim18p	CDD38	30	YPD + Gal	YPD + Gal
			\downarrow Tim18p		30	YPD + Gal	YPD – Gal
	Control	RJ993	Control		30	YPD + Gal/SDLac	YPD + Gal
		RJ992	Δ Tim18p	RJ993	30	SDLac + Gal – His	SDLac + Gal – His
<i>Tim12p</i>	Tim12p _(Gal10)	CDD52	\uparrow Tim12p		30	YPD + Gal	YPD + Gal
			\downarrow Tim12p		30	YPD + Gal	YPD – Gal
<i>Tim22p</i>	Tim22p _(Gal10)		\uparrow Tim22p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac + Gal – Leu
			\downarrow Tim22p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac – Gal – Leu
<i>Tim54p</i>		RJ967	Δ Tim54p \uparrow Tim22p		30	SDLac – Lue – Trp + Gal	SDLac – Lue – Trp + Gal
		BGSS1	Δ Tim54p		24	YPD + Gal/SDLac	SDLac + Gal

Tabla 1. Cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, complejo *TIM22*.

Con excepción de la cepa control, las distintas cepas de levadura utilizadas están transformadas genéticamente para modular la expresión de cada una de las proteínas del complejo TIM22 (Tim22p, Tim18p y Tim54p), la proteína Tim23, componente principal del complejo TIM23, así como las porinas. Los símbolos + y – representan la presencia o ausencia de cada una de las proteínas en las distintas cepas. El símbolo + +, se refiere a la sobre expresión de la proteína Tim22 y VDAC2 en las cepas Tim54 Δ Tim22 \uparrow y Δ VDAC1, respectivamente.

Para el análisis de los componentes de la translocasa de membrana interna mitocondrial, TIM23, se han utilizado las líneas celulares Tim17p_(Gal10), Tim23p_(Gal10) o Tim44p_(Gal10) en las que además del promotor *Gal10* con el gen de la proteína correspondiente se ha insertado el gen marcador *LEU2*, de forma que solamente las levaduras transformadas sobreviven en ausencia de leucina (Milisav, Moro et al. 2001) (cedidas por Irina Milisav del Institut für Physiologische Chemie, Univ. Munique, Alemania).

Por su parte, Tim50p se ha estudiado mediante una cepa de levadura construida de forma similar a las anteriores. En la que el gen *Tim50* se ha sustituido por *HIS3*. De tal forma que la expresión de Tim50p está supeditada por la presencia de galactosa en el medio de cultivo (Mokranjac, Paschen et al. 2003).

1.2.2. Mutaciones en *Tim23*

Mutación	Estirpe	Abreviatura	Descriptiva	Parental	Temperatura °C	Medio de Cultivo Sólido	Medio de Cultivo Líquido
<i>Control</i>	Control	CDD38	Control		30	YPD + Gal	YPD + Gal
<i>Tim17p</i>	Tim17p _(Gal10)		↑Tim17p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac + Gal – Leu
<i>Tim23p</i>	Tim23p _(Gal10)		↓Tim17p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac – Gal – Leu
			↑Tim23p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac + Gal – Leu
			↓Tim23p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac – Gal – Leu
		Tim23.1			24	YPD + Gal	YPD + Gal
		Mas6.1α			30	YPD + Gal	YPD + Gal
<i>Tim44p</i>	Tim44p _(Gal10)		↑Tim44p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac + Gal – Leu
			↓Tim44p		30	SDLac + Gal – Leu	SDLac – Gal – Leu
<i>Tim50p</i>	Control	wtTim50p	Control		30	YPEG	YPEG
	Tim50p _(Gal10)		↑Tim50p	wtTim50p	30	SDLac + Gal – His	SDLac + Gal – His
			↓Tim50p		24	SDLac + Gal – His	SDLac – Gal – His

Tabla 2. Cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, complejo *TIM23*.

Con excepción de la cepa control, las distintas cepas de levadura utilizadas están transformadas genéticamente para modular la expresión de cada una de las proteínas del complejo TIM22 (Tim22p, Tim18p y Tim54p), la proteína Tim23, componente principal del complejo TIM23, así como las porinas. Los símbolos + y – representan la presencia o ausencia de cada una de las proteínas en las distintas cepas. El símbolo + +, se refiere a la sobre expresión de la proteína Tim22 y VDAC2 en las cepas Tim54ΔTim22↑ y ΔVDAC1, respectivamente.

1.2.3. Mutaciones en TOM

El control sobre la expresión de las proteínas Tom40p y Tom70p, se ha llevado a cabo mediante el empleo de líneas celulares comerciales, suministradas por la casa Thermo Scientific. La estirpe Tom40p_(tet) (R1158) lleva insertado el promotor *Tet*, delante del gen que codifica a esta proteína, así como el gen marcador de resistencia frente a la geneticina. La presencia del antibiótico doxiciclina en el medio de cultivo regula la expresión de la proteína. El control frente a Tom70p, se ha llevado mediante la estirpe, Δ Tom70p (BY4743), comercial. Que al igual que la anterior contiene el gen marcador frente a la geneticina, de tal forma que solo las levaduras transformadas sobreviven en presencia del antibiótico en ausencia de Tom70p.

Mutación	Estirpe	Abreviatura	Descriptiva	Parental	Temperatura	Medio de Cultivo	Medio de Cultivo
Control	Control	YTJB24	Control		30	YPD + Gal	YPD + Gal
Tom20p		YT3B37	Δ Tom20p		30	YPD + Gal	YPD + Gal
Tom40p	Tom40p _(tet)	R1158	\uparrow Tom40p		30	YPD + G418 + Dox	YPD + G418 + Dox
			\downarrow Tom40p		30	YPD + G418 + Dox	YPD + G418 – Dox
Tom70p		BY4743	Δ Tom70p		30	YPD + G418	YPD + G418

Tabla 3. Cepas mutantes en TOM.

Con excepción de la cepa control, las distintas cepas de levadura utilizadas están transformadas genéticamente para modular la expresión de cada una de las proteínas del complejo TIM22 (Tim22p, Tim18p y Tim54p), la proteína Tim23, componente principal del complejo TIM23, así como las porinas. Los símbolos + y – representan la presencia o ausencia de cada una de las proteínas en las distintas cepas. El símbolo ++, se refiere a la sobre expresión de la proteína Tim22 y VDAC2 en las cepas Tim54 Δ Tim22 \uparrow y Δ VDAC1, respectivamente.

1.2.4. Mutaciones en VDAC

Finalmente, se han utilizado las cepas de levadura genéticamente transformadas en las distintas isoformas de VDAC presentes en *Saccharomyces* (BlachlyDyson, Song et al. 1997).

De tal forma, la estirpe Δ Por1 (M22-2) contienen el marcador *LEU2* sustituyendo la mayor parte del gen que codifica a la proteína VDAC1, lo que permite asegurar que solamente las levaduras transformadas sobrevivan en ausencia de leucina. El control sobre VDAC2 se ha estudiado mediante la sustitución de VDAC2 por el gen marcador *TRP1* (M3 – 2). Por su parte, la estirpe doble mutante Δ Por1 Δ Por2 (M22-2-1), contiene el gen marcador *LUE2* sustituyendo al gen de VDAC1, y presenta la delección de VDAC2, mediante la inserción del gen *TRP1*. De forma, que la expresión de estas proteínas se encuentra condicionada por la presencia en el medio de cultivo de los aminoácidos leucina y/o triptófano (BlachlyDyson, Song et al. 1997) (cedido por Mike Forte, University of Washington).

Mutación	Estirpe	Abreviatura	Descriptiva	Parental	Temperatura °C	Medio de Cultivo Sólido	Medio de Cultivo Líquido
Control	Control	M3	Control		30	CSM + Gal	YPD/YPG
VDAC	M3 – 2	Δ Por2	M3		30	CSM + Gal – Trp	YPD/YPG
	M22 – 2	Δ Por1			30	CSM + Gal – Leu	YPD/YPG
	M22 – 2 – 1	Δ Por1 Δ Por2			30	CSM + Gal – Trp – Leu	YPD/YPG

Tabla 4. Cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, VDAC.

Con excepción de la cepa control, las distintas cepas de levadura utilizadas están transformadas genéticamente para modular la expresión de cada una de las proteínas del complejo TIM22 (Tim22p, Tim18p y Tim54p), la proteína Tim23, componente principal del complejo TIM23, así como las porinas. Los símbolos + y – representan la presencia o ausencia de cada una de las proteínas en las distintas cepas. El símbolo + +, se refiere a la sobre expresión de la proteína Tim22 y VDAC2 en las cepas Tim54 Δ Tim22 \uparrow y Δ VDAC1, respectivamente.

1.3.Reactivos

Todos los reactivos utilizados son productos comerciales de elevada pureza y las soluciones se han preparado con agua destilada y desionizada. Los correspondientes reactivos adquiridos a las firmas comerciales que se relacionan han sido los siguientes:

Laboratorios *Bio-Rad*:

- Coomassie[®] Brilliant blue R-250
- Laemmli simple buffer 2x
- TEMED
- Protein Assay
- Proteínas estándar preteñidas de masas moleculares codificados (Control 310002748)
- Tris (Tris(hidroximetil)-aminometano)
- Tris/glicina buffer 10x
- β -mercaptoetanol

Laboratorios *CONDA*:

- Extracto de levadura
- Peptona bacteriológica
- Tricina
- Ultra pure 10x TRIS/GLYCINE/SDS
- Base nitrogenada de levadura

Laboratorios *Fisher BioReagents*[®]:

- Acrilamida:Bis-Acrilamida 29:1, solución 40%

Laboratorios *GE Healthcare*:

- Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent
- Amersham[®] Hyperfilm[®] ECL[™]
- Amersham Hybond[™] –ECL

- ECL Restore Stripping Buffer

Laboratorios *Life Technologies*TM:

- Anticuerpo α VDAC IgG
- Dynabeads[®] Co-Immunoprecipitation kit
- NativePAGE 20x cathode buffer additive
- NativePAGE 20x Running buffer

Laboratorios *MP Biomedicals*:

- Sustrato CSM
- Sustrato CSM – Leu
- Sustrato CSM – Trp
- Sustrato CSM – Leu – Trp

Laboratorios *Merck*:

- Glicina
- Metanol
- Ácido acético
- Cloruro de potasio
- EGTA

Laboratorios *Lonza*:

- Proteínas estándar preteñidas de masas moleculares codificados (nº de lote 0000211195)

Laboratorios *Panreac*:

- Dihidrógeno fosfato de potasio
- Hidróxido de potasio al 85% (Lentejas)
- Hidróxido de sodio (Lentejas)
- Azida sódica

- Cloroformo

Laboratorios *Pronadisa*:

- Agar bacteriológico americano
- Agar bacteriológico europeo

Laboratorios *Santa-Cruz*:

- Anticuerpo α Tim22p IgG
- Anticuerpo α Tim23p IgG
- Anticuerpo α Tim17p IgG
- Anticuerpo α Tim44p IgG
- Anticuerpo α Goat IgG

Laboratorios *Signa-Aldrich*:

- Ácido láctico al 60%
- Albúmina de suero bovino (BSA) del 99% de pureza
- Bicina
- Bis-Tris
- Cóctel inhibidor de proteasas 10x
- D-(+)-Glucosa
- D-Galactosa
- D-Manitol
- D-Sorbitol
- Digitonina
- Ditiotreitól
- SDS
- EDTA
- Glicerol, sigmaUltra
- Hemisulfato de adenina 99%
- HEPES
- L-Histidina

- L-Leucina
- L-Lisina
- L-Triptófano
- Liticasa de *Arthrobacter luteus* (200-1000 unidades/mg sólido)
- PMSF
- Solución Ponceau S 0,1% (P/V)
- Sacarosa
- Sulfato amónico
- Trizma[®]Base 99,9%
- Tween[®]20
- Uracilo (2,4-Dihidroxipirimidina)
- Ácido aminocaproico

1.4. Medios de cultivo

1.4.1. SDLac

El medio sintético SDLac se utiliza para la siembra y mantenimiento de la mayoría de las líneas celulares utilizadas. Este medio, de forma rutinaria se prepara 5 veces concentrado. La concentración de los distintos reactivos en el tampón 5X es:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>
<i>Ácido láctico comercial (85%)</i>	10%
<i>Yeast Nitrogen base (sin aminoácidos)</i>	0,85%
<i>Sulfato amónico</i>	2,5%

Para la preparación de 1000 ml de este tampón, se disuelven en 200 ml de agua destilada:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Ácido láctico comercial (85%)</i>	Sigma	90,08	96,4 g
<i>Yeast Nitrogen base (sin aminoácidos)</i>	Conda		8,5 g
<i>Sulfato amónico</i>	Sigma	132,14	25 g

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y el volumen final del tampón a 1000 ml con agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave, conservándose a 4 °C un tiempo máximo de 2 meses, o utilizándose de forma inmediata, evitando dos pasos de autoclave.

En función de las restricciones de crecimiento de las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, el medio SDLac 1X se suplementa con:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Adenina</i>	Sigma	27,2 mg/l
<i>Uracilo</i>	Sigma	20,0 mg/l
<i>Triptófano</i>	Sigma	33,4 mg/l
<i>Histidina</i>	Sigma	33,4 mg/l
<i>Lisina</i>	Sigma	41,6 mg/l
<i>Leucina</i>	Sigma	33,4 mg/l
<i>Glucosa</i>	Sigma	20 g/l

De forma opcional y con el fin de regular la expresión de las proteínas subordinadas a la activación del promotor *Gal10*, se pueden suplementar los medios con galactosa. Para la preparación de medios de cultivo sólido se añade justo antes del paso por autoclave agar bacteriológico europeo/americano, en las siguientes concentraciones:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>
<i>Galactosa</i>	5 g/l
<i>Agar</i>	15 g/l

Para finalizar, se esteriliza en autoclave a 115 °C durante 15 minutos. Pudiéndose conservar un máximo de 3 meses en oscuridad.

Nota: Los medios de cultivos sólidos se utilizan de forma inmediata, evitando la solidificación del agar. Por cada placa de Petri se añaden entre 20 y 30 ml de medio en atmosfera estéril, dejando solidificar a temperatura ambiente y sin tapar. Las placas

pueden conservarse una máximo de 4 meses a 4 °C. Es recomendable sellaras individualmente con Parafilm para evitar su secado.

1.4.2. YPD

La concentración de los distintos compuestos en el medio rico en nutrientes YPD es:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>Yeast Extract</i>	1%
<i>Peptona</i>	2%
<i>Glucosa</i>	2%

Para la preparación de 1000 ml de este tampón, se disuelven en 200 ml de agua destilada:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Yeast Extract</i>	Conda	10 g
<i>Peptona</i>	Conda	20 g
<i>Glucosa</i>	Sigma	20 g

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y el volumen final del tampón a 1000 ml con agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave, conservándose a 4 °C un tiempo máximo de 3 meses en oscuridad.

En función de las restricciones de crecimiento de las líneas celulares, se puede suplementar con:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>
<i>Galactosa</i>	0,5%

1.4.3. YPG

Las concentraciones de los reactivos en el medio YPD son:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>Yeast Extract</i>	1%
<i>Peptona</i>	2%
<i>Galactosa</i>	2%

Para la preparación de 1000 ml de este tampón, se disuelven en 200 ml de agua destilada:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Yeast Extract</i>	Conda	10 g
<i>Peptona</i>	Conda	20 g
<i>Galactosa</i>	Sigma	20 g

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y el volumen final del tampón a 1000 ml con agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave, conservándose a 4 °C un tiempo máximo de 3 meses en oscuridad.

1.4.4. YPEG

El medio YPEG cuenta con fuentes de carbono alternativas a la glucosa y galactosa. La concentración de los distintos compuestos es:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>Yeast Extract</i>	1%
<i>Peptona</i>	1%
<i>Glicerol</i>	2% (v/v)
<i>Etanol absoluto</i>	2% (v/v)

Para la preparación de 1000 ml de este tampón, se disuelven en 200 ml de agua destilada:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Yeast Extract</i>	Conda	10 g
<i>Peptona</i>	Conda	10 g
<i>Glicerol</i>	Sigma	20 ml
<i>Etanol absoluto</i>	Panreac	20 ml

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y el volumen final del tampón a 1000 ml con agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave, conservándose a 4 °C un tiempo máximo de 3 meses en oscuridad.

1.4.5. SD

Las concentraciones de los componentes del medio mínimo SD son:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos</i>	0,67%
<i>Sulfato amónico</i>	0,5%

Este medio requiere además ser suplementado con un 2% de fuente de carbono, que pueden ser:

<i>Medio</i>	<i>Fuente de carbono</i>
<i>SD</i>	Glucosa
<i>SGal</i>	Galactosa
<i>SG</i>	Glicerol

Este medio de cultivo se emplea para conservar las estirpes mutantes en VDAC en medio sólido. Así, además de ser suplementado con un 1,5% de agar, en función de las restricciones nutricionales de cada línea celular se suplementa con:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>CSM completo</i>	0,79 g/l
<i>CSM – Leu</i>	0,69 g/l
<i>CSM – Trp</i>	0,74 g/l
<i>CSM – Leu – Trp</i>	0,64 g/l

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y posteriormente se esteriliza en autoclave.

1.4.6. SSLac

Un medio alternativo empleado en el mantenimiento y crecimiento de las líneas celulares es el medio sintético SSLac, utiliza como fuentes de carbono la sacarosa y el ácido láctico. Las concentraciones de los distintos reactivos en este medio son:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>Yeast extract</i>	3%
<i>NH₄Cl</i>	1%
<i>NaCl</i>	0,5%
<i>KH₂PO₄</i>	1%
<i>Sacarosa</i>	0,5%
<i>Ácido láctico (85%)</i>	1,5%

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y el volumen final del tampón a 990 ml con agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave, conservándose a 4 °C un tiempo máximo de 3 meses en oscuridad.

Finalmente, en atmosfera estéril, se añaden 10 ml de una solución de Ca/Mg. Las cantidades de CaCl₂ y MgCl₂ para 300 ml de esta solución son:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (p/v)</i>
<i>Yeast extract</i>	3%
<i>NH₄Cl</i>	1%
<i>NaCl</i>	0,5%
<i>KH₂PO₄</i>	1%
<i>Sacarosa</i>	0,5%
<i>Ácido láctico (85%)</i>	1,5%

Las cantidades para la preparación de 300 ml de esta solución de sales son:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>
<i>CaCl₂</i>	Sigma	110,99	15,00 g
<i>MgCl₂</i>	Sigma	95,21	38,48 g

1.5. Tampones y soluciones de uso común

1.5.1. Aislamiento de mitocondrias

1.5.1.1. Tampón 0,1 M Tris-H₂SO₄, pH 9,4/ 10 mM ditiotreititol

El tampón Tris-H₂SO₄/ditiotreititol se emplea para reblandecer la pared celular de *Saccharomyces* como paso previo al tratamiento enzimático. Para la preparación de 500 ml de este tampón, se han disuelto en aproximadamente 100 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Tris</i>	Bio-Rad	121,14	6,057 g

Ajustando el pH a 9,4 con H₂SO₄ y hasta el volumen final de 500 ml con agua destilada. Posteriormente se ha filtrado con un tamaño de poro de 0,4 µm. El tampón debe conservarse a 4 °C un tiempo máximo de 6 meses.

El ditiotreititol previamente preparado a concentración 1 M, se conserva en alícuotas de 500 µl a -20 °C. Estas alícuotas se descongelan antes de cada uso, añadiendo el volumen previamente determinado sobre el tampón Tris-H₂SO₄ justo antes de utilizar.

1.5.1.2. Tampón Sorbitol 1,2 M, pH 7,4

Este tampón reestablece el pH a 7,4 tras el tratamiento alcalino de las células. Para la preparación de 500 ml de este tampón, se han disuelto en unos 100 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>D-Sorbitol</i>	Sigma	182,17	109,3 g

Ajustando el pH a 7,4 con HCl o KOH, y el volumen final a 500 ml con agua destilada. Posteriormente se filtra con un poro de 0,22 µm en atmosfera estéril y se guarda en frasco estéril. El tampón debe conservarse a 4 °C un tiempo máximo de un mes.

1.5.1.3. Tampón Sorbitol 1,2M/ fosfato 20 mM, pH 7,4

El tampón Sorbitol/Fosfato posee las condiciones óptimas para el mantenimiento de la actividad enzimática de la liticasa. Para la preparación de 500 ml de este tampón, se disuelven en 100 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>D-Sorbitol</i>	Sigma	182,17	109,3 g
<i>KH₂PO₄</i>	Panreac	136,09	1,361 g

Posteriormente, se ajusta el pH a 7,4 con KOH y el volumen a 500 ml con agua destilada. Para finalizar, se conserva en frasco estéril tras su filtración con un poro de 0,22 µm de tamaño, en atmosfera estéril, hasta un máximo de 3 meses a 4 °C.

1.5.1.4. Tampón de Homogenización

Es el tampón en el que se produce la ruptura física de los esferoplastos obtenidos tras el tratamiento enzimático. Presenta las condiciones y el pH óptimos para el mantenimiento de la actividad funcionalidad de las mitocondrias. Las concentraciones de los distintos reactivos que contiene el tampón son:

Reactivo	Concentración
<i>D-Sorbitol</i>	0,6 M
<i>Tris</i>	10 mM
<i>EDTA</i>	1 mM
<i>BSA</i>	0,2% (p/v)
<i>PMSF</i>	1 mM

Para la preparación de 500 ml de este tampón, se disuelven en 100 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>D-Sorbitol</i>	Sigma	182,17	54,65 g
<i>Tris</i>	Bio-Rad	121,14	0,606 g
<i>EDTA</i>	Sigma	292,2	0,146 g

Se ajusta el pH a 7,4 con KOH y el volumen final del tampón a 500 ml con agua destilada. Posteriormente se filtra con un poro de 0,22 μm en atmosfera estéril, conservándose a 4 °C un tiempo máximo de 2 meses.

El BSA necesario para la preparación de este tampón, ha de añadirse justo antes de utilizar y sin filtrar la disolución una vez se ha disuelto. Los cálculos de la cantidad de BSA para la preparación de 500 ml de tampón son los siguientes:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>BSA</i>	Sigma	1,0 g

Por su parte, el PMSF es conveniente tenerlo disuelto previamente a una concentración de 100 mM. El PMSF es insoluble en agua, por tanto hay que disolverlo en etanol. Para la preparación de 20 ml de PMSF, se han disuelto en 10 ml de etanol:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>PMSF</i>	Sigma	174,2	0,348 g

Ajustando finalmente el volumen a 20 ml con etanol. El “stock” de PMSF debe conservarse a temperatura ambiente, evitando así la precipitación del soluto.

Nota: El PMSF tiene la función de inhibidor de proteasas. Su actividad dura aproximadamente una hora, por lo que se ha de añadir junto al “tampón de Homogeneización” justo antes de utilizarlo.

1.5.1.5. Gradiente de sacarosa

El gradiente de sacarosa utilizado para la purificación de los extractos mitocondriales se ha preparado sobre el medio tampón, “Tampón EM”. Este tampón

presenta un pH de 7,4, óptimo para el mantenimiento de la funcionalidad y la conservación de las mitocondrias. Las concentraciones de los distintos reactivos en el tampón EM son:

Reactivo	Concentración
<i>HEPES</i>	10 mM
<i>EDTA</i>	1 mM

En la preparación de 250 ml de este tampón, se disuelven en aproximadamente 100 ml de agua destilada las siguientes cantidades de reactivo:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>HEPES</i>	Sigma	238,30	0,596 g
<i>EDTA</i>	Sigma	292,2	0,073 g

Ajustando a un pH de 7,4 con HCl y a un volumen final de 250 ml con agua destilada. Posteriormente se filtra en atmosfera estéril con un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro. El tampón no debe de conservarse más de 2 meses, y siempre a 4 °C.

El gradiente de sacarosa consta de cuatro fases con concentraciones del 60, 32, 23 y 15% de sacarosa respectivamente. Como norma general, para la preparación de este gradiente, se han preparado 50 ml al 60% de sacarosas en tampón EM. Tomando esta como disolución madre, para la preparación del resto de concentraciones del gradiente. Para la preparación de 50 ml de solución concentrada de sacarosa, se disuelven en aproximadamente 35 ml de tampón EM:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Sacarosa</i>	Sigma	342,30	30,00 g

Posteriormente, y tras ajustar el volumen a 50 ml con tampón EM, este se filtra con un poro de 0,4 μm , evitando así la presencia de posibles cristales de sacarosa no disueltos. Las distintas fases del gradiente pueden conservarse a 4 °C durante un día.

1.5.1.6. Tampón 2X

El tampón 2X genera el ambiente hipertónico necesario para la separación de las membranas mitocondriales. La concentración de los distintos reactivos en el tampón 2X es:

Reactivo	Concentración
<i>Sacarosa</i>	460 mM
<i>Manitol</i>	140 mM
<i>HEPES</i>	10 mM

Para preparar 50 ml de tampón, se disuelven en 35 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Sacarosa</i>	Sigma	342,30	7,873 g
<i>Manitol</i>	Sigma	182,17	1,275 g
<i>HEPES</i>	Sigma	238,30	0,119 g

Una vez disueltos los distintos reactivos, se ajusta el pH a 7,4 con HCl y el volumen final a 50 ml con agua destilada. Posteriormente se filtra en atmosfera estéril con un tamaño de poro de 0,22 μm .

El tampón debe conservarse a 4 °C un tiempo máximo de 2 meses.

Nota: Por su parte, el Tampón 1X, se prepara a partir del 2X previamente preparado. Diluyendo el tampón 2X al 50% con agua destilada esterilizada en atmosfera estéril.

1.5.1.7. Tampón Sacarosa 35%/Tris 10 mM, pH 7,4

Este tampón es necesario para la separación de las dos membranas mitocondriales. Para preparar 50 ml de este tampón, se disuelven en unos 35 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Tris (pH 7,4)</i>	Bio-Rad	121,14	0,061 g
<i>Sacarosa</i>	Sigma	342,30	17,50 g

El pH a 7,4 se ajusta con HCl, y el volumen a 50 ml con agua destilada, filtrando finalmente el tampón con un tamaño de poro de 0,4 μm , en atmosfera estéril. No debe de conservarse más de un día y siempre a 4 °C.

1.5.2. Lisado mitocondrial

1.5.2.1. NativePAGE Sample Buffer 4X

NativePAGE Sample Buffer 4X es el nombre comercial del tampón empleado en la lisis mitocondrial, para el mantenimiento de los complejos multiproteicos estructuralmente y evitar la agregación de los mismos. Este, de forma habitual, se ha preparado manteniendo las concentraciones comerciales:

Reactivo	Concentración
<i>Bis-Tris</i>	50 mM
<i>HCl</i>	0,6 N
<i>NaCl</i>	50 mM
<i>Glicerol</i>	10% (p/v)
<i>Ponceau S</i>	0,001%

Para la preparación de 10 ml de NativePAGE Sample Buffer 4X, se disuelven en unos 6 ml de agua miliQ:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Bis-Tris (pH 7,2)</i>	Sigma	209,24	0,418 g
<i>HCl</i>	Panreac	36,46	0,107 ml
<i>NaCl</i>	Panreac	58,44	0,400 g
<i>Glicerol</i>	Sigma	92,09	0,117 g
<i>Ponceau S</i>	Sigma	760,6	0,4 ml

Una vez disueltos los distintos reactivos, se ajusta el pH a 7,2 y el volumen a 10 ml con agua miliQ. Posteriormente se filtra con un poro de 0,4 μm . El tampón puede conservarse a 4 °C un tiempo máximo aproximado de 6 meses.

1.5.2.2. Tampón de lisis mitocondrial, 0,5% de digitonina (p/v)

Para la preparación de 500 µl de tampón de lisis mitocondrial, se disuelven:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>NativePAGE Sample Buffer 4X</i>			125 µl
<i>Digitonina</i>	Sigma		2,5 mg
<i>PMSF (100 mM)</i>	Bio-Rad	174,20	5 µl
<i>Agua miliQ</i>		18,00	370 µl

Tanto la digitonina como el PMSF han de agregarse justo antes de utilizar y conservarse en hielo durante un periodo no superior a 1 hora.

1.5.3. Cuantificación de proteínas

1.5.3.1. Solución de BSA

La solución patrón de BSA permite mediante métodos analíticos determinar la concentración de proteínas de una determinada muestra, comparando una concentración conocida de proteína sérica bovina frente a una preparación mitocondrial.

Como norma general, la solución patrón de BSA se prepara a una concentración de 1 mg/ml. De tal forma que para la preparación de 10 ml de esta, se han de disolver en 5 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>BSA</i>	Sigma	0,010 g

Finalmente, se ajusta el volumen final a 10 ml con agua destilada. Conservando esta preparación en alícuotas de 100 µl a -20 °C.

1.5.3.2. Reactivo de Bradford

El reactivo de Bradford es suministrado por la casa comercial Bio-Rad, bajo el nombre comercial “Protein Assay”. Este reactivo se comercializa a concentración 5X. Se prepara siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1.5.4. Electroforesis desnaturalizante

1.5.4.1. Tampón de carga de la muestra

El tampón de carga se emplea para aumentar la densidad de la muestra, así como para mantener desnaturalizada las proteínas y conferirles la carga negativa necesaria para facilitar su desplazamiento a lo largo del gel de acrilamida, como consecuencia del efecto producido por la acción simultánea del SDS (dodecil sulfato sódico) el cual confiere carga negativa a las muestras y del agente reductor β -mercaptoetanol.

El tampón de la carga usado es proporcionado por la casa comercial Bio-Rad, Laemmli 2X Sample Buffer, cuya composición se encuentra basada en el método Laemmli (Laemmli 1970). Este reactivo comercial se prepara siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El tampón debe conservarse a 4 °C durante un periodo de tiempo no superior al año.

1.5.4.2. Tampón TGS (Tris/Glicina/SDS)

El tampón Tris/Glicina/SDS o TGS es utilizado como tampón en electroforesis en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE.

El tampón TGS usado es proporcionado por la casa comercial Conda, Ultra Pure 10X Tris/Glicina/SDS. Este reactivo comercial se encuentra en concentración 10X. Este reactivo comercial se prepara siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El tampón debe conservarse a 4 °C durante un periodo de tiempo que no exceda el año.

1.5.4.3. Tampón de transferencia (Tris/Glicina/Metanol)

El tampón Tris/Glicina/Metanol se ha utilizado tanto como tampón de transferencia en electroforesis desnaturalizantes, SDS-PAGE, como para la transferencia de geles de electroforesis BN-PAGE. Este tampón facilita la salida de las proteínas del gel y su correcta fijación en la membrana de PVDF.

Este tampón es proporcionado por la casa comercial Bio-Rad, 10X Tris/Glycine Buffer, a una concentración 10X.

Para la preparación de un litro de tampón de transferencia el volumen de los distintos reactivos es:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>
<i>10X Tris/Glycine Buffer</i>	Conda	100 ml
<i>Agua miliQ</i>		700 ml
<i>Metanol</i>	Panreac	200 ml

El tampón debe conservarse a 4 °C un durante un periodo de tiempo inferior al año.

1.5.4.4. Geles SDS-PAGE

1.5.4.4.1. Tampón Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8

El tampón Tris/HCl 1,5 M y pH 8,8 es el empleado en la preparación del gel separador en electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE). Debido a su pH ayuda al SDS a mantener la carga negativa alrededor de las proteínas, facilitando el desplazamiento de las proteínas a lo largo del gel.

Para preparar 500 ml de tampón, se disuelven en 300 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Tris (pH 8,8)</i>	Bio-Rad	121,14	90,85 g

Ajustando finalmente tanto pH a 8,8 con HCl como volumen a 500 ml con agua destilada. Este tampón se filtra con un poro de 0,4 μm y debe conservarse a 4 °C un tiempo máximo de 6 meses, comprobando periódicamente que el pH es el adecuado.

1.5.4.4.2. Tampón Tris/HCl 1,0 M, pH 6,8

El tampón Tris/HCl 1,0 M y pH 6,8 se emplea en la preparación del gel empaquetador de la SDS-PAGE. Su pH facilita el rápido desplazamiento de las proteínas.

En la preparación de 500 ml de este tampón, se disuelven en 300 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Tris (pH 6,8)</i>	Bio-Rad	121,14	60,57 g

A continuación se ajusta el pH a 6,8 con HCl y el volumen hasta 500 ml con agua destilada. Filtrando el tampón con un tamaño de poro de 0,4 μm y conservándolo a 4 °C un tiempo máximo de 6 meses, comprobando periódicamente que el pH es el adecuado.

1.5.4.4.3. Solución SDS 10%

La solución de SDS confiere la carga negativa adecuada a la muestra para facilitar su desplazamiento en el gel de acrilamida. Para la preparación de 100 ml de este tampón, se disuelven en 50 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>SDS</i>	Sigma	288,372	10,00 g

Finalmente, se ajusta el volumen a 100 ml con agua destilada, conservándose a temperatura ambiente.

Nota: Una bajada de las temperaturas puede provocar la precipitación del SDS en forma de cristales blancos. Esto se subsana atemperando la disolución previamente.

1.5.4.4.4. Solución PSA 10% (Persulfato amónico)

El persulfato amónico actúa como catalizador de la polimerización en los geles de acrilamida. En la preparación de 5 ml de este tampón, se disuelven en unos 3 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>PSA</i>	Sigma	132,14	0,5 g

Ajustando el volumen final a 5 ml con agua destilada. Finalmente, la solución se divide en alícuotas de 100 μ l y se conservará a -20 °C durante un periodo no superior a un año. Una vez descongelada el alícuota se puede conservar a 4 °C hasta un máximo de 7 días.

1.5.5. *Electroforesis nativa*

1.5.5.1. *Reactivo G-250 sample additive*

El Reactivo G-250 Sample Additive permite reducir drásticamente la agregación proteica y aumentar la resolución de los complejos de proteínas de membrana. Las concentraciones de los diferentes reactivos en este tampón son:

Reactivo	Concentración
<i>Brilliant blue G</i>	5%
ϵ -amino-n-caproic acid	0,5 M
<i>Bis-Tris (pH 7,0)</i>	100 mM

Para la preparación de 10 ml de este reactivo, se ha disuelto en 8 ml de agua miliQ:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Brilliant blue G</i>	Bio-Rad		0,5 g
ϵ -amino-n-caproic acid	Sigma	131,17	1,486 g
<i>Bis-Tris (pH 7,0)</i>	Sigma	209,24	0,209 g

Tras disolver completamente los distintos reactivos, se ajusta el pH a 7,0 y el volumen hasta 10 ml con agua miliQ. Filtrando la solución para eliminar posibles precipitados con un poro de 0,4 μ m. Una vez preparadas alícuotas de 50 μ l estas se pueden conservar refrigeradas a 4 °C hasta un mes y a -20 °C un tiempo que no exceda el año.

1.5.5.2. *Tampón de la muestra para BN-PAGE*

Este tampón presenta un pH y concentración de sales óptimas para mantener la integridad de los complejos multiproteicos, así como le confiere a las proteínas la carga negativa necesaria para su migración electroforética. Para la preparación de 50 μ l de muestra para BN-PAGE, los volúmenes tomados son los siguientes:

Reactivo	Cantidad
<i>Muestra</i>	Volumen: V
<i>G-250 Sample Additive</i>	1,5 µl
<i>NativePAGE Sample Buffer 1X</i>	48,5 – V

Para evitar problemas relacionados con el bloqueo de la membrana, en determinados experimentos, se ha omitido el reactivo G-250 Sample Additive.

La muestra una vez preparada se podrá conservar un tiempo máximo de un mes a -80 °C.

1.5.5.3. NativePAGE™ 20X Running Buffer

Tampón comercial proporcionado por la casa Invitrogen. El tampón concentrado debe conservarse a temperatura ambiente un tiempo máximo de 12 meses, transcurrido este tiempo, es posible que se produzca un desplazamiento defectuoso de los complejos multiproteicos.

1.5.5.4. NativePAGE™ 20X Cathode Buffer Additive

Al igual que el anterior es proporcionado por Invitrogen, en concentración 20X. El tampón debe conservarse a temperatura ambiente durante un tiempo que no exceda los 12 meses.

1.5.5.5. Dark Blue Cathode Buffer

El tampón Dark Blue Cathode Buffer se utiliza en el lavado de los pocillos, y es el tampón que contienen estos al comenzar la electroforesis BN-PAGE. Posee un 0,02%

de reactivo Brilliant blue G-250, el cual facilita el desplazamiento de las muestras a su vez que previene su agregación.

Para la preparación de 2 ml de este tampón, se diluyen con 1,8 ml de agua miliQ:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>Running Buffer</i>	Invitrogen	100 µl
<i>Cathode Buffer Additive</i>	Invitrogen	100 µl

El tampón puede conservarse a 4 °C un tiempo máximo de 2 meses.

1.5.5.6. Light Blue Cathode Buffer

El tampón Light Blue Cathode Buffer se emplea como primer cátodo en la electroforesis BN-PAGE. Para la preparación de 150 ml (volumen interno de la cubeta de electroforesis, cátodo):

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>Running Buffer</i>	Invitrogen	7,5 ml
<i>Cathode Buffer Additive</i>	Invitrogen	0,75 ml
<i>Agua destilada</i>		141,75 ml

El tampón debe conservarse a 4 °C un tiempo máximo de 2 meses, y bajo ningún concepto debe reutilizarse.

1.5.5.7. Tampón Running Buffer

El tampón Running Buffer se emplea como cátodo en la segunda etapa de la electroforesis BN-PAGE. A diferencia de los 2 tampones anteriores empleados en la BN-PAGE, no posee reactivo Brilliant blue G-250. Para la preparación de 600 ml de tampón Running Buffer los volúmenes utilizados son:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>NativePAGE 20X Running buffer</i>	Invitrogen	30 ml
<i>Agua miliQ</i>		570 ml

El tampón debe conservarse a 4 °C un durante un periodo de tiempo inferior al mes.

1.5.5.8. Tampón de transferencia

Como tampón de transferencia se han utilizado de forma indistinta dos tipos de tampones. El tampón Tris/Glicina/Metanol o el NuPAGE Transfer Buffer.

El tampón de transferencia NuPAGE Transfer Buffer está compuesto principalmente por Bicina, Bis-Tris y metanol, en concentraciones:

Reactivo	Concentración
<i>Bis-Tris (pH 7,2)</i>	50 mM
<i>Bicina</i>	50 mM
<i>EDTA</i>	2 mM
<i>Metanol</i>	10% (v/v)

Para la preparación de 200 ml de NuPAGE Transfer Buffer, se disuelve en 100 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Bis-Tris (pH 7,2)</i>	Sigma	209,24	2,092 g
<i>Bicina</i>	Sigma	163,17	1,632 g
<i>EDTA</i>	Sigma	292,2	0,065 g

Ajustando el pH a 7,2 y finalmente el volumen a 200 ml con agua destilada.

A la hora de utilizar el tampón, este se divide en dos fracciones de 150 y 50 ml. La mayor de ellas (150 ml) se mezcla con 16,7 ml de metanol, empleándose como solución de transferencia. Por su parte, a la fracción menor (50 ml) se le añade SDS hasta

alcanzar el 0,1%. En esta solución con SDS se incuba el gel durante 10 minutos como paso previo a la transferencia.

1.5.5.9. Geles BN-PAGE

1.5.5.9.1. Tampón Gel 3X

Este tampón se emplea en la preparación del gel para electroforesis BN-PAGE. Debido a su pH 7,0 mantiene las estructuras nativas de los complejos multiproteicos, evitando su desnaturalización. Las concentraciones de los distintos reactivos en el tampón 3X:

Reactivo	Concentración
<i>Bis-Tris (pH 7,0)</i>	150 mM
ϵ -amino-n-caproic acid	200 mM

Para preparar 25 ml de este tampón, se disuelven en 15 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Bis-Tris (pH 7,0)</i>	Sigma	209,24	0,784 g
ϵ -amino-n-caproic acid	Sigma	131	0,655 g

Ajustando posteriormente el pH a 7,0 con HCl y el volumen a 25 ml con agua destilada. Este tampón antes de ser utilizado se filtra con un tamaño de poro de 0,4 μ m. El tampón debe conservarse a 4 °C un tiempo máximo de una semana. Transcurrido este tiempo las propiedades tamponantes se pierden.

1.5.5.9.2. Acrilamida/bisacrilamida

La solución de acrilamida/bisacrilamida empleada en experimentos de BN-PAGE tiene una concentración de 49,5% T, 3% C. Para la preparación de 100 ml de

acrilamida/bis a esta concentración, se disuelven en 90,91 ml de acrilamida/bis comercial (40% T, 3,3% C) las siguientes cantidades de reactivo:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>Acrilamida</i>	Bio-Rad	9,215 g

Ajustando el volumen final a 100 ml con agua destilada. Posteriormente se filtra con un tamaño de poro de 0,4 μm para eliminando posibles restos de acrilamida insoluble.

Nota: La acrilamida es neurotóxica, por lo que al pesar el reactivo sólido deben usarse guantes y mascarilla, así como limpiar cualquier residuo de acrilamida de la balanza y sus alrededores.

1.5.6. Tinción de geles de poliacrilamida

1.5.6.1. Azul de Coomassie

La solución azul de Coomassie contiene agentes fijadores de las proteínas tales como el metanol y ácido acético, y a su vez el reactivo Coomassie G-250 se une a las moléculas de proteína, permitiendo su visibilidad dentro del gel. Las concentraciones de los distintos reactivos en esta solución son las siguientes:

Reactivo	Concentración (v/v)
<i>Brilliant blue G</i>	0,1% (p/v)
<i>Metanol</i>	50%
<i>Ácido acético</i>	10%

En la preparación de 100 ml de solución azul de Coomassie, se disuelve en 30 ml de agua destilada:

Reactivo	Casa comercial	Masa molecular	Cantidad
<i>Brilliant blue G</i>	Bio-Rad		10 g
<i>Metanol</i>	Panreac	32,04	50 ml
<i>Ácido acético</i>	Sigma	60,05	10 ml

Ajustando posteriormente el volumen a 100 ml con agua destilada y se filtra en papel.

Nota: Es importante cerrar correctamente el bote, evitando así la evaporación del ácido acético y del metanol, lo cual podría reducir sus propiedades para la fijación y tinción de las proteínas en el gel.

1.5.6.2. Solución de desteñido

Esta disolución facilita la eliminación de los restos de reactivo “Brilliant blue G” entrelazados en la malla de poliacrilamida tras su previa tinción. Del mismo modo fija y mantiene la coloración sobre las proteínas. Las concentraciones de los reactivos en la solución desteñidora son las siguientes:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (v/v)</i>
<i>Metanol</i>	20%
<i>Ácido acético</i>	10%
<i>Glicerol</i>	1,0%

Para la preparación de 500 ml de solución desteñidora, se disuelven en 200 ml de agua destilada:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Metanol</i>	Panreac	32,04	100 ml
<i>Ácido acético</i>	Sigma	60,05	50 ml
<i>Glicerol</i>	Sigma	92,09	5 ml

Ajustando el volumen final a 500 ml con agua destilada.

1.5.7. Western Blot

1.5.7.1. Tampón TBS/Tween

El tampón TBS/Tween se utiliza como solución de lavado, solución para la dilución de anticuerpos y como solvente en la solución de bloqueo. Su pH de 8,0 permite mantener la estabilidad de las proteínas a la vez que evita la liberación de estas de la membrana (PVDF). Este tampón de forma habitual se prepara en concentración 5X, y tras su dilución se suplementa con un 0,1% de Tween[®]20. La concentración de los distintos reactivos en el tampón 5X es:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>
<i>Tris/HCl (pH 8,0)</i>	0,1 M
<i>NaCl</i>	0,625 M

Así, para preparar 500 ml de tampón TBS 5X, se disuelven en 200 ml de agua destilada:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Tris (pH 8,0)</i>	Bio-Rad	121,14	6,057 g
<i>NaCl</i>	Sigma	58,44	18.26 g

Ajustando el pH a 8,0 y finalmente el volumen a 500 ml con agua destilada.

Para la preparación del tampón 1X, por cada parte de tampón 5X TBS se añaden cuatro partes de agua. Una vez diluido se suplementa con Tween[®]20 al 0,1%. Este tampón debe conservarse a 4 °C un máximo de un año.

1.5.7.2. Solución de bloqueo

Las membranas de PVDF empleadas en los experimentos de Western blot poseen una gran afinidad por las proteínas, lo que resulta una ventaja a la hora de realizar la transferencia de proteínas pero un gran problema en pasos posteriores como en la detección de anticuerpos. Para evitar estos problemas se utiliza la solución de bloqueo

reduciendo el “background”. Para la preparación de 40 ml de solución de bloqueo, se disuelven en unos 10 ml de tampón TBS/Tween:

<i>Reactivo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Leche desnatada en polvo</i>	Central lechera Asturiana	2 g

Para disolver la leche en polvo se agita la mezcla durante un minuto vigorosamente en vortex. Ajustando el volumen a 40 ml con TBS/Tween, agitando la solución antes de utilizar.

1.5.8. Revelado de geles

1.5.8.1. Solución Reveladora y Fijadora

Ambas soluciones son proporcionadas por la casa comercial Kodak, en concentración 5X. Para preparar 50 ml de estas soluciones se sigue el protocolo descrito por el fabricante.

Una vez preparadas ambas disoluciones, se deben conservar en una botella totalmente opaca y solo debe ser utilizado en oscuridad. Estos reactivos son extremadamente tóxicos y nocivos para el medio ambiente, por lo que su eliminación ha de realizarse en lugares autorizados para este fin.

1.5.9. Electroforesis de ácidos nucleicos

1.5.9.1. Tampón de electroforesis TBE

El tampón de electroforesis TBE o Tris/Borato/EDTA, es proporcionado por la casa comercial CONDA, bajo el nombre de 10X TBE Ultra Pure Buffer Concentrate, en concentración 10X. Para preparar 500 ml de tampón TBE 1X, se siguen las recomendaciones del fabricante. Este tampón puede conservarse a 4 °C hasta 6 meses.

1.6. Anticuerpos

En este estudio se han utilizado una serie de anticuerpos obtenidos del suero de conejos (policlonales) inmunizados. Como control de carga se ha empleado el anticuerpo monoclonal frente a la porina mitocondrial, VDAC (Invitrogen), la proteína más abundante de membrana externa. Para evaluar los niveles de expresión de los componentes de las translocasas de membrana interna y externa, se han utilizado anticuerpos frente a las proteínas Tim17, Tim22, Tim23 y Tim44 (Santa Cruz biotechnology), Tim18, Tim54 y Tomm40p (Robert Jensen, Johns Hopkins Hospital). La tabla 5 resume las diluciones de anticuerpos utilizadas en este estudio:

Anticuerpo	Especificidad	Origen	Dilución	Experimento	Procedencia
VDAC	"Monoclonal"	Ratón	1/10000 ó 1/5000	SDS/BN	Invitrogen
SubII CoxIV		Ratón	1/10000 ó 1/5000	SDS/BN	Invitrogen
Tim22p		Cabra	1/10000 ó 1/5000	SDS/BN	Santa-Cruz
Tim23p		Cabra	1/10000	SDS/BN	Santa-Cruz
Tim17p		Cabra	1/10000 ó 1/5000	SDS	Santa-Cruz
Tim44p		Cabra	1/5000	SDS	Santa-Cruz
Tim50p	Policlonal	Conejo	1/10000 ó 1/5000	SDS/BN	R. Jensen
Tim18p		Conejo	1/3000	SDS/BN	R. Jensen
Tim54p		Conejo	1/3000	SDS/BN	R. Jensen
Tom40p		Conejo	1/4000	SDS/BN	R. Jensen
Tom20p		Conejo	1/4000	SDS	R. Jensen
ANT		Conejo	1/5000	SDS/BN	A. Dietrich
SDH3		Conejo	1/3000	SDS	A. Dietrich

Tabla 5. Diluciones de anticuerpos primarios

Los anticuerpos se diluyeron en tampón PBS-Tween 1X (100 mM PBS, 0,5% Tween20, pH 7,2) y conservados a -20°C .

Por su parte, los anticuerpos secundarios utilizados se resumen en la siguiente tabla:

<i>Anticuerpo</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Procedencia</i>
<i>Ratón</i>	Conejo	1/5000	Invitrogen
<i>Cabra</i>	Vaca	1/3000	Santa-Cruz
<i>Conejo</i>	Cabra	1/10000	Cell Signaling

Tabla 6. Diluciones de anticuerpos secundarios

Los anticuerpos se diluyeron en tampón PBS-Tween 1X (100 mM PBS, 0,5% Tween20, pH 7,2) y conservados a 4 °C.

1.7. Primers

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio han sido sintetizados por Sigma-Genosys (Tabla 7). Todas las muestras se han analizado en paralelo con los genes *ACT1* y *UBC6*.

Gen	Secuencia de Primer (5'→3')	Pb
<i>Housekeeping</i>		
<i>ACT1</i>	F: ATTATATGTTTAGAGGTTGCTGCTTTGG	28
	R: CAATTCGTTGTAGAAGGTATGATGCC	26
<i>UBC6</i>	F: GATACTTGAATCCTGGCTGGTCTGTCTC	29
	R: AAAGGGTCTTCTGTTTCATCACCTGTATTTGC	32
<i>Genes mitocondriales</i>		
<i>Cox1E4</i>	F: CTACAGATACAGCATTCCAAGA	23
	R: GTGCCTGAATAGATGATAATGGT	23
<i>Atp6q</i>	F: TGGTTCAAGATGATTAATTTCAAA	25
	R: AAATGAGCTGATAATGCAAATGAGT	25
<i>Genes de proteínas de membrana interna</i>		
<i>Tim12Jb1</i>	F: CCAGGAGGTCTCGCAAGAG	19
	R: TTGCCACACATCTGTCTATGCAG	23
<i>Tim18Jb1</i>	F: TCCTTTACTCGATGCGTCTTT	21
	R: GCTTATGCCATCTTGGATACTTT	23
<i>Tim22Jb1</i>	F: CTGCAACTGCGGGAAATATAGGT	23
	R: TTTGCTGCCGAAAGGTAAATC	22
<i>Tim54Jb1</i>	F: AGGCGCTATAAGGAGTACATTG	23
	R: AGCAGTCTCTTTCTCGGCATCCA	23

<i>Genes de proteínas de membrana externa</i>		
<i>POR1Jb1</i>	F: TCGCCAAGTCCGCCGTCTTAAA	22
	R: TCGTAACCAAACCTCTGCGCCACC	23
<i>POR2 – 340</i>	F: TTTACTCTGAAGGCGAAGCAGGGC	24
	R: AGATAGCGACACTCCCTCCTTCCTG	25
<i>POR2 – 350-650 I</i>	F: GCTGCGGGTTTATGTGCACGCT	22
	R: TGAAGCAGTTGCGCATTGCCTGT	23
<i>POR2 – 350-650 II</i>	F: TGTTGGCGGCACTGACATCGCA	22
	R: GCAGTTGCGCATTGCCTGTTGT	22
<i>TRP</i>	F: TCAGAAGCAGGTGGGACAGGTGA	23
	R: TGGCGTCAGTCCACCAGCTAACA	23
<i>Tom70p</i>	F: CCAAAGGCGCAATTCCAACA	20
	R: GCATGTCTAGCGTACCGTGA	20
<i>Tom20p</i>	F: GCCATCTTGCTGCTAA	20
	R: TAGCTTCAGCAACCGCATCA	20

Tabla 7. Sondas utilizadas en para los componentes mitocondriales

Los oligonucleótidos se han utilizado tanto en experimentos de PCR como RT-PCR (Teste, Duquenne et al. 2009, Gałgańska, Antoniewicz et al. 2010).

1.8. Soporte informático

- Paquete informático Microsoft Office para la edición de textos, hojas de cálculos e imágenes.
- ImageJ v.1.34S, NIH-EEUU para Windows, software de análisis densitométrico.
- Adobe Photoshop CS5, software de edición de imágenes.

2. Métodos

2.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Con el objetivo de favorecer el rendimiento de dichas preparaciones, los cultivos de levaduras se han iniciado a partir de colonias de cada una de las cepas utilizadas en este estudio, las cuales se han mantenido a 4°C en placas de Petri con el medio adecuado, suplementado con un 1,5% de agar. De forma rutinaria las placas se han resembrado cada mes.

2.1.1. Congelación de las líneas celulares

Para la conservación de las líneas celulares durante largos periodos de tiempo, a la vez que evitar el envejecimiento prematuro de las estirpes de *Saccharomyces*, es necesaria su congelación. Para ello, una vez alcanzada la fase logarítmica para cada estirpe (densidad óptica 1,0 como norma general), crecidas en medio de cultivo líquido con las condiciones apropiadas para regular la expresión proteica, se mezclaran en atmosfera estéril, 500 µl de cultivo con 500 µl de glicerol previamente esterilizado en el interior de tubos Eppendorf de 1,5 ml, hasta alcanzar la homogeneización, congelando rápidamente los tubos a – 80 °C, evitando así la precipitación del glicerol.

En el caso de estirpes con menor tasa de crecimiento, se concentraran previamente a su mezcla con glicerol, mediante la centrifugación de los cultivos a 5000 x g durante 5 minutos en falcón estéril.

2.1.2. Descongelación de las líneas celulares

El proceso de descongelación de las líneas celulares tiene que llevarse a 0 °C, en hielo. Es un proceso lento que debe de garantizar la integridad de las células, ya que en cada ciclo de congelación/descongelación, muere aproximadamente un 50% de las células. Una vez descongeladas, estas serán crecidas en el medio sólido con las restricciones

nutricionales necesarias para preservar las distintas mutaciones. Transcurridas aproximadamente 72 horas, las células se encontrarán en las condiciones óptimas para trabajar con ellas.

2.2.Elaboración de las curvas de crecimiento

Para determinar el tiempo de crecimiento cada una de las cepas de *S. cerevisiae*, se han llevado a cabo las correspondientes curvas de crecimiento de las distintas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas curvas se han obtenido tomando medidas espectrofotométricas a 600 nm.

En condiciones de esterilidad, se toma un inóculo de una o dos colonias, y se deposita en el interior de un frasco tipo Erlenmeyer con 10 ml de medio de cultivo rico en nutrientes (YPD + Gal). Durante todo el proceso y con el fin de favorecer el crecimiento aeróbico de los cultivos, el volumen de medio en los Erlenmeyers nunca debe superar la quinta parte de la capacidad total de los mismos. Este cultivo inicial se denomina “precultivo”. Tanto para el precultivo como para todos los cultivos subsecuentes, las condiciones de crecimiento han sido 30 °C y 220 rpm durante 12 horas.

Transcurrido el tiempo de precultivo se procede a la dilución de los mismos hasta una densidad óptica de 0,1 a 0,2. Para lo cual se deposita aproximadamente 3 ml de los mismos en un Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo con las condiciones nutricionales necesarias para regular la expresión proteica en cada caso. Tomando medidas espectrofotométricas cada 2 horas, reduciendo el tiempo de toma de medida al aproximarse a la fase logarítmica a intervalos de 30 minutos, y continuando la toma de medidas hasta alcanzar el punto de saturación en la fase estacionaria.

2.3. Cultivos celulares

Para la obtención de preparaciones de mitocondrias, se han llevado a cabo cultivos seriados de *S. cerevisiae*, con el objetivo de favorecer el rendimiento de dichas preparaciones.

En condiciones de esterilidad, se toma un inóculo de una o dos colonias, depositándola en el interior de un matraz tipo Erlenmeyer con 10 ml del medio de cultivo con las condiciones apropiadas para regular la expresión de las diferentes proteínas. Durante todo el proceso y con el fin de favorecer el crecimiento aeróbico de los cultivos, el volumen de medio de cultivo en los Erlenmeyers nunca debe superar la quinta parte de la capacidad total de los mismos. Este cultivo inicial se denomina “precultivo”. Tanto para el precultivo como para todos los cultivos subsecuentes, las condiciones de crecimiento han sido 30 °C y 220 rpm durante 12 horas.

De forma rutinaria se cultivan entre 6 y 8 precultivos. Transcurrido el tiempo de precultivo se procede a la dilución de los mismos hasta una densidad óptica de 0,1 a 0,2. (Esta densidad óptica variará en función del tiempo de duplicación de las estirpes). Para lo cual se depositan aproximadamente 5 ml de los mismos en 3 Erlenmeyers de 500 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo SDLacGal. Al cabo de unas 12 horas y con el objetivo de obtener 10 – 15 gramos de células, se procede a una nueva dilución de las células, nuevamente hasta la densidad 0,2 en un volumen final de 2 – 3 litros. Como norma general, el tiempo de duplicación oscila entre las 2 y 3 horas, así como la densidad óptica en la fase exponencial del crecimiento se encuentra entre 0,8 y 1,0.

En casos en los que la dilución inicial del macrocultivo es elevada, es posible que estos cultivos sufran un pequeño retardo en el crecimiento, producto de la dilución de los factores de crecimiento que fomentan la duplicación celular. Transcurridas 12 horas las células se sedimentan por centrifugación a 5.000 x g durante 5 minutos, para el posterior aislamiento de las mitocondrias, en tubos de centrifuga de 250 ml.

Para la obtención de mitocondrias desprovistas de las proteínas Tim22p, Tim18p o Tim23p, la última dilución de las células se lleva a cabo con medio SDLac sin galactosa. A fin de evitar una expresión residual ocasionada por los restos de galactosa de las

diluciones anteriores, se procede al lavado de las células antes de diluirlas. Así, después de sedimentadas en un tubo de centrifuga estéril de 250 ml, las células se resuspenden con agua estéril y nuevamente se sedimentan. Siendo después resuspendidas en un volumen adecuado de medio SDLac sin galactosa, a una densidad óptica de 0,2. Transcurridas 24 horas (tiempo óptimo para la pérdida de la proteína que se desea eliminar), se sedimentan las células a 5000 x g durante 5 minutos (usando el rotor JA-14, 5500 rpm), para el posterior aislamiento de las mitocondrias.

2.4. Obtención de mitocondrias

La obtención de mitocondrias de levaduras se ha basado en una modificación del método descrito por Daum y col. (Daum, Bohni et al. 1982).

El sedimento de levaduras obtenido en el apartado 2.3. Cultivos celulares, se resuspende en unos 100 ml de agua destilada. Para reducir el número de tubos y facilitar el manejo, se recomienda que el volumen final de agua no supere los 100 ml. La resuspensión se lleva a cabo manualmente ayudándose de una varilla de vidrio o del émbolo de teflón de un homogeneizador. Las células se sedimentan de nuevo, centrifugándolas a 3000 x g durante 5 minutos, en tubos de centrifuga de 50 ml (usando el rotor JA-20, 5500 rpm). Una vez decantado el sobrenadante de esta centrifugación, se determina el peso húmedo del sedimento obtenido y se resuspende en un tampón que contiene TrisSO₄ 0,1M, pH 9,4 y ditiotreititol 10 mM (apartado 1.4.1.1.). De manera que la concentración de células sea de 0,5 g/ml. Este tampón alcalino debilita la pared celular de las levaduras y las prepara para su posterior ruptura enzimática. El efecto de este tampón se deja transcurrir manteniendo las células en el incubador durante 30 minutos, en constante agitación a 30°C (100 rpm).

Las células son entonces sedimentadas mediante una nueva centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos, a 4°C. A continuación, se lavan una vez más, resuspendiéndolas en sorbitol 1,2 M, pH 7,4 (apartado 1.4.1.2.) a razón de 40 ml de solución por cada 18 g de células. Seguidamente se sedimentan de nuevo centrifugándolas a 3000 x g durante 5 minutos, a 4°C. Con este último lavado se pretende eliminar el ditiotreititol, a la vez que se restablece el pH neutro necesario para el posterior tratamiento enzimático.

En la siguiente etapa, se procede a la ruptura de la pared celular mediante su digestión enzimática por acción de la liticasa. Este tratamiento enzimático se lleva a cabo en un tampón que contiene sorbitol 1,2 M y KH_2PO_4 20 mM, pH 7,4 (apartado 1.4.1.3.), al que se le añaden 700 unidades de liticasa/mg de célula, de tal forma que las células resuspendidas en este medio mantienen una concentración final de 0,15 g células/ml. La conversión de las células en esferoplastos, es decir levaduras desprovistas de la pared celular, se lleva a cabo a 30°C con una suave y constante agitación (no superior 100 rpm), durante aproximadamente 30 – 40 minutos. El transcurso de este proceso se sigue visualmente al microscopio, depositando periódicamente 1 μl de las células en tratamiento en 300 μl de agua desionizada sobre una placa adaptada que se dispone sobre la platina del microscopio invertido. El tratamiento se detiene cuando se observa que el porcentaje de células lisadas alcanza el 90% aproximadamente.

Los esferoplastos así obtenidos se recogen por centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos, a 4 °C. Antes de someterlos a una homogenización mediante tratamiento físico en homogeneizador, es preciso eliminar completamente del medio la liticasa, para que las membranas mitocondriales no se vean afectadas por esta proteasa. Para ello los esferoplastos se lavan una vez con sorbitol 1,2 M, pH 7,4 (3000 x g, 5 minutos, 5°C). Repitiendo este proceso al menos una vez más. En este punto se vuelve a pesar el sedimento, constituido en este caso, por esferoplastos.

A partir de este momento, todos los procesos se realizan a 0 °C, evitando o reduciendo al mínimo la actividad de las proteasas liberadas en la ruptura celular. Todos los tampones empleados en este proceso se encuentran refrigerados.

Este precipitado de esferoplastos es resuspendido en un tampón isotónico de homogenización, que contiene sorbitol 0,6 M, Tris 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, BSA 0.2%, PMSF, 1 mM (apartado 1.4.1.4.) y opcionalmente una mezcla de inhibidores de proteasas (5 ml/20 g de células), de forma que la concentración sea de 0,15 g de esferoplastos/ml, dejándolo reposar en un baño de hielo durante 10 minutos. Debido a su limitada estabilidad en solución acuosa es importante que el inhibidor de proteasas PMSF se añada justo antes de ser utilizado.

Esto nos permitirá detener el proceso de homogeneización en el momento que apenas se encuentren esferoplastos intactos.

El posterior proceso de homogeneización de los esferoplastos se lleva a cabo de forma manual mediante 10 – 30 desplazamientos completos del émbolo, con un homogeneizador de vidrio tipo Dounce mantenido en baño de hielo, a 1150 min^{-1} . Cada 10 desplazamientos completos del émbolo se observa el homogeneizado al microscopio, depositando $1 \mu\text{l}$ de este en $300 \mu\text{l}$ de tampón. Una vez concluido este proceso, se diluye el homogeneizado en el mismo volumen de tampón, de forma que la concentración sea de $0,075 \text{ g}$ de esferoplastos disgregados/ml y se centrifuga a $3000 \times g$ durante 5 minutos, a 4°C . De esta forma se separan las mitocondrias del resto de los orgánulos celulares más pesados, que se desechan con el sedimento. El sobrenadante de la centrifugación anterior se recoge y se centrifuga a $13300 \times g$ durante 20 minutos, a 4°C . Las mitocondrias que en esta ocasión se encuentran en el sedimento, se resuspenden de nuevo en tampón de homogeneización (de 4 a 10 ml en función del tamaño del pellet) para proceder a la purificación de las mitocondrias. Sometiéndolas a centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (apartado 1.4.1.5.) tamponado con HEPES a pH 7,4. La concentración y el volumen de las distintas fases del gradiente son (Figura 7):

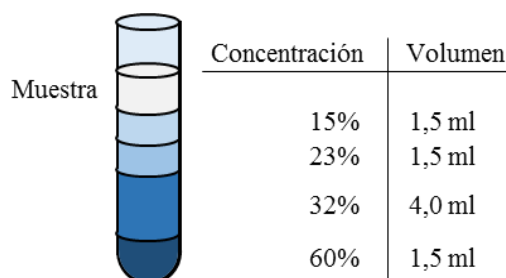


Figura 7. Gradiente de concentración de sacarosa

La figura muestra las distintas concentraciones y volúmenes que conforman el gradiente de sacarosa para la purificación de mitocondrias.

El gradiente se preparará en tubos de ultracentrífuga tipo Beckman de 15 ml y diámetro de 1 cm. De mayor a menor rango de concentración. Sobre el gradiente ya formado, se depositan 3 ml de la fracción celular enriquecida en mitocondrias, obtenida en el paso anterior, preparando tantos gradientes como sea necesario para poder purificar el

volumen total de muestra, sin exceder los 3 ml por de fracción celular por gradiente. Una vez a concluido este proceso, se centrifuga a 13400 x g durante 60 minutos, a 4° C, usando el rotor basculante SW41-Ti. De esta forma se separan las mitocondrias del resto de los orgánulos contaminantes. La interfaz entre los gradientes de 32% y 60% de sacarosa (banda de mitocondrias) se recoge y se centrifuga a 13300 x g durante 20 minutos, a 4 °C. Previamente, se ha de diluir la muestra con tampón de homogeneización hasta los 10 o 12 ml. El purificado mitocondrial que en esta ocasión se encuentran en el sedimento.

Finalmente las mitocondrias se resuspenden en un tampón isotónico con el medio interno mitocondrial denominado 1X conteniendo sacarosa 70 mM, manitol 230 mM y HEPES 5 mM, pH 7,4 (apartado 1.4.1.6.), en un volumen final de 1 ml por cada 10 g de esferoplastos. Habitualmente la concentración de proteínas mitocondriales obtenida tras este procedimiento ha sido de entre 1 a 2 µg procedentes de 4 l de células en cultivo.

2.5.Preparación de membranas mitocondriales

La separación de las dos membranas mitocondriales se lleva a cabo mediante tratamiento en una Prensa de French[®], según el método descrito por Decker y Greenawalt (Decker and Greenawalt 1977). Para ello, el precipitado de mitocondrias obtenido en el apartado anterior se resuspende en 3 ó 4 ml de un tampón hiperosmótico (tampón 2X), que ocasiona una pequeña contracción de la matriz mitocondrial y como consecuencia una ligera separación de la membrana interna con respecto de la externa. Este tampón denominado 2X contiene sacarosa 140 mM, manitol 460 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4. Tras 10 minutos de incubación en este tampón, las mitocondrias se someten a una presión de 2000 psi en la Prensa de French[®], logrando así fragmentar la membrana externa mitocondrial sin por ello dañar la membrana interna.

La preparación resultante se equilibra osmóticamente añadiendo tampón 1X hasta un volumen final de 12 ml y se centrifuga durante 20 minutos a 20000 xg y 4 °C. El sedimento resultante contiene mitoplastos, esto es, mitocondrias desprovistas de membrana externa, mientras que el sobrenadante se encuentra enriquecido en dicha membrana externa,

que se pasa a un tubo de ultracentrífuga etiquetado como ME (membrana externa), y se conserva en hielo para su posterior precipitación.

La fracción enriquecida en mitoplastos se resuspende en tampón de homogeneización, utilizando para ello un volumen de medio 30 veces superior al del precipitado. Se introduce en un vaso de precipitados de pequeño tamaño en un baño de hielo, agitando con una varilla magnética durante 3 minutos en hielo y después se homogeniza suavemente para separar los fragmentos de la membrana externa que aún pudieran quedar en los mitoplastos después del tratamiento anterior. Se vuelve a poner en hielo durante 17 minutos más, manteniendo una agitación continua. Transcurrido este tiempo, se añade manitol sólido hasta que la concentración final sea de 5 %, y una vez disuelto éste, se deposita en un tubo de ultracentrífuga al que se le añade tampón de homogeneización hasta completar los 2/3 del tubo. Seguidamente con ayuda de una cánula que se apoya en el fondo de este mismo tubo se van depositando lentamente 5 ml de tampón al 35 % de sacarosa con Tris 10 mM, pH 7,4 (apartado 1.4.1.7.). El gradiente así formado se centrifuga a 50000 x g durante 75 minutos a 4°C, utilizando el rotor basculante SW41-Ti. Paralelamente el sobrenadante enriquecido en membrana externa también se somete a centrifugación en estas mismas condiciones.

Finalizada esta centrifugación, se observa en la interfase del tubo donde se ha depositado la membrana externa un halo turbio, de color blanquecino, que se recoge con una pipeta Pasteur. Este paso se realiza más fácilmente si se lleva a cabo en una habitación oscura y haciendo incidir directamente la luz sobre el tubo que contiene el gradiente. De igual manera, aunque mucho menos intensa, se observa una interfase similar en el tubo donde se habían depositado los mitoplastos. Esta corresponde a la membrana externa “contaminante” de la fracción de mitoplastos. Esta se recoge y deposita junto a la anterior en un tubo de ultracentrífuga.

Por otra parte el precipitado que se obtiene en el tubo donde se habían depositado los mitoplastos una vez lisados, corresponde a la membrana interna mitocondrial que se resuspende en 500 µL de tampón de tampón 1X. Finalmente la fracción de membrana externa recogida se sedimenta a 50000 x g durante 60 minutos para ser resuspendida en 200 µL de tampón de homogeneización.

Las muestras se conservan en alícuotas de 10 μ l de esta preparación. Las cuáles son ultracongeladas en nitrógeno líquido durante 5 minutos y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante largos periodos de tiempo.

2.6.Extracción de proteínas mitocondriales

La extracción de proteínas mitocondriales se realiza mediante una modificación del método descrito por Witting y col. (Wittig, Braun et al. 2006).

Para ello 100 μ g de proteínas mitocondriales se centrifugan a 20000 x g durante 15 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando la centrifuga Eppendorf 5804R con el rotor F45-30-11 (13.722 rpm). De esta forma se separan las mitocondrias de los resto de tampón 1X en el que se conservan, que se desecha (sobrenadante). Las mitocondrias que se encuentran en el sedimento, se resuspenden de nuevo en 50 ml de tampón de lisis con un 0,5% de digitonina (apartado 1.4.2.2.). Este tampón tiene que estar frio, pero el PMSF se añade justo antes de utilizarlo.

Este paso es crucial para el correcto proceso de lisis mitocondrial. Para ello las mitocondrias de resuspenden mediante suaves pasos por punta de pipeta, generalmente con 10 pasos son suficiente, evitando que se forme espuma como consecuencia de la desnaturalización proteica. Tras este paso la solución se agita vigorosamente en vortex durante 10 segundos. Esta mezcla se incuba en hielo durante 30 minutos, repitiendo el proceso de agitación en vórtex cada 5 minutos. Una vez ha concluido este proceso, se centrifuga a 20000 x g durante 10 minutos, a 4°C . De esta forma se separan los complejos proteicos mitocondriales de los restos de orgánulo no lisados más pesados, que se desechan con el sedimento. El sobrenadante de la centrifugación anterior se recoge y se transfiere a un nuevo tubo, determinando posteriormente su concentración de proteínas.

Esta muestra se puede conservar un máximo de 1 mes a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de que se produzca la degradación de los complejos.

2.7. Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se ha realizado mediante una modificación del método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford 1976).

De acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia de un compuesto a una determinada longitud de onda es directamente proporcional a su concentración, siempre y cuando las concentraciones a relacionar sean relativamente bajas. Por tanto, como paso previo a la determinación la concentración de proteínas, se construye una recta de calibración a partir de las absorbancias de diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino comprendidas entre el 0,5 y 4 μg de proteína. Todos los tubos, incluidos los de la curva patrón, contienen exactamente la misma cantidad de tampón en el que se encuentre la muestra cuya concentración de proteínas se quiera determinar en ese momento y de reactivo de Bradford. Cada medida se realiza por triplicado usando para su lectura una placa ELISA de 96 pocillos, y el lector de placas VICTOR³.

Así los volúmenes utilizados en la determinación de proteínas se detallan en la siguiente tabla:

BSA	<i>Reactivos</i>			
	Solución patrón BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tampón 1X	Agua	Reactivo Bradford 1X
<i>Blanco</i>	0,0 μl	3,0 μl	17,0 μl	180 μl
<i>0,5 μg</i>	0,5 μl	3,0 μl	16,5 μl	180 μl
<i>1,0 μg</i>	1,0 μl	3,0 μl	16,0 μl	180 μl
<i>1,5 μg</i>	1,5 μl	3,0 μl	15,5 μl	180 μl
<i>2,0 μg</i>	2,0 μl	3,0 μl	15,0 μl	180 μl
<i>2,5 μg</i>	2,5 μl	3,0 μl	14,5 μl	180 μl
<i>4,0 μg</i>	5,0 μl	3,0 μl	12,0 μl	180 μl
Muestra	Volumen de preparación	Tampón 1X	Agua	Reactivo Bradford 1X
–	2,0 μl	1,0 μl	17,0 μl	180 μl
–	1,0 μl	2,0 μl	17,0 μl	180 μl
–	0,5 μl	2,5 μl	17,0 μl	180 μl

Tabla 8. Recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas con Bradford

La determinación de la concentración de proteínas se realiza mediante la extrapolación de la densidad óptica de una muestra problema de la cual se quiere determinar la concentración de proteínas con la densidad

óptica de una recta patrón de proteínas formada por concentraciones crecientes de BSA, comprendidas entre 0 y 4 µg de BSA.

Las muestras se incuban en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente, manteniendo las muestras en oscuridad durante todo el proceso. La lectura de la absorbancia se realiza a 595 nm, siendo estable hasta transcurrida una hora desde la adición del reactivo Bradford 1X.

2.8.Preparación de geles de poliacrilamida

2.8.1. Gel de SDS-PAGE

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución derivado del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el gel superior o empaquetador “Stack”) y luego las separan (en el gel inferior o separador). El gel separador presenta una movilidad de las proteínas restringida por el tamaño del poro, que depende de la concentración de los monómeros de acrilamida/bisacrilamida del gel.

En este trabajo se han empleado geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones y gradientes, dependiendo fundamentalmente de la masa molecular o de la diferencia entre masas moleculares de las proteínas a inmunodetectar. Así, si se quiere resolver componentes de elevada masa molecular (en mi caso entre 50 y 70 kDa) se utilizaban geles de concentraciones entre el 6 y el 8%. Mientras que para proteínas de menor masa molecular (entre 10 y 27 kDa) se emplean geles de menor tamaño de poro, entre el 10 y el 14% de acrilamida.

En cierto tipo de experimentos las muestras poseen componentes con masas moleculares (PMs) muy variados, el uso de un gel separador de concentración constante o homogénea limita la resolución de los componentes. Por lo que de forma alternativa se

han usado geles de concentración heterogénea, en gradiente, los cuales van desde una baja al inicio del gel (6%) hasta una concentración máxima de un 20%.

De forma rutinaria, los geles con una concentración fija de acrilamida se polimerizan a temperatura ambiente. En el caso de geles en gradiente, los cuales se preparan a partir de dos disoluciones de diferente concentración con ayuda de un gradientador, el llenado del molde es lento. Por lo que la preparación de estos geles en gradiente se realiza a 4 °C.

Las cantidades de la tabla sirven para el sistema de minigeles de Bio-Rad (Mini-Protean II®) de 0,75 mm de espesor. Estas se adaptan para moldes de diversa capacidad, conservando las proporciones.

Reactivos	Porcentaje de acrilamida								
	4	6	8	10	12	14	16,5	20	Stack
<i>Tampón</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,250
<i>Agua</i>	2,518	2,318	2,118	1,118	0,918	0,718	0,468	0,118	1,500
<i>Acrilamida</i>	0,400	0,600	0,800	1,000	1,200	1,400	1,650	2,000	0,200
<i>Glicerol</i>	–	–	–	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800	–
<i>PSA 10%</i>	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,020
<i>SDS 10%</i>	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,020
<i>TEMED</i>	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,002
TOTAL	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	2,000

Tabla 9. Preparación de geles SDS-PAGE

Concentraciones de los distintos reactivos utilizados en la preparación de geles de concentración fija y en gradiente para SDS-PAGE.

Una vez limpio el sistema de moldes, con especial cuidado en la zona de contacto entre cristales. Se comprueba el montaje del sistema, añadiendo un ml de agua miliQ, descartando la presencia de fugas.

Tras esta comprobación rutinaria, se mezclan los componentes del gel, siendo los últimos en añadirse a la mezcla al PSA y TEMED. Momento en que se vuelca la mezcla en el interior del molde, con ayuda de una pipeta Pasteur. En el caso de formación de

burbujas en gel, con extrema precaución se puede dar un par de golpes en la parte inferior del soporte, hasta que la burbuja suba a la superficie.

A continuación, usando una nueva pipeta, se cubre la superficie del gel con agua miliQ. De forma opcional se podría utilizar isobutanol o isopropanol, más fáciles de eliminar una vez polimerizado el gel. El tiempo aproximado de polimerización es de 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez polimerizado el gel se elimina el agua que cubre el gel separador, y se lava la parte superior del gel 2 ó 3 veces con agua miliQ, eliminando cualquier residuo de acrilamida no polimerizada. Finalmente, se seca el líquido residual de la parte superior del gel con papel de filtro con cuidado de no dañar el gel.

Para concluir, se prepara y añade el gel empaquetador o “stack”. Una vez añadido, se inserta el peine en la solución concentradora con precaución para evitar la formación de burbujas. Siendo en este caso el tiempo aproximado de polimerización de unos 30 minutos a temperatura ambiente o 10 minutos a 37 °C. Tras la polimerización se retira el peine cuidadosamente con un movimiento vertical, evitando producir daños en los pocillos, y se lavan los pocillos con agua destilada.

Este gel puede ser conservado un tiempo máximo de 24 horas a 4 °C. Para mejor conservación, se puede cubrir el gel con papel “seca manos” húmedo.

2.8.2. Gel de BN-PAGE

Al igual que en la preparación de geles para SDS-PAGE, en este trabajo se emplearon geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones y gradientes, dependiendo de la masa molecular o de la diferencia entre estos de las proteínas a inmunodetectar. De forma rutinaria se han utilizado geles en gradiente del 6 al 16,5%.

Alternativamente se han empleado geles de acrilamida de alta resolución para la separación de complejos multiproteicos de entre 400 y 10 kDa. En función del experimento, la concentración de acrilamida puede oscilar entre el 10 al 13% para geles

de concentración fija o gradientes del 10 al 20%. La figura se muestra el poder de resolución de los distintos geles empleados en este estudio:

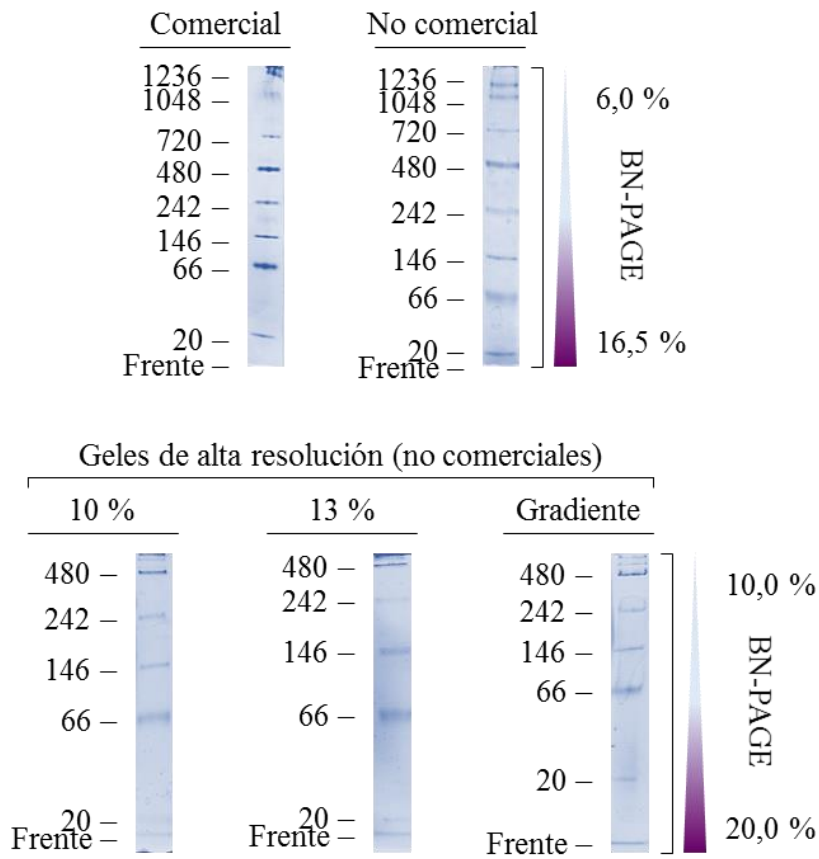


Figura 8. Geles de poliacrilamida para electroforesis BN-PAGE

La variación en la concentración de acrilamida permite una mejor separación de los complejos proteicos.

A diferencia de los geles para SDS-PAGE, estos se polimerizan a temperatura ambiente. Las cantidades que se describen a continuación sirven para el sistema de minigeles de Bio-Rad (Mini-Protean II®) de 1,50 mm de espesor:

Reactivos	Porcentaje de acrilamida								
	4	5	6	8	10	13	16,5	20	Stack
<i>Tampón</i>	2,666	2,666	2,666	2,666	2,666	2,666	2,666	2,666	1,334
<i>Acrilamida</i>	0,648	0,808	0,952	1,298	1,618	2,088	2,712	3,334	0,320
<i>Glicerol</i>	–	–	–	–	1,6	1,6	1,6	1,6	–
<i>PSA 10%</i>	0,034	0,034	0,034	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,016
<i>TEMED</i>	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
<i>Agua</i>	4,648	4,456	4,344	4,006	2,086	1,616	0,992	0,37	2,33
TOTAL	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000	4,000

Tabla 10. Preparación de geles BN-PAGE

Concentraciones de los distintos reactivos utilizados en la preparación de geles de concentración fija y en gradiente para BN-PAGE.

El tiempo aproximado para la polimerización de los geles es de unos 30 minutos a 37 °C. Siguiendo las mismas precauciones y procesos de conservación que los geles para SDS-PAGE.

2.9.Co-Immunoprecipitación

Los ensayos de co-inmunoprecipitación se realizaron utilizando el kit Dynabeads® Co-Immunoprecipitation, de la casa comercial Invitrogen^{MT}, mediante una modificación del protocolo descrito por el fabricante.

Para ello se toma 1 µg de Dynabeads® (microimanes) por cada co-inmunoprecipitación a realizar. Todos los µg de imán se introducen en un tubo Eppendorf de 2 ml, donde se lavan con 100 µl de solución C1 por cada µg de imán. Estos se separan del sobrenadante tras su lavado con ayuda de un imán, el cual atrae a las Dynabeads y permite descartar el sobrenadante sin perder imanes. Este proceso se repetirá en cada paso tras una incubación para eliminar el sobrenadante.

Estos imanes se incuban durante 24 horas a 37 °C, en agitación constante, con 15 µl del anticuerpo utilizado en la co-inmunoprecipitación por cada µg de imán. Este anticuerpo se diluye con 25 µl de tampón C1 y 50 µl de tampón C2, manteniendo la proporción según varíe el volumen de anticuerpo. Durante este tiempo el anticuerpo se unirá al imán y tras este paso se procederá a la de preparación de los imanes para la co-inmunoprecipitación.

Este proceso continúa con la eliminación del sobrenadante en el que se encuentra presente el anticuerpo, lavando de forma sucesiva los imanes con tampón HB, posteriormente con LB y finalmente con SB, en este último, tras el lavado se incuban los imanes durante 15 minutos en agitación suave y temperatura ambiente. Estos procesos de lavado han de ser extremadamente cuidadosos, puesto que un tratamiento brusco podría despegar los anticuerpos unidos al imán. Estos se realizan con 50 µl de tampón por cada µg de imán, realizándose la incubación con el doble de volumen. Una vez finaliza la incubación los imanes se transfieren a un tubo de 500 µl y se elimina el sobrenadante con ayuda del imán. En este momento los imanes se encuentran en condiciones óptimas para realizar la co-inmunoprecipitación.

Como paso previo y con el fin de eliminar los posibles restos de solución SB se realiza un último lavado de los imanes con tampón de lisis (apartado 1.4.2.2.) sin digitonina. En este momento los imanes se incuban con 100 µl de lisado mitocondrial, cuya concentración de proteínas varía en función del nivel de expresión de la proteína VDAC1 en la línea celular. Para la estirpe control la concentración es de 1 µg/µl. Esta incubación se lleva a cabo durante 1 hora a 4°C y con continua agitación en “noria” de Eppendorf.

A continuación se elimina el sobrenadante y realiza un nuevo lavado con 100 µl de tampón de lisis, eliminando las proteínas no unidas al anticuerpo. Este proceso es extremadamente delicado y ha de realizarse suavemente evitando la ruptura de la unión anticuerpo – proteína. Finalizado este proceso se añaden 50 µl de tampón Laemmli y se calienta la muestra durante 5 minutos a 95 °C. Una vez atemperada se continúa con el proceso de electroforesis SDS-PAGE.

2.10. Electroforesis de proteínas

2.10.1. SDS-PAGE

Con la finalidad de confirmar la expresión de las distintas proteínas de los complejos transportadores, se han llevado a cabo ensayos de “immunoblot” sobre extractos proteicos separados electroforéticamente. Las electroforesis se han llevado a cabo siguiendo el método de Laemmli (Laemmli 1970). El sistema empleado en los experimentos de SDS-PAGE está basado en el empleo de dos tampones (sistema discontinuo) con pH 8,8 y 6,8 respectivamente (apartados 1.4.4.4.1. y 1.4.4.4.2.). Las muestras de proteínas se han diluido en tampón Laemmli suplementado con un 5% de 2-mercaptoetanol, hasta la concentración apropiada, facilitando la desnaturalización de las muestras.

Para la separación de proteínas con masas moleculares comprendidas entre 20 – 120 kDa, los geles se han utilizado geles de diferentes concentraciones, como se especifica en el apartado 1.4.4.4., en función de la proteína que quisiéramos separar. Las electroforesis, se han dejado transcurrir a voltaje constante una vez fijadas las condiciones iniciales:

Espacio recorrido	Voltaje (constante)	Tiempo aproximado
<i>Gel empaquetador o “stack”</i>	80 V	15 min
<i>50 – 70 % del gel separador</i>	120 – 130 V	1 h/50 min (este tiempo depende del porcentaje de gel empleado)
<i>Del 50 – 70 % del gel separador al final</i>	160 V	30 – 45 min

El tampón de electroforesis contiene Tris 25 mM, Glicina 192 mM y 1% de SDS a pH 8,3 (apartado 1.4.4.2.). Y los volúmenes máximos utilizados por pocillo para el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell son:

Grosor	5 pocillos	10 pocillos	15 pocillos
0,75 mm	70 µl	33 µl	20 µl
1,00 mm	105 µl	44 µl	26 µl
1,50 mm	160 µl	66 µl	40 µl

Como norma general el volumen de muestra que se utiliza por pocillo oscila entre 6 y 50 μ l, dependiendo del número de pocillos, grosor del gel y del experimento realizado.

Cuando el frente cromatográfico, coloreado por el azul de bromofenol, se aproxima al extremo inferior de la placa (0,5 cm aproximadamente), se detiene la electroforesis y se procede a la extracción del gel del molde, para la posterior transferencia de las proteínas separadas a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF).

2.10.2. BN-PAGE

Con el fin de caracterizar bioquímicamente las translocasas mitocondriales, se han llevado a cabo ensayos de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o BN-PAGE, se ha llevado a cabo siguiendo una modificación del protocolo descrito por Witting y col. (Witting, Braun et al. 2006). Para ello se ha de partir de los extractos de proteínas mitocondriales previamente descritos en el apartado 2.6. Los extractos se han diluido en tampón de la muestra para BN-PAGE, sin exceder los 20 μ g de proteína por muestra, e igualando los volúmenes de todas las muestras empleadas en el experimento, facilitando el correcto proceso de electroforesis.

Antes de cargar las muestras es conveniente realizar un “sping” para eliminar los posibles precipitados. Para la separación de complejos de proteínas mitocondriales por norma general, se han utilizado geles en gradiente con concentraciones comprendidas entre el 6 y el 16,5%, como se especifica en el apartado 2.8.2., en función de la resolución y el poder de separación que se quiere obtener para determinados complejos se han utilizado geles en concentración fija o gradiente de alta resolución. Las electroforesis, se han dejado transcurrir a voltaje constante una vez fijadas las condiciones iniciales de 150 V y 4 °C (todo el proceso de electroforesis BN-PAGE se realiza a baja temperatura).

El sistema de electroforesis empleado está basado en el empleo de dos cátodos de electroforesis (apartado 1.5.5.6. y 1.5.5.7.). Para el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell con geles de 1,5 mm de espesor los tiempos de electroforesis con cada cátodo son:

Tampón del cátodo	Voltaje (constante)	Tiempo aproximado
<i>Tampón Light blue</i>	150 V	15 min
<i>Tampón Running</i>	150 V	40 – 50 min

En el gel preparado como se describe en el apartado 2.8.2., se saca el peine y aclaran los pocillos con tampón Dark blue (apartado 1.5.5.5.), con el que posteriormente se llenan los pocillos antes de comenzar la electroforesis. Antes de cargar las muestras se añade en el cátodo light blue. Y se carga el gel, cargando entre 20 y 50 μ l por pocillo, variando el volumen en función del experimento. Sin dejar calles vacías, llenando las que no contengan proteínas con tampón de la muestra BN-PAGE.

En una de las calles de los extremos se ha de cargar 1 μ l de marcadores de masa molecular. Estos solo son visibles tras la tinción del gel.

Cuando el frente cromatográfico, coloreado por el azul de bromofenol, se aproxima al extremo inferior de la placa (0,5 cm aproximadamente), se detiene la electroforesis y se procede a la extracción del gel del molde, para la posterior transferencia de las proteínas separadas a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF).

2.10.3. Bidimensional

Si a continuación se va a hacer una electroforesis desnaturalizante en una segunda dimensión, es conveniente antes de casar el gel marcar en el cassette con un rotulador las líneas de las calles que se van a someter a esta segunda dimensión para facilitar su corte.

Los ensayos de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o BN-PAGE, se ha llevado a cabo mediante una modificación del protocolo descrito por Dienhart y col. (Dienhart and Stuart 2008).

Una vez ha finalizado la electroforesis en condiciones nativas se quita con cuidado la placa superior del sistema de molde del gel, dejando que el gel permanezca en el interior del molde. A continuación se cortan los pocillos y la calle del gel que se va a someter a una segunda dimensión. Esta se separa de la placa del molde en una solución de Bis-Tris

50 mM pH 7,2, bicina 50 mM, EDTA 2 mM (apartado 1.5.5.8.) suplementada con un 0,1% de SDS, y donde se deja incubar el gel durante 10 minutos. Esta solución ayuda a facilitar la salida de las proteínas del gel en una segunda dimensión, evitando la curvatura del frente electroforético.

El siguiente paso consiste en la polimerización de este fragmento del gel nativo sobre el gel empaquetador de un gel SDS-PAGE previamente polimerizado. Este gel desnaturizante tiene un grosor de 1,5 mm para facilitar la entrada del fragmento de gel nativo y suele tener una longitud del 66% del tamaño del molde, dejando el otro 33% para un pequeño gel empaquetador de aproximadamente 0,5 cm de longitud. La parte superior del gel separador se rellena de este mismo sin polimerizar. Esto permite facilitar el desplazamiento del fragmento nativo (actuando como lubricante en las paredes del molde de gel hasta el separador previamente polimerizado. En uno de los extremos del molde se introduce un pocillo que posteriormente me permitirá determinar la masa molecular de las proteínas inmunodetectadas. Finalmente esta solución se polimeriza en estufa a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos.

Una vez polimerizado el gel se continúa con el proceso de electroforesis SDS-PAGE descrito en el apartado 2.10.1.

2.10.4. Transferencia de proteínas

Tras la electroforesis, las proteínas son electrotransferidas a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF), mediante una modificación del método descrito por Matsudaira (Towbin, Staehelin et al. 1979, Matsudaira 1987). Para llevar a cabo la transferencia se ha utilizado el método semi-seco, usando el Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, de Bio-Rad.

Como paso previo a la electrotransferencia, se activa la membrana de PVDF sumergiéndola durante 10 – 15 segundos en metanol. Una vez activada la membrana, se elimina el exceso de metanol, lavándola durante 30 segundos/1 minuto en agua destilada. Finalmente, la membrana se sumerge en el mismo tampón en el que se realiza la

transferencia, amortiguando la membrana. Estos dos últimos pasos aplican también en el gel de poliacrilamida, lavándose y amortiguándose en tampón de transferencia durante un par de minutos.

El proceso de electrotransferencia comienza con la preparación de un “sándwich” con dos papeles Whatmann (Bio-Rad) previamente humedecidos en tampón de transferencia. La placa inferior del Trans-Blot® se humedece con tampón de transferencia, poniendo sobre esta uno de los papeles Whatmann previamente humedecidos. Sobre este, a su vez se sitúa la membrana de PVDF previamente amortiguada. Con un rodillo se eliminan posibles burbujas de aire entre el papel Whatmann y la membrana de PVDF. A continuación se añade un mililitro de tampón de transferencia sobre la membrana, esto facilita que no aparezcan burbujas entre membrana y gel que se deposita sobre esta, asegurándose que no sobresalga el gel de la membrana, eliminando las posibles burbujas formadas entre ambos. Finalmente, sobre esto se coloca un segundo papel Whatmann humedecido, compactando el sándwich de nuevo con el rodillo, cerrando el sistema con la placa superior previamente humedecida con tampón de transferencia.

Las condiciones de electrotransferencia en función del grosor del gel son:

<i>Grosor del gel</i>	<i>Voltaje constante 10 V</i>	<i>Voltaje constante 15 V</i>
<i>0,75 mm</i>	30 min	15 min
<i>1,00 mm</i>	45 min	25 min
<i>1,50 mm</i>	60 min	30 min

Nota: La renovación de los papeles Whatmann es esencial. Una vez concluida la electroforesis, estos papeles se dejarán durante 24 horas en agua destilada, realizando cambios del agua cada 8 horas. Transcurridos los lavados, los papeles se secan durante 24 horas a 50 °C. Tras esto, el papel Whatmann estará en condiciones óptimas para poder volver a ser utilizado un máximo de 3 veces.

2.10.5. Tinción del gel de poliacrilamida

Para comprobar el correcto proceso de transferencia se suele emplear la técnica de tinción del gel con azul de Coomasie. Este colorante se intercala en las estructuras proteicas tiñéndolas de un color azul intenso. De forma rutinaria, el gel de electroforesis se sumerge en solución Azul Coomasie (apartado 1.4.6.1.), durante 2 horas en agitación constante y tapado el recipiente, evitando así la pérdida de poder de tinción como consecuencia de la volatilización de determinados componentes de esta solución (metanol y ácido acético).

Transcurrido este tiempo, se desecha la solución de Coomassie y se comienza con el proceso de lavado del gel con la solución desteñidora (apartado 1.4.6.2.). Este paso se extiende en el tiempo tanto como se quiera, en función del grado de resolución que se quiere de las bandas de proteína. Como norma general, se han realizado lavados de 1 hora en agitación y temperatura ambiente durante aproximadamente 6 horas, realizando un último lavado de 12 horas a 4°C.

2.10.6. Tinción de membrana

Habitualmente, se emplea la técnica de tinción de membranas con rojo Ponceau, con el objeto de verificar la correcta transferencia de las proteínas. El rojo Ponceau se emplea en forma de solución acuosa comercial. De forma rutinaria, la membrana de PVDF una vez transferidas las proteínas se lava con solución de lavado TBS/Tween (apartado 1.5.7.1.), durante 5 minutos en agitación, eliminando así los restos de sales procedentes de la solución de transferencia.

Posteriormente la membrana se incuba durante 30 segundos con solución rojo Ponceau en agitación leve. Tras este paso se recoge la solución rojo Ponceau para nuevos experimentos y se lava la membrana con agua destilada durante 10 segundos. Los lavados posteriores se realizan con solución de lavado TBS/Tween, haciéndose visibles las proteínas electrotransferidas.

2.10.7. Bloqueo de membrana

La membrana de PVDF posee una gran afinidad por las proteínas, lo que resulta una ventaja a la hora de transferir las proteínas de interés, aunque puede suponer un problema en pasos posteriores de detección que involucran el empleo de anticuerpos. Esto se evita mediante el bloqueo de la membrana.

Esto consiste, en la incubación de la membrana durante una hora y 5 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo en agitación constante y leve. De forma alternativa, la membrana se puede bloquear durante 12 horas a 4 °C en las mismas condiciones de agitación.

2.10.8. Inmunoblot

Los ensayos de inmunodetección de las proteínas mitocondriales se han llevado a cabo a partir de una modificación del método descrito por Towbin (Towbin, Staehelin et al. 1979). Una vez finalizados los procesos de electrotransferencia y bloqueo, se elimina el exceso de leche mediante lavados de 5 minutos en solución TBS-Tween, generalmente con 3 lavados es suficiente para eliminar los restos de leche, y se da inicio a la incubación con el anticuerpo primario diluido en el mismo tampón.

Tras 1 hora y media de incubación a temperatura ambiente (12 horas a 4 °C), se procede nuevamente al lavado de la membrana para eliminar el exceso de anticuerpo primario y dar inicio a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa durante una hora y media o dos horas. Este lavado es de 10 minutos a temperatura ambiente.

La detección de las proteínas mitocondriales, se produce mediante la reacción de la enzima peroxidasa con luminol. Esta reacción libera luz, la cual imprime en una película de rayos-X la señal que indica la presencia de la proteína diana en la membrana de PVDF. La reacción se ha llevado a cabo mediante el kit ECL-plus (Amersham Biosciences, UK, Lt), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las auto-

radiografías se han revelado en una cámara oscura mediante incubación durante 1 minuto en las soluciones reveladora y fijadora (GBX Kodak), respectivamente.

Como paso previo a la detección de las proteínas mitocondriales, se ha de eliminar los restos de anticuerpo secundario, lavando la membrana durante una hora con solución TBS-Tween, realizando cambios de esta cada 5 minutos.

2.11. Extracción de ácidos nucleicos: ADN y ARN

Las extracciones tanto de ADN como de ARN se han realizado en trizol de sigma-aldrich siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras pueden conservarse en etanol a -20 °C hasta su próximo uso, o utilizarlas de forma inmediata, retirando de las mismas el etanol, dejando secar el pellet aunque no de forma completa y resuspendiendo las muestras en un volumen de 10 a 20 µl de agua DEPC.

2.12. Retrotranscripción de ARN a ADNc

El ARN que se ha obtenido en el apartado anterior para sintetizar el ADN copia (ADNc) mediante el reactivo High-Capacity cDNA Archive kit de Applied Biosystems que contiene lo necesario para retrotranscribir la muestra de ARN aislada.

2.13. Electroforesis de ácidos nucleicos

Para comprobar la expresión de determinados genes mitocondriales se ha utilizado la separación de la muestra de ADN en gel de agarosa 1,0%.

En una cubeta se depositan 500 ml de tampón de electroforesis TBE 1X, por otro lado se prepara el gel como se describe en el apartado 2.14.1.

Preparación de las muestras:

- 4 µl de muestra ARN aislado
- 5 µl de agua tratada con DEPC
- 1 µl de tampón de carga 10X

Una vez preparadas las muestras se han de cargar en los pocillos y conectar la fuente de alimentación a 80 – 100 V durante 1 – 1:30 horas. Tras este tiempo, se saca el gel de la cubeta y observa bajo el transiluminador de luz ultravioleta (260 nm). La radiación ultravioleta es absorbida por el ADN y emitida al GelStar que a su vez emite la radiación a 590 nm dentro de espectro visible, lo que permite tomar una fotografía.

2.13.1. Geles para ácidos nucleicos

La concentración de los geles de agarosa utilizados en este trabajo presentan una concentración del 1,0% de agarosa. Para preparar 100 ml de gel de agarosa al 1,0% (para un molde de 15x10 cm), se diluyen en 100 ml de tampón 1X TBE Ultra Pure Buffer Concentrate:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>Agarosa D1 LOW</i>	Conda	1,00 g

Previamente se ha montado el molde del gel. Esta estructura de metacrilato cuenta con dos bordes abiertos, los cuales se deben sellar con cinta de autoclave.

Esta mezcla se introduce en un matraz Erlenmeyer y se calienta en microondas a potencia máxima durante 5 minutos aproximadamente, agitando periódicamente para asegurarse la disolución completa de la agarosa. Una vez disuelta la agarosa, se deja enfriar la mezcla a 50 – 60 °C, momento en que se añade el reactivo GelStar™, que marca de forma fluorescente todo tipo de ácidos nucleicos.

El GelStar™ se comercializa al 10000X, por lo que para 100 ml de gel se añade:

Reactivo	Casa comercial	Cantidad
<i>GelStar™</i>	Lonza	10 µl

Finalmente, se coloca el peine y se deja polimerizar lentamente la agarosa a temperatura ambiente.

RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica de las estirpes celulares

Inicialmente se ha querido corroborar el carácter esencial o no esencial para la viabilidad celular de las proteínas, componentes de las principales translocasas mitocondriales, TIM22, TIM23 y TOM, así como del canal aniónico dependiente de voltaje VDAC, al tiempo de asegurarme que las mutaciones introducidas en cada una de las estirpes de *Saccharomyces* utilizadas, se han mantenido tras las sucesivas replications de las células en su crecimiento. Con este fin, se han realizado diluciones seriadas, en medio de cultivo sólido de las diferentes estirpes, con las condiciones apropiadas, que en cada caso permiten regular la expresión de las diferentes proteínas.

1.1. Mutantes en translocasas de la membrana interna mitocondrial

Esta comprobación se ha realizado mediante diluciones seriadas, (con un factor de dilución 1/10) de las distintas estirpes, en medio de cultivo sólido, con las condiciones de nutrientes restrictivas, apropiadas para regular la expresión de la proteína de interés. En las estirpes mutantes en los componentes de las translocasas de membrana interna mitocondrial, TIM22 y TIM23, figura 9, se ha podido confirmar que en aquellas en las que además del promotor *Gal10*, con el gen de la proteína correspondiente, contienen, el gen marcador *LEU2* (*Tim22p_(Gal10)*, *Tim23p_(Gal10)* o *Tim17p_(Gal10)*), solamente las levaduras transformadas sobreviven en ausencia de leucina (Milisav, Moro et al. 2001).

El control, sobre la expresión de la proteína no esencial Tim18p se ha llevado a cabo mediante dos estirpes diferentes. La primera de ellas, *Tim18p_(Gal10)*, contiene también el promotor *Gal10* insertado delante del gen que codifica a Tim18p, y como en los casos precedentes, su expresión está subordinada a la de este promotor. La segunda, Δ Tim18p (RJ993), presenta la delección de la mayor parte del gen, que codifica esta proteína, sustituyéndolo por el gen marcador *HIS3* (Kerscher, Sepuri et al. 2000).

Por su parte, el carácter esencial de la proteína Tim54p se ha estudiado también en otras dos estirpes diferentes. La Δ Tim54p que es termosensible y en la que el gen que codifica a Tim54p se encuentra sustituido, mediante recombinación con el gen marcador

ADE2 (Kerscher, Sepuri et al. 2000) y la *Tim54p_(Leu2)Tim22p_(Trp1)* (RJ967). En esta última, la mayor parte del gen que codifica a *Tim54p* se encuentra sustituido por el gen marcador *LEU2*, al tiempo que la inserción del gen de *Tim22* en el plásmido *TRP1* conlleva una enorme sobre expresión de la proteína *Tim22p* (Kerscher, Holder et al. 1997).

La falta de crecimiento, de las estirpes *Tim22p_(Gal10)*, *Tim23p_(Gal10)*, *Tim17p_(Gal10)* y *Tim50p_(Gal10)* en medio de cultivo sólido carente de galactosa, observada en la figura 9, ha puesto de manifiesto que la omisión de este disacárido, está ligada a la eliminación de las respectivas proteínas y confirma así el carácter esencial de las mismas (Geissler, Krimmer et al. 2000, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Geissler, Chacinska et al. 2002).

Sin embargo, como se ha observado también en la figura 9, el resultado de la eliminación de la proteína *Tim18p*, obtenida tanto por la omisión de la galactosa del medio de cultivo, como por la sustitución del gen *Tim18* por *HIS3* (RJ993) con respecto a sus estirpes isogénicas (CDD38 y RJ992, respectivamente), evidencian el carácter no esencial descrito para esta proteína (Kerscher, Sepuri et al. 2000).

En lo que respecta a *Tim54p*, su naturaleza esencial (Kerscher, Holder et al. 1997), se ha comprobado en la estirpe termosensible Δ *Tim54p*. De tal forma que tras su eliminación, solo a 24°C se ha podido obtener una tasa normal de crecimiento de estas células (Figura 9). Por el contrario el crecimiento tras 72 horas a 30 °C se ha visto considerablemente disminuido. No obstante, la esencialidad de *Tim54p* se puede también compensar mediante la sobre expresión de *Tim22p*, tal y como se observa en la figura para la estirpe *Tim54p_(Leu2)Tim22p_(Trp1)*.

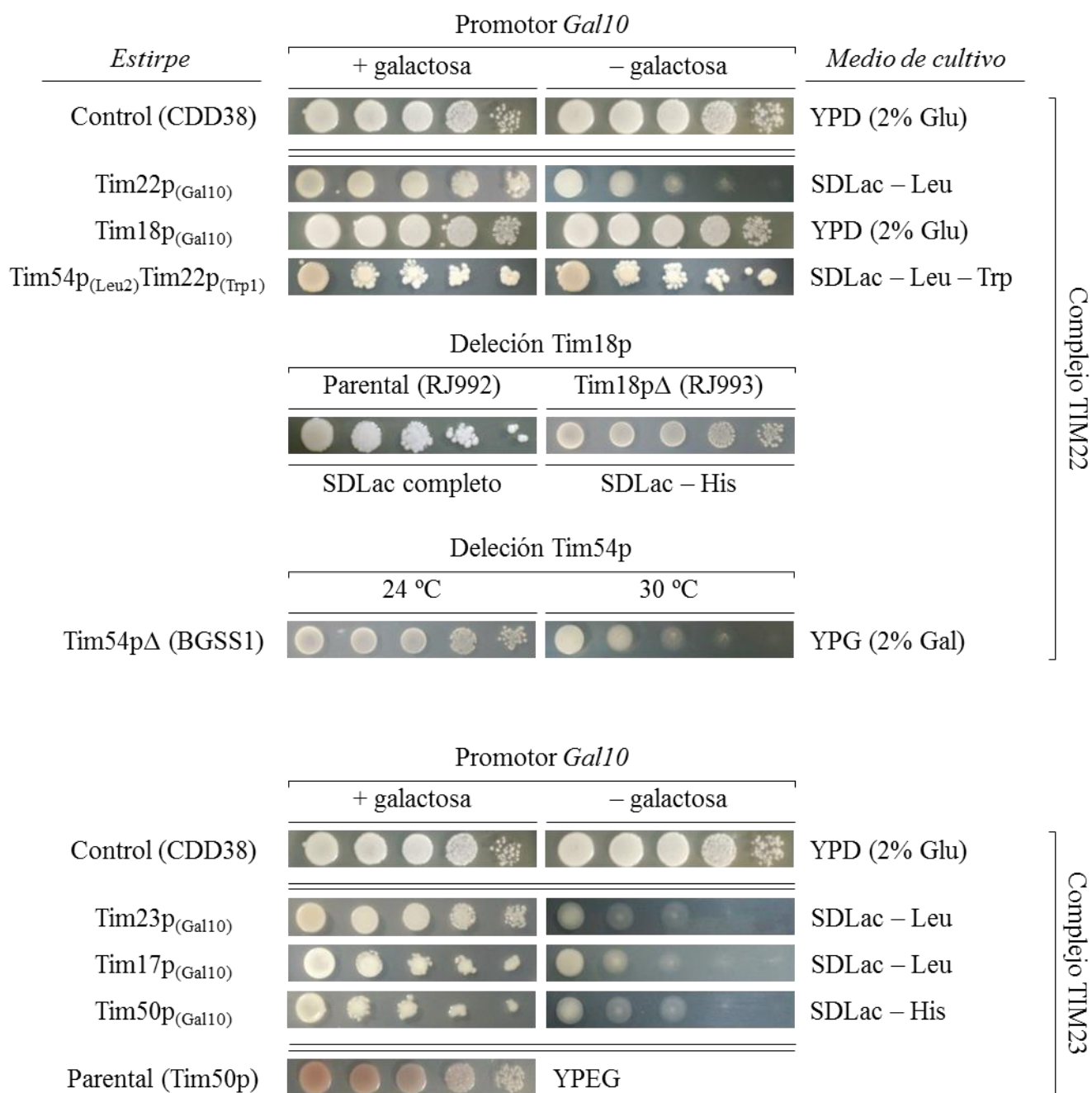


Figura 9. Crecimiento de las estirpes de *Saccharomyces Cerevisiae* mutantes en las proteínas componentes de las translocasas de membrana interna mitocondria TIM22 y TIM23

Una o dos colonias de las cepas de *S. cerevisiae*, mutantes en componentes de las translocasas TIM22 o TIM23, se han crecido en agitación, en medio de cultivo líquido YPD + Gal, hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1, a 600 nm. Posteriormente se han obtenido diluciones seriadas con un factor de dilución 1/10, de las que se depositaron 10 μ l o 30 μ l (en función de si el medio de cultivo sólido fuese YPD/YPG o SDLac, respectivamente) en placas de Petri con el medio sólido que se especifica en el margen derecho de la figura. Las células se han incubado a 30 °C durante 72h, salvo la estirpe termosensible Δ Tim54p, que se ha incubado a 24 °C.

1.2. Mutantes en translocasas de la membrana externa mitocondrial

El control de la expresión de la proteína Tom40p, componente principal de la translocasa TOM, se ha llevado a cabo mediante una estirpe en la que el promotor endógeno se ha sustituido por un promotor *TET* titrable. De manera, que la expresión de Tom40p se puede regular, mediante el suplemento de doxiciclina al medio de cultivo.

En la figura 10 se puede comprobar el efecto del antibiótico doxiciclina sobre esta estirpe mutante Tom40p(*Tet*) (R1158). La ausencia de crecimiento de las células de Tom40p(*Tet*) observada en medio de cultivo sólido suplementado con doxiciclina, ha puesto de manifiesto, que la presencia del antibiótico, está asociado a la eliminación de la proteína y confirma el carácter esencial de la misma (Baker, Schaniel et al. 1990, Taylor, McHale et al. 2003, Meisinger, Wiedemann et al. 2006, Sherman, Taylor et al. 2006).

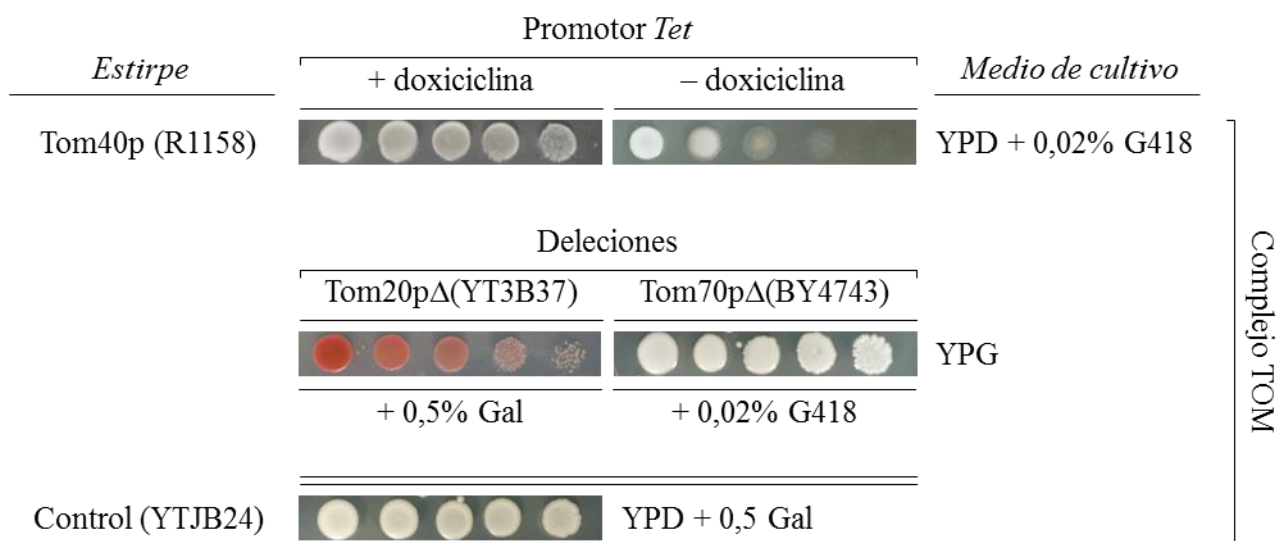


Figura 10. Crecimiento de las estirpes de *Saccharomyces Cerevisiae* mutantes en las proteínas componentes de las translocasas de membrana interna mitocondria *TIM22* y *TIM23*

Una o dos colonias de las cepas de *S. cerevisiae* mutantes en componentes de las translocasas *TIM22* o *TIM23* se han crecido en agitación, en medio de cultivo líquido, YPD + Gal, hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1, a 600 nm. Posteriormente se obtuvieron diluciones seriadas con un factor de dilución 1/10, de las que se depositaron 10 μ l o 30 μ l (en función de si el medio de cultivo sólido fuese YPD/YPG o SDLac, respectivamente) en placas de Petri con el medio sólido que se especifica en el margen derecho de la figura. Las células se han incubado a 30 °C durante 72h, salvo la estirpe termosensible Δ Tim54p, que se ha incubado a 24 °C.

El control frente a dos de los receptores del complejo TOM: Tom70p y Tom20p, se ha llevado a cabo mediante las estirpes, Δ Tom70p (BY4743), que contiene el gen marcador, frente a la geneticina, de tal forma, que solo las levaduras transformadas sobreviven en presencia del antibiótico y mediante la cepa Δ Tom20p (YT3B37) que porta la delección para esta proteína. En la figura se ha puesto de manifiesto que la eliminación tanto de Tom70p como de Tom20p, no es esencial para la supervivencia de las células (Iwahashi, Yamazaki et al. 1997, Iwata and Nakai 1998, Kerscher, Sepuri et al. 2000).

1.3. Mutantes en la porina mitocondrial

Finalmente, se ha comprobado la prevalencia de la mutación y el carácter esencial o no esencial, de las dos isoformas de la porina mitocondrial o canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC1 y VDAC2, descritas en *Saccharomyces cerevisiae* (BlachlyDyson, Song et al. 1997).

Con este fin, las estirpes mutantes en una, otra o las dos isoformas de VDAC, se han hecho crecer en medio sintético SD suplementado con CSM, manteniendo las condiciones necesarias para regular su expresión. Así el control sobre VDAC1 se ha llevado a cabo mediante la estirpe Δ Por1 (M22-2), que presenta la delección, de la mayor parte del gen que codifica esta proteína, sustituyéndolo por el gen marcador *LEU2*. Por su parte, el control sobre VDAC2 se ha estudiado también mediante la sustitución del gen, que la codifica por el gen marcador *TRP1*. Alternativamente la eliminación de ambas isoformas de la porina se ha analizado en una estirpe doble mutante Δ Por1 Δ Por2 (M22-2-1), en la que además del gen marcador *LEU2* que sustituye al gen de *VDAC1*, presenta la delección de *VDAC2*, mediante la inserción del gen *TRP1*. De esta forma, la expresión de ambas proteínas se encuentra condicionada, por la presencia en el medio de cultivo de los aminoácidos, leucina y/o triptófano (BlachlyDyson, Song et al. 1997). Por otra parte, en los casos en los que se ha eliminado VDAC1 las levaduras se vuelven termosensibles, reduciendo sensiblemente su crecimiento a 37 °C. En consecuencia, para obtener un crecimiento comparable entre las estirpes con delecciones en *VDAC2* y *VDAC1*, estas últimas, se han mantenido durante el doble de tiempo (96 horas) a 30 °C.

En la figura 11, se recogen los resultados del crecimiento de estas tres estirpes celulares, junto a los de su isogénica (M3), en los correspondientes medios de cultivo y temperaturas. En la misma, se ha puesto de manifiesto, que a pesar del aumento programado en el tiempo de incubación, la cepa Δ Por1 Δ Por2 presenta un crecimiento mucho más reducido que el del resto de las estirpes. Se ha observado también, una reducción de crecimiento, ligado al aumento la temperatura de incubación hasta 37 °C, que es mucho más acusada en las estirpes carentes de VDAC1.

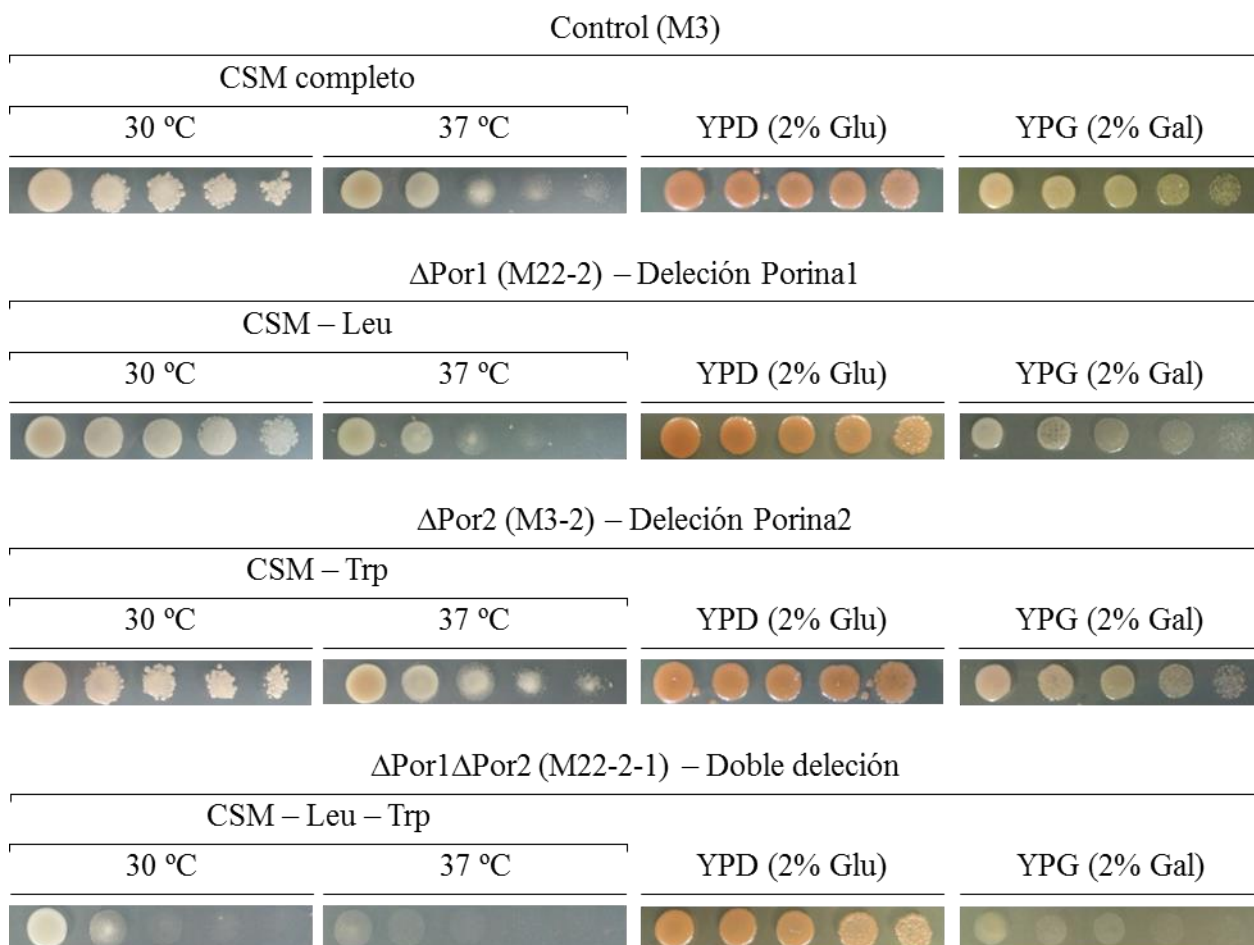


Figura 11. Crecimiento celular de las estirpes de *Saccharomyces Cerevisiae* mutantes en las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC o porina mitocondrial

Células de las estirpes isogénicas parental (M3), Δ Por1, Δ Por2 y Δ Por1 Δ Por2, se hicieron crecer en medio cultivo líquido YPD + Gal hasta alcanzar una densidad óptica de 1, a 600 nm. 10 μ l de las sucesivas diluciones seriadas de estas células, con un factor de dilución 1/10, se han depositado en placas de Petri con los medios y bajo las condiciones que se especifican en cada caso, así como en medios completos YPD y YPG. Las células se han incubado a 30 °C y 37 °C durante 48h, salvo la estirpe Δ Por1 y Δ Por1 Δ Por2, que se han incubado durante 96 horas. La incubación en los medios YPD y YPG se ha realizado durante 24 y 48 horas, respectivamente.

Igualmente, en la figura 11 se ha observado el efecto, de los dos medios de crecimiento empleados, para el aislamiento de las mitocondrias de estas células. Mientras que el medio YPD facilita mucho la proliferación celular, hasta el punto, que las colonias se han llegado a tornar de color rojizo, como consecuencia del estrés ocasionado por exceso de crecimiento, la tasa media de crecimiento de las células, cuando se ha sustituido la fuente de carbono de glucosa, por la galactosa, es considerablemente inferior, en particular en la estirpe $\Delta\text{Por1}\Delta\text{Por2}$.

2. Curvas de crecimiento

Como paso previo a la obtención de las preparaciones mitocondriales utilizadas en este estudio, es necesario llevar a cabo las curvas de crecimiento de todas las estirpes de levadura, con objeto de determinar, el tiempo de cultivo en el que las células alcanzan la fase logarítmica del crecimiento, y en consecuencia, establecer las condiciones experimentales óptimas para la obtención de un mayor rendimiento y homogeneidad en las preparaciones de mitocondrias aisladas.

2.1. Mutantes en las translocasas TIM22 y TIM23

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, viene dado por una función exponencial, pero con características singulares para cada estirpe mutante. En todos los casos se ha observado cómo las condiciones de crecimiento restrictivas, que condicionan la expresión de cualquiera de los tres componentes integrales de membrana del complejo TIM22, lleva consigo una progresiva disminución en la tasa de crecimiento celular. Resulta significativo, que esta disminución no solo se ha puesto de manifiesto cuando lo que se compromete, es la expresión de las proteínas consideradas como esenciales para la viabilidad, como Tim22p o Tim54p, sino también en el caso de Tim18p, proteína descrita por otros autores como no esencial para la supervivencia de las levaduras (Kerscher, Sepuri et al. 2000). En este sentido, cabe resaltar la singular dificultad de replicación que con respecto a su estirpe isogénica parental, presentan las células ΔTim18 , las cuales constitutivamente son deficientes en este componente.

En la figura 12, queda representado el crecimiento de las distintas estirpes mutantes en alguno de los componentes de la translocasa TIM22, que se han utilizado en este estudio. En ella, se indican también, los respectivos medios de crecimiento empleados para el control de la expresión de cada proteína.

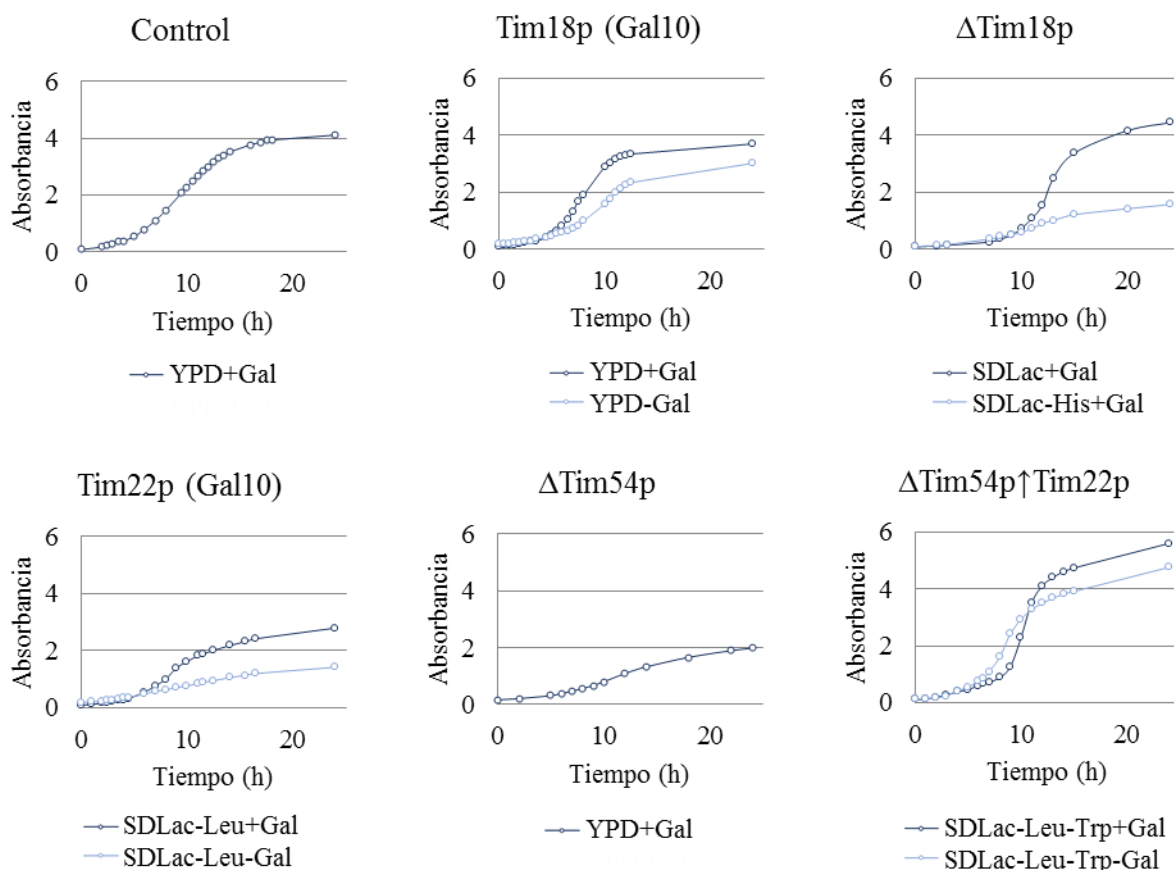


Figura 12. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en la translocasa TIM22

Colonias aisladas de cada estirpe se han incubado en condiciones aeróbicas mediante agitación constante a 200 rpm y a la temperatura de 30°C (con excepción de la cepa termosensible Tim54pΔ que mantiene a 24°C). Alcanzada una densidad óptica de 1, a 600 nm, una pequeña fracción de cada cultivo se ha diluido hasta una densidad óptica de 0,1, en un volumen de 25 ml, en el correspondiente medio de cultivo previamente atemperado; momento en el que se ha comenzado a hacer el seguimiento del crecimiento mediante la sucesiva toma de muestras en intervalos de aproximadamente una hora. En la figura se indican los respectivos medios de crecimiento utilizados para el control de la expresión de cada proteína. Las curvas de crecimiento se han construido a partir de los datos de 11 experimentos por cada línea celular.

Análogamente, en la figura 13, se ha representado el crecimiento de las dos estirpes de *Saccharomyces* mutantes, en la translocasa de membrana interna TIM23 que se han utilizado, y en las que las proteínas comprometidas son; Tim23p y Tim50p respectivamente. Las dos son consideradas como esenciales para la viabilidad celular y en ambos casos, la expresión se regula mediante la transducción del promotor *Gal10*, resultando evidente, que la eliminación de cualquiera de estas proteínas, posee efectos igualmente deletéreos para las levaduras.

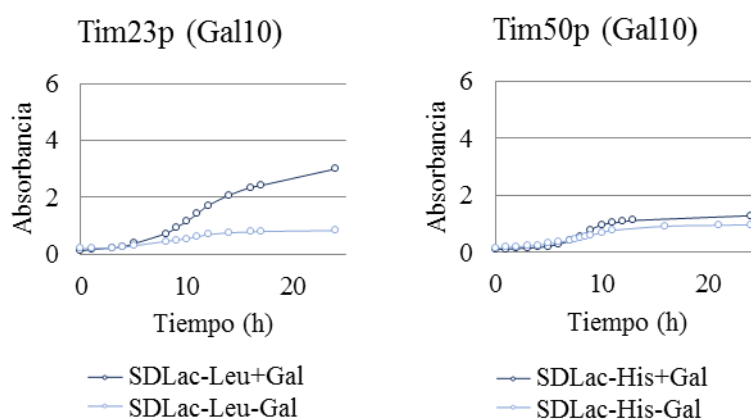


Figura 13. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en TIM23

Una o dos colonias aisladas de cada estirpe se han incubado en condiciones aeróbicas mediante agitación constante a 200 rpm y a la temperatura de 30°C. Alcanzada la densidad óptica de 1, a 600 nm, una pequeña fracción de cada cultivo se ha diluido hasta un volumen de 25 ml y una densidad óptica de 0,1; momento en el que se ha comenzado el seguimiento del crecimiento mediante la sucesiva toma de muestras en intervalos de tiempo de aproximadamente una hora. En la figura se indican los respectivos medios de crecimiento utilizados para el control de la expresión de cada proteína. Las curvas de crecimiento se han construido a partir de los resultados de 12 experimentos por cada línea celular.

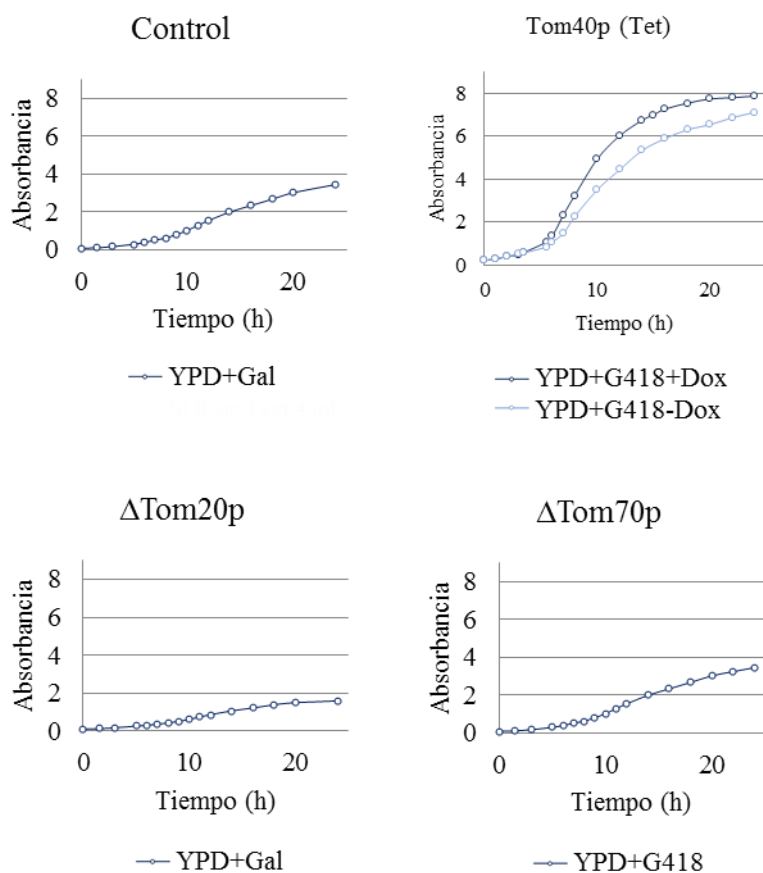
2.2. Mutantes en la translocasa TOM

Las tres proteínas, de la translocasa TOM, todas ellas integrales de membrana, cuya expresión se ha optado por modificar en este estudio, son la correspondiente al canal del complejo (Tom40p) y dos de los receptores del mismo (Tom20p y Tom70p) (Figura 14). Como en los casos precedentes, el efecto, sobre la replicación celular, de aquellas construcciones diseñadas para que de forma constitutiva repriman la expresión de un componente no esencial para la viabilidad, como ocurre en las células Δ Tom20 y

Δ Tom70, por lo general es más acusado, que el que se ha obtenido cuando se recurre a construcciones con expresión condicionada a la transducción de un promotor. Tal, es el caso, de la presencia del antibiótico doxiciclina en el medio de crecimiento, que al apagar la transducción del promotor *Tet*, en el que se ha insertado, la secuencia del gen *Tom40*, disminuye la tasa de replicación, en tanto en cuanto el recambio proteico de Tom40p se detiene por acción del antibiótico.

Figura 14. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en el complejo TOM

Colonias aisladas de cada estirpe se han incubado en condiciones aeróbicas mediante agitación constante a



200 rpm y a la temperatura de 30°C. Alcanzada una densidad óptica de 1, a 600 nm, una pequeña fracción de cada cultivo se ha diluido hasta un volumen de 25 ml y una densidad óptica de 0,1; momento en el que se ha comenzado a hacer el seguimiento del crecimiento mediante la sucesiva toma de muestras en intervalos de aproximadamente una hora. En la figura se indican los respectivos medios de crecimiento utilizados para el control de la expresión de cada proteína. Las curvas de crecimiento se han construido a partir de los resultados de 4 experimentos por cada línea celular.

2.3.Mutantes en la porina mitocondrial

Finalmente, en este estudio se han utilizado también varias estirpes mutantes en una, otra o las dos isoformas de la porina mitocondrial o VDAC, descritas en *Sacharommyces cerevisiae* (BlachlyDyson, Song et al. 1997) y al igual que en los casos anteriores, previo al aislamiento de las mitocondrias, es necesario conocer la pauta de la tasa de crecimiento de estas células.

En el crecimiento de estas estirpes se ha analizado, en primer lugar, las diferencias producidas por el efecto de la fuente de carbono utilizada. Por eso los cultivos de la estirpe parental (M3) y de los tres mutantes isogénicos (Δ Por1, Δ por2 y Δ Por1 Δ Por2) que se derivan de ella, se han incubado en medios conteniendo glucosa (YPD) o galactosa (YPG). La figura 15 recoge estos resultados. Si bien, la tasa de crecimiento llega a ser superior en glucosa que en galactosa, especialmente en las estirpes mutantes, la versatilidad de las levaduras para alternar su metabolismo entre aeróbico y anaeróbico y en consecuencia para poder modificar el número de mitocondrias, aconseja estimular primero la división celular en un medio con glucosa y transferir a continuación las células a un medio rico en galactosa.

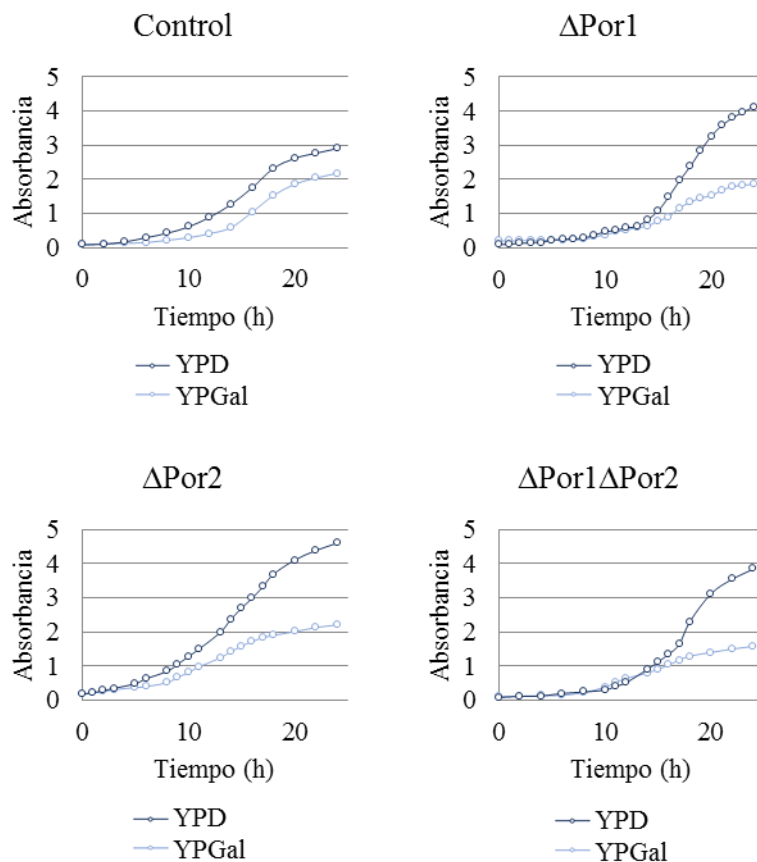


Figura 15. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes en las porinas mitocondriales

Colonias aisladas de cada estirpe se han incubado en condiciones aeróbicas mediante agitación constante a 200 rpm y a la temperatura de 30°C. Alcanzada una densidad óptica de 1, a 600 nm, una pequeña fracción de cada cultivo se ha diluido hasta un volumen de 25 ml y una densidad óptica de 0,1; momento en el que se ha comenzado a hacer el seguimiento del crecimiento mediante la sucesiva toma de muestras en intervalos de aproximadamente una hora. En la figura se indican los medios de crecimiento utilizados, YPD (glucosa) e YPG (galactosa). Las curvas de crecimiento se han construido a partir de los resultados de 8 experimentos por cada línea celular.

3. Caracterización proteica de las estirpes celulares

3.1. Mutantes en TIM22 y TIM23

Las proteínas Tim18p, Tim22p y Tim54p son componentes integrales de la translocasa TIM22 (Sirrenberg, Bauer et al. 1996, Kerscher, Holder et al. 1997, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000, Kovermann, Truscott et al. 2002, Rehling, Model et al. 2003, Gebert, Gebert et al. 2011), pero es posible que modificar, el nivel de expresión de cada una de ellas, altere de forma colateral, el de otra u otras proteínas integrantes de esta u otra translocasa mitocondrial.

Para comprobarlo, se han utilizado mitocondrias aisladas de cada estirpe mutante en Tim18p, Tim22p y Tim54p, así como, de una línea deficiente en Tim23p, componente principal de la translocasa TIM23 (Bauer, Sirrenberg et al. 1996, Donzeau, Káldi et al. 2000). Los niveles de expresión de proteínas observados en los Western blots y en los análisis densitométricos que los acompañan (figura 16), demuestran que tal y como se pretendía, en la líneas portadoras del promotor *Gal10*, el mantenimiento de las células durante 24 horas en ausencia de galactosa, consigue eliminar más del 95% de la proteína diana correspondiente: Tim18p o Tim22p respectivamente. De forma similar, las mitocondrias aisladas de estirpes Δ Tim54p \uparrow Tim22p y Δ Tim54p, se han mostrado totalmente deficientes en Tim54p. A su vez, se ha comprobado, que en las mitocondrias de la cepa Δ Tim54p \uparrow Tim22p, la ausencia de Tim54p se ve acompañada por un extraordinario incremento, superior al 500%, de la proteína Tim22p. Sin embargo, tal y como previamente se ha demostrado (Peixoto, Graña et al. 2007), la línea celular mutante en Tim23p mantiene la expresión, de los tres integrantes de TIM22 en niveles comparables a los de la cepa utilizada como control.

Como control de carga, en la caracterización proteica se ha empleado VDAC1, proteína mayoritaria de la membrana externa mitocondrial, cuya inserción en la misma es independiente de las translocasas TIM22 y TIM23 y que según se ha descrito, depende únicamente de la actuación de los complejos TOM y SAM de la membrana externa (Dihanich 1990, Pfaller, Kleene et al. 1990, Schleiff, Silvius et al. 1999, Krimmer, Rapaport et al. 2001, Paschen, Waizenegger et al. 2003, Kozjak-Pavlovic, Ross et al. 2007).

Además, en todos los casos, la comparación de los niveles de expresión de las diferentes proteínas, se ha llevado a cabo con respecto a una única cepa control (CDD38), con independencia de que sea o no la estirpe isogénicas de la que provienen el resto de los mutantes utilizados.

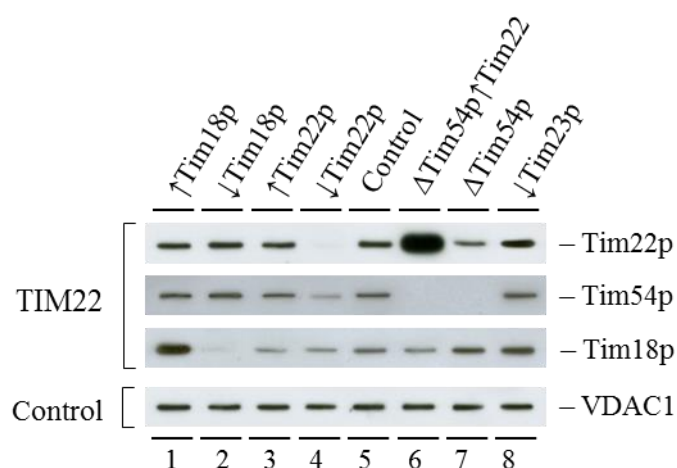


Figura 16. Composición proteica de la translocasa TIM22 en las estirpes mutantes en proteínas de los complejos TIM22 y TIM23

Las proteínas de las mitocondrias de la estirpe control (CDD38), así como las procedentes de levaduras genéticamente transformadas para modificar la expresión de los componentes integrales de la translocasa TIM22 y la proteína Tim23p integrante del complejo TIM23, crecidas tanto en presencia (↑) como durante 24 horas en ausencia (↓) de galactosa, fueron separadas mediante SDS-PAGE y sometidas a análisis de Western blot específico para los anticuerpos frente a las proteínas integrales del complejo TIM22. Como control de carga se ha utilizado VDAC1. Las cantidades de proteína que se han cargado por cada muestra oscilan entre 0,2 y 12 μ g de proteína total. Los anticuerpos frente a las proteínas Tim22p fueron utilizados en concentraciones de 1:10000, usando como secundario el anticuerpo α Goat en concentración 1:3000; las proteínas Tim18p y Tim54p fueron detectadas con anticuerpos policlonales en concentración 1:3000, empleando como secundario el anticuerpo α Rabbit en concentración 1:5000; finalmente la detección de la

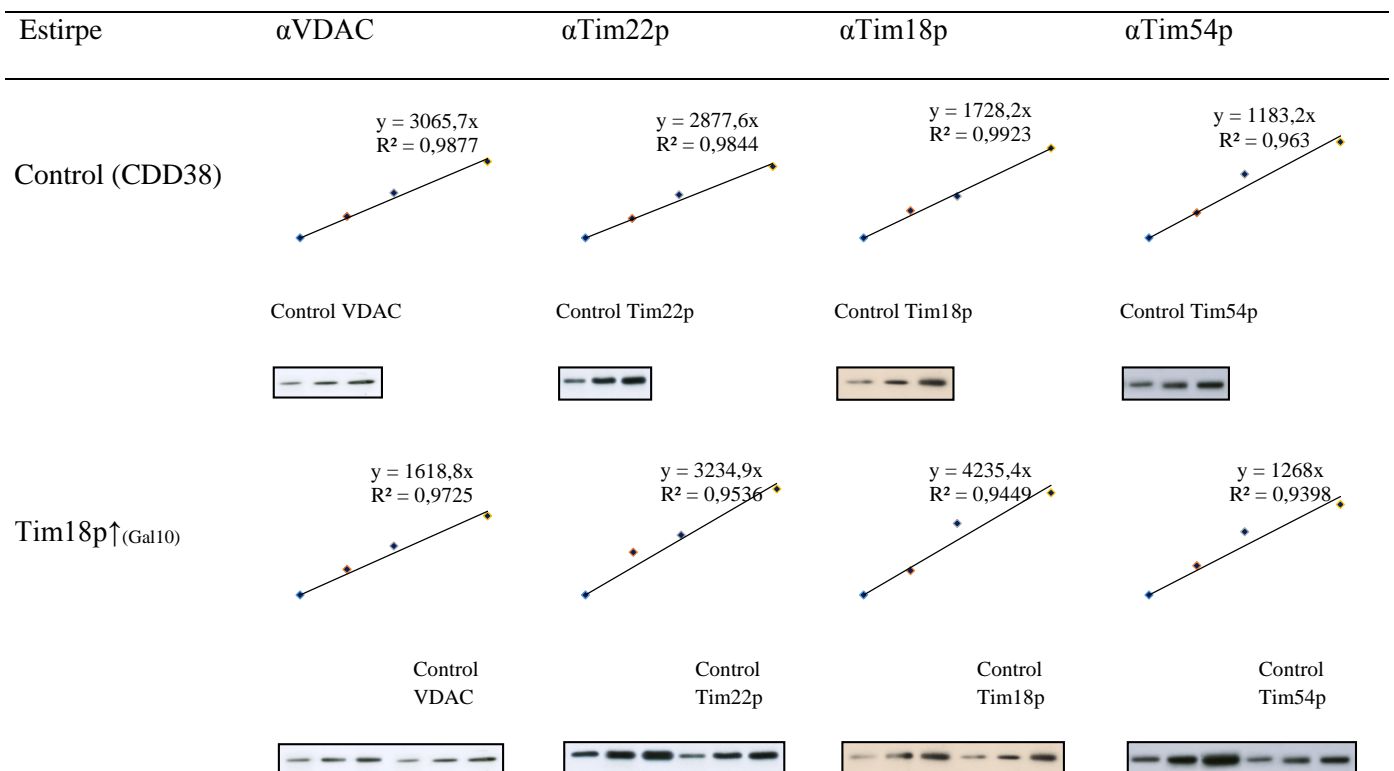
porina mitocondrial VDAC1 se ha realizado con anticuerpo monoclonal en concentración 1:10000 e incubando con el anticuerpo secundario α Mouse en concentración 1:2500.

Como cabe esperar de las mutaciones genéticas en las que el promotor endógeno se sustituye por el promotor *Gal10*, el gen afectado se sobre expresa. Este hecho, explica, que en presencia de galactosa los niveles de las proteínas Tim18p y Tim22p, en las cepas Tim18p_(Gal10) y Tim23p_(Gal10) respectivamente, sean considerablemente superiores, al de la cepa control, con la que se comparan y que se establece en el 100%. Por su parte, la línea celular Tim22p_(Gal10) presenta un nivel reducido de todos los componentes de la translocasa TIM22, este hecho parece estar asociado al diferente “background” genético de esta línea, con respecto a la estirpe utilizada como control.

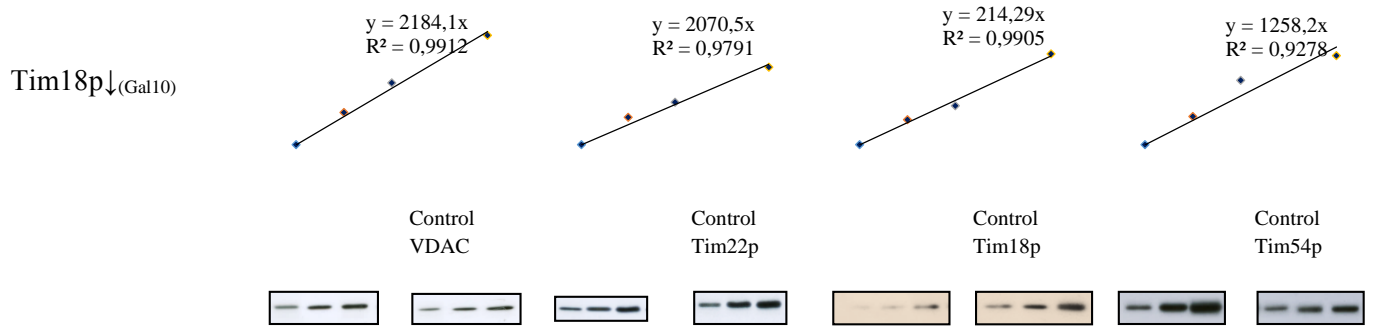
La cuantificación, de los niveles de expresión de cada proteína, se ha realizado mediante el análisis densitométrico de electroforesis, en condiciones desnaturalizantes, de cantidades crecientes de proteínas, obtenidas de los lisados de mitocondrias de cada estirpe mutante utilizada en este estudio, comparadas en todos los casos, con respecto a lisados mitocondriales de la estirpe control (CDD38).

La cantidad de proteína que se ha utilizado en estos estudios, varía en función de la estirpe y del anticuerpo empleado para la inmunodetección; de tal forma que la intensidad de las señales de los Western blots puedan ser analizada, siendo comparable entre las distintas estirpes y permita establecer una correlación lineal entre la cantidad de proteína y la señal obtenida. En la figura 17 se representan los resultados obtenidos. El método de análisis de la dotación proteica de las distintas estirpes queda representado a continuación en las tablas, distinguiendo las estirpes, en función de la proteína manipulada en cada caso.

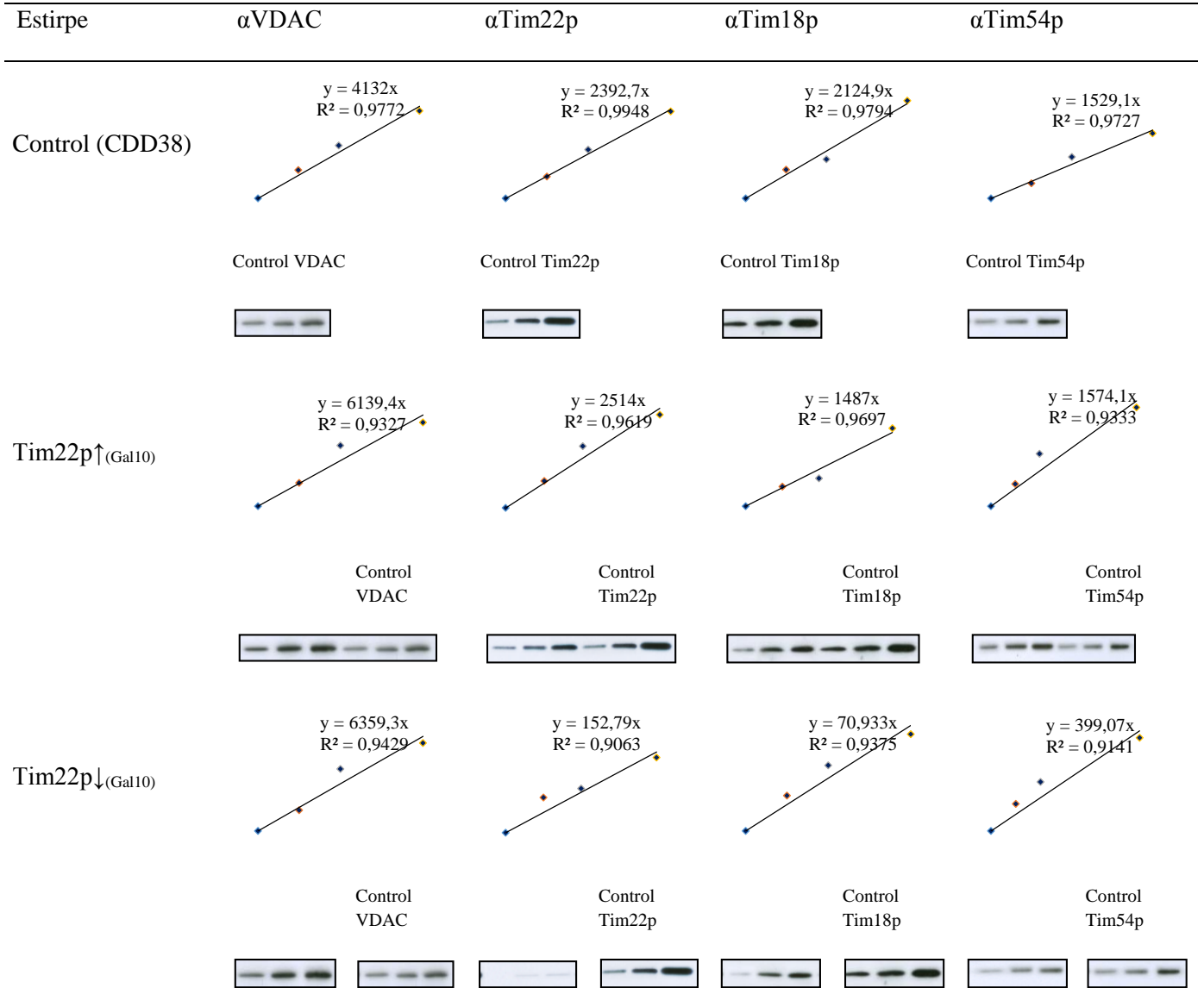
Mutantes en Tim18p



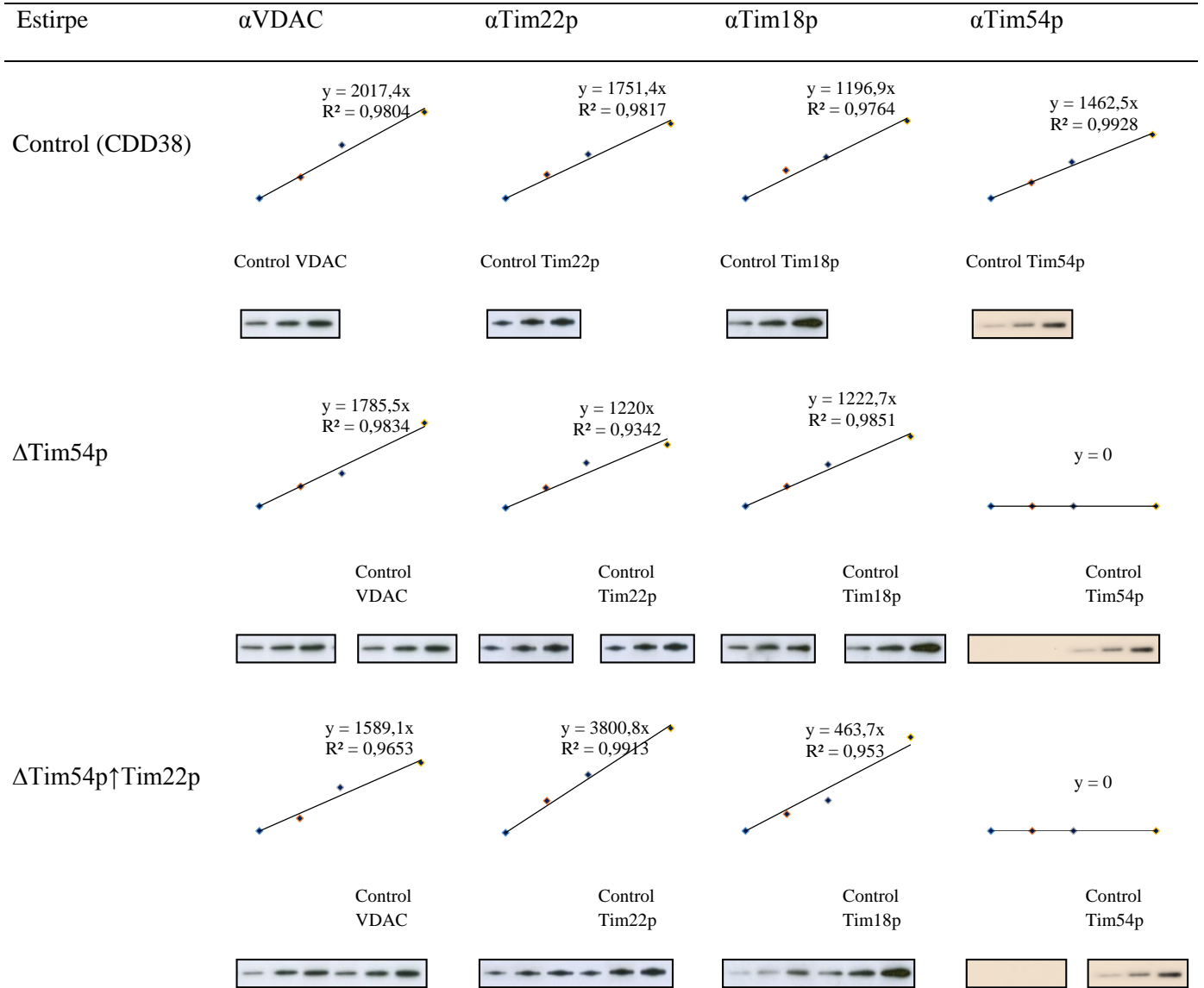
Resultados



Mutantes en Tim22p



Mutantes en Tim54p



Mutantes en Tim23p

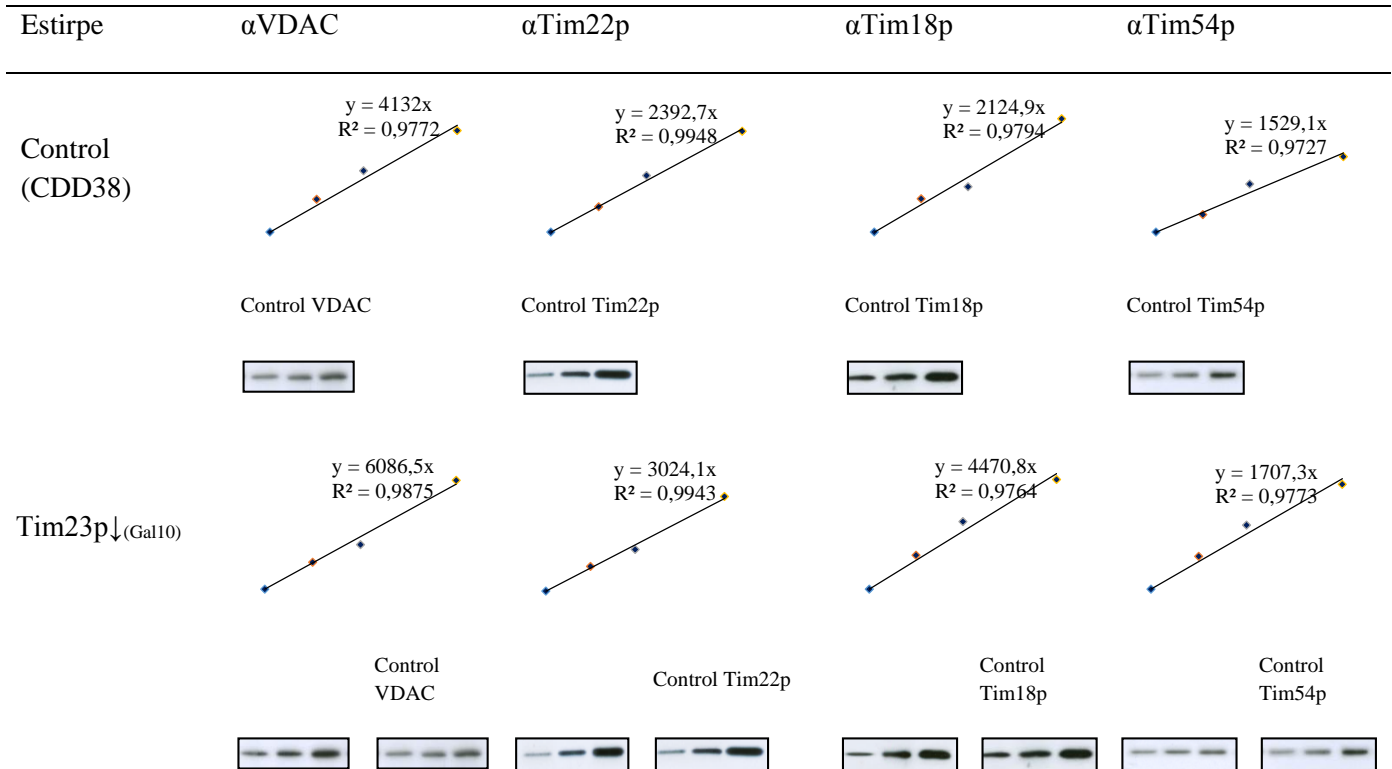


Figura 17. Caracterización proteica de las líneas celulares mutantes en TIM22 y TIM23.

Lisados mitocondriales procedentes de levaduras en las que la expresión de los componentes integrales de TIM22 y TIM23 se encuentra modificada, se han separado mediante SDS-PAGE y analizado mediante Western blot con anticuerpos frente a las tres proteínas integrales de TIM22 y frente a VDAC1, que se ha utilizado como control de carga. Las cantidades de proteína que se han cargado en cada pocillo oscilan entre 0,2 y 20 μ g de proteína total. Los puntos de las gráficas corresponden a las áreas densitométricas obtenidas mediante el análisis de los westerns, con respecto a la estirpe control CDD38. Los análisis se han realizado mediante el software informático ImageJ 1.33u, NIH, EEUU. En práctica totalidad de los casos el nivel de correlación entre los valores densitométricos obtenidos es superior al 0,97.

Los histogramas representativos de la expresión de proteínas, observados en los análisis densitométricos de los Westerns, se han realizado con los datos de al menos 4 experimentos procedentes de distintas preparaciones (Figura 18). Se ha tomado como

referencia (100%) el nivel de cada proteína en la estirpe control. El resto de proteínas analizadas se han correlacionando con la expresión proteica de esta estirpe, con respecto al nivel de expresión de la proteína VDAC1 tomada como control de carga.

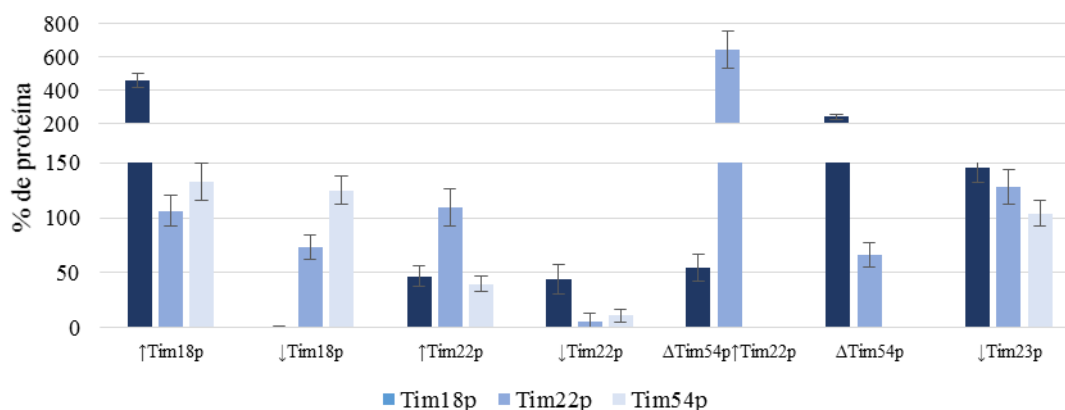


Figura 18. Nivel de expresión de los componentes de la translocasa TIM22 en las estirpes de levadura utilizadas en el estudio

Los diagramas expresan los porcentajes de expresión de las proteínas a estudio en las distintas estirpes de *Saccharomyces* expresadas, con respecto a la cepa utilizada como control. Los valores se han obtenido mediante el análisis densitométrico de las bandas representadas en los blots, de al menos 5 experimentos por estirpe, mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU. Se ha utilizado VDAC1 como control de carga.

La proteína Tim18p es la única del complejo TIM22, considerada no esencial para la viabilidad celular, algo que concuerda con mis resultados experimentales. En la figura 18 se puede observar además cómo, ni su eliminación en las mitocondrias de la estirpe Tim18p↓(*Gal10*) (calle 2), ni su sobre expresión en la cepa Tim18p↑(*Gal10*) (calle 1), alteran significativamente los niveles de los otros dos componentes de la translocasa TIM22. Sin embargo, la eliminación de Tim22p o de Tim54p, las otras dos proteínas, esenciales de este complejo, no es independiente, y compromete en mayor o menor medida los niveles de expresión del resto de componentes de esta translocasa.

Para estudiar si las alteraciones provocadas en la translocasa TIM22 inducen algún cambio en los componentes de la segunda translocasa de la membrana interna TIM23, se ha seguido una estrategia idéntica a la anterior. Mitocondrias procedentes de las estirpes

mutantes en los tres componentes esenciales de TIM22 se han analizado mediante Western blot e inmunodetección con anticuerpos frente a Tim23p, Tim17p y Tim50p, componentes integrales de la translocasa TIM23.

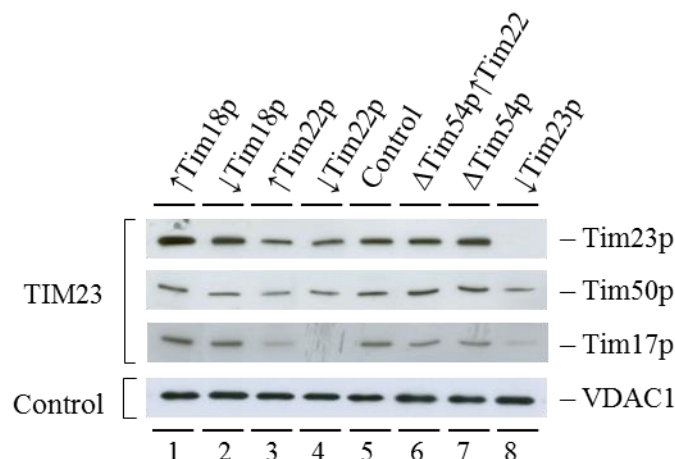


Figura 19. Composición proteica de la translocasa TIM23 en las estirpes mutantes en los complejos TIM22 y TIM23

Las proteínas de las mitocondrias de la estirpe control (CDD38), así como las procedentes de células genéticamente transformadas, crecidas tanto en presencia (↑) como durante 24 horas en ausencia (↓) de galactosa, fueron separadas mediante SDS-PAGE y sometidas a análisis de Western blot específico para los anticuerpos frente a las proteínas integrales del complejo TIM23, usando como control de carga a VDAC1. Las cantidades de proteína que se han cargado por cada muestra oscilan entre 0,2 y 6 μg de proteína total. Los anticuerpos frente a las proteínas Tim23p y Tim17p fueron utilizados en concentraciones de 1:10000, usando como secundario el anticuerpo αGoat en concentración 1:3000; la proteína Tim50p ha sido detectada con anticuerpos policlonales en concentración 1:5000, empleando como secundario el anticuerpo αRabbit en concentración 1:5000; finalmente la detección de la porina mitocondrial VDAC1 se ha realizado con anticuerpo monoclonal en concentración 1:10000 e incubando con el anticuerpo secundario αMouse en concentración 1:2500.

En la figura 20 se observa cómo la alteración en el nivel de Tim18p o Tim54p inherente a las cepas $\uparrow\text{Tim18p}$, $\downarrow\text{Tim18p}$, $\Delta\text{Tim54p}\uparrow\text{Tim22p}$ y ΔTim54p , no conlleva efectos significativos en el nivel de expresión de las proteínas integrales de TIM23: Tim17p y Tim50p, aunque sí se observa una sobre expresión de Tim23p, especialmente acusada en las estirpes mutantes en Tim18p.

Por su parte, modificar la expresión de Tim22p en la cepa Tim22_(Gal10), tanto al sobre expresarla (\uparrow Tim22p) como al eliminarla (\downarrow Tim22p), conlleva una cierta disminución en todos los componentes de TIM23, siendo los niveles de Tim17p los que se ven reducidos hasta porcentajes prácticamente testimoniales.

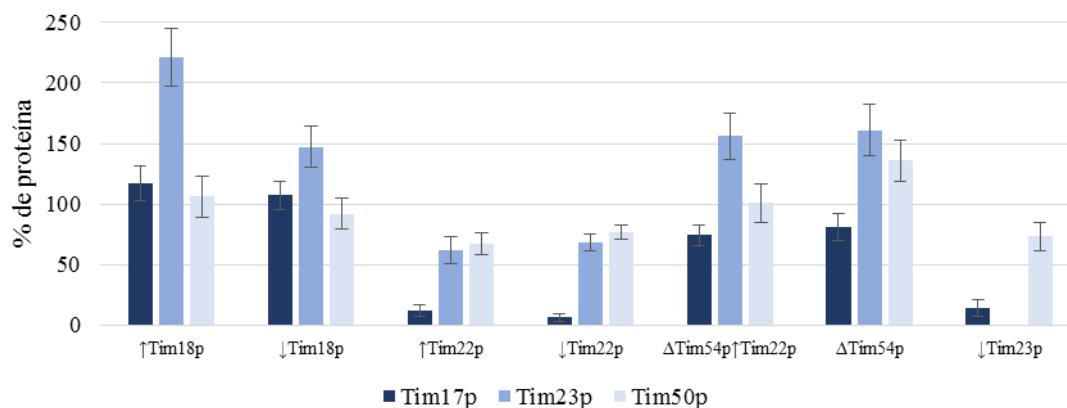


Figura 20. Nivel de expresión de los componentes integrales de la translocasa TIM23 en las estirpes mutantes en el complejo TIM22 o en la proteína Tim23

La representación gráfica de la cuantificación de la expresión de las proteínas a estudio en las estirpes mutantes de levadura, se ha realizado mediante diagramas de barras, expresando los resultados en porcentaje. Los valores se han obtenido por el análisis de al menos 9 experimentos por estirpe, y son el resultado del análisis densitométrico de las bandas proteicas representadas en los blots, mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU, los valores se ha representado en función del nivel de expresión de las proteínas en la estirpe CDD38, utilizando a VDAC1 como control de carga.

3.2. Mutantes en la porina mitocondrial

Finalmente, en este estudio se han utilizado varias estirpes mutantes en las dos isoformas de la porina mitocondrial o VDAC.

El estudio del efecto que tiene sobre los componentes de la translocasa TIM22, la alteración en el nivel de expresión de las porinas mitocondriales, se ha analizado en lisados mitocondriales de las tres estirpes mutantes en VDAC, Δ Por1, Δ por2 y Δ Por1 Δ Por2, así como de su estirpe isogénica. Los niveles de expresión de proteínas se han determinado siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos anteriores. Así, estos valores se han obtenido mediante el análisis densitométrico de los blots para cada una de estas proteínas (Figura 21).

Al no disponerse de un anticuerpo frente a VDAC2, su presencia o ausencia se ha determinado mediante su expresión génica. Así, se han utilizado ARNm aislados de cada estirpe mutante utilizadas. Este se ha sometido a retrotranscripción y el ADNc obtenido se ha amplificado mediante PCR con primers específicos diseñados frente a la región del gen *VDAC2* no truncado. La detección de *VDAC2* se ha llevado a cabo sometiendo los productos de PCR a electroforesis de ácidos nucleicos.

Se ha demostrado que las líneas celulares mutantes tanto en *VDAC1* como en *VDAC2*, son totalmente deficientes en las respectivas isoformas de VDAC (Figura 21. A. y B.). A su vez, se ha comprobado que en mitocondrias de las cepas Δ Por1 y Δ Por1 Δ Por2, la ausencia de *VDAC1* no parece estar asociada con modificaciones significativas del nivel de expresión de Tim18p y Tim22p, siendo estos comparables a los de su parental. Por su parte, el nivel de expresión de Tim54p en ausencia de *VDAC1* se ve alterado de forma singular. De tal manera que la alteración en la expresión de *VDAC1* en la estirpe Δ Por1, está asociada a una ligera reducción del nivel de expresión de Tim54p en torno a un 30%. Por su parte en las mitocondrias del doble mutante se produce una sobre expresión de Tim54p próxima al 250%.

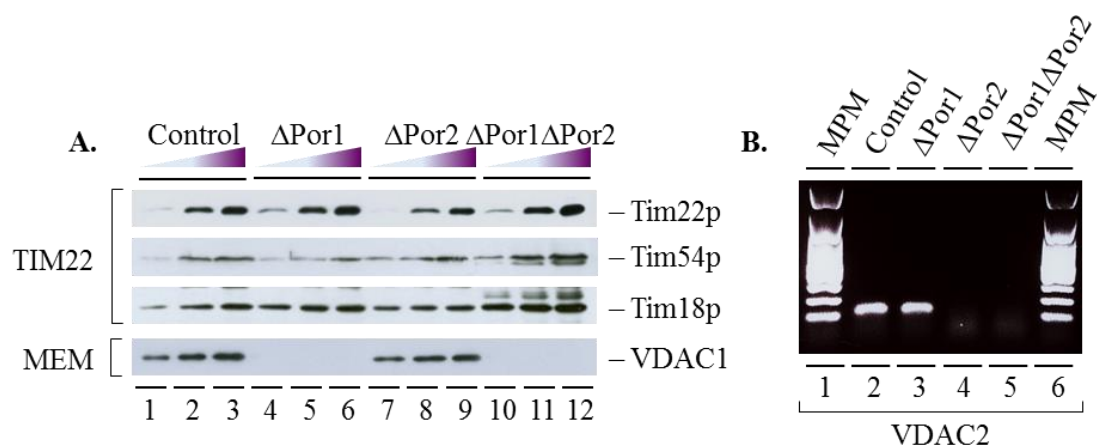


Figura 21. Composición proteica de la translocasa TIM22 y de las isoformas de VDAC en las estirpes mutantes en las porinas mitocondriales

A. Lisados de las mitocondrias de la estirpe control (M3), así como sus isogénicas deficientes en *VDAC1* y *VDAC2*, se han separado mediante SDS-PAGE y sometido a análisis de Western blot con anticuerpos frente a las proteínas integrales del complejo TIM22. En este caso, como control de carga se ha utilizado la cantidad de proteína total determinada tras el lisado de las mitocondrias. Las cantidad de proteína que se ha cargado por cada muestra oscila entre 0,5 y 2,0 μ g. **B.** La expresión de *VDAC2* se ha analizado mediante la separación electroforética de 5 μ l del producto de PCR procedente de la retrotranscripción de los ARNm obtenidos para cada una de las estirpes, en gel de agarosa a una concentración del 0,7%.

Por el contrario, la estirpe Δ Por2 presenta un nivel de expresión de Tim54p similar al de la parental, mientras que experimenta una reducción cercana al 50% en la expresión de los otros dos componentes de la translocasa TIM22. Si bien, parece que la deficiencia en la porina VDAC2 se compensa con un ligero aumento en el nivel de expresión de VDAC1.

Ante la imposibilidad de utilizar como control de carga para la inmunodetección la proteína VDAC1, se ha optado por cargar en cada calle la misma cantidad de proteína total, determinada tras la extracción con tampón de lisis de cada preparación de mitocondrias.

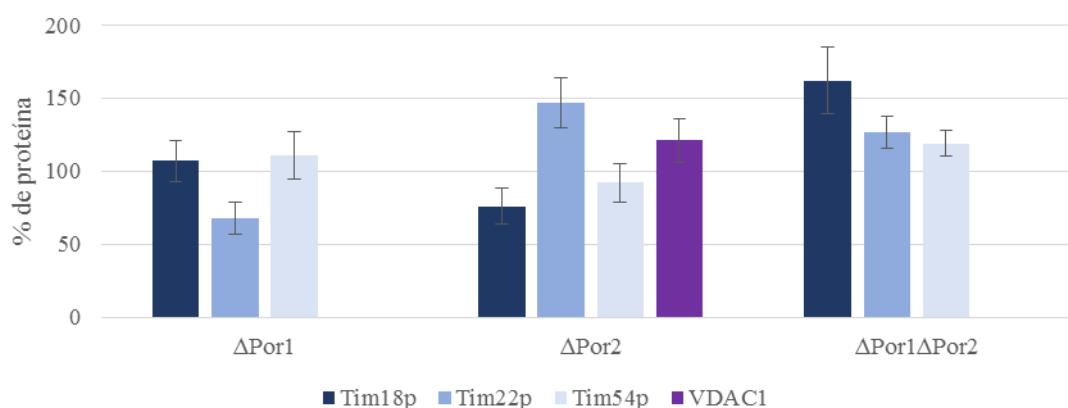


Figura 22. Nivel de expresión de los componentes integrales de la translocasa TIM22 en las estirpes mutantes en las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje

La representación gráfica de la cuantificación del nivel de expresión de las proteínas a estudio en las estirpes mutantes de *Saccharomyces*, se ha realizado mediante diagramas de barras, representando los resultados en porcentaje. Los valores se han obtenidos por el análisis de al menos 8 experimentos por estirpe, y son el resultado del análisis densitométrico de las bandas proteicas representadas en los blots, mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU los valores se ha representado en función del nivel de expresión de las proteínas en la estirpe CDD38, utilizando a VDAC1 como control de carga.

4. Caracterización bioquímica de las translocasa TIM22

Como ya se ha descrito, la translocasa TIM22 está integrada por las proteínas Tim18p, Tim22p y Tim54p, que en levaduras se localizan formando parte de un único complejo de masa molecular aproximada de 300 kDa, cuando las mitocondrias se someten a electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Koehler, Murphy et al. 2000). Por ello se ha querido estudiar cómo la estabilidad de esta asociación, se ve modificada por la eliminación de cualquiera de sus componentes. Para ello, se han realizado electroforesis en condiciones no desnaturizantes o BN-PAGE, de lisados mitocondriales procedentes de todas las líneas celulares anteriormente descritas.

No obstante y como paso previo a la caracterización bioquímica del complejo TIM22, se ha decidido optimizar la cantidad de detergente que en este tipo de experimentos es necesario utilizar para disgregar las dos membranas mitocondriales, y extender el estudio también al efecto que produce sobre la integridad de las otras dos translocasas: TOM y TIM23, respectivamente. De acuerdo con la bibliografía consultada, la cantidad recomendada de digitonina, el detergente aniónico más utilizado para la preparación de extractos procedentes de mitocondrias aisladas, oscila entre el 0,5% y el 2% (Schägger and von Jagow 1991, Dekker, Martin et al. 1997, Cruciat, Brunner et al. 2000, Dienhart and Stuart 2008, Saddar, Dienhart et al. 2008). De tal modo, tras el aislamiento de las mitocondrias, se han realizado extracciones de proteínas con cantidades crecientes de este detergente, abarcando un amplio rango de concentraciones, desde el 0,25% al 10% de digitonina. Esto, ha permitido establecer las condiciones óptimas del tratamiento con digitonina que se han empleado en experimentos posteriores; entendiendo por tales, la concentración y tiempo de incubación en presencia de digitonina, con los que la disgregación entre los lípidos y las proteínas de las membranas mitocondriales se extiende hasta conseguir solubilizar la máxima cantidad de complejo TIM22 en estado nativo. Es decir, sin que la acción del detergente llegue a desensamblar el complejo y/o a desnaturizar sus componentes individuales.

Los extractos mitocondriales tratados con digitonina, según se describe en el apartado 2.6., se han analizado a continuación mediante electroforesis no desnaturizante (apartado 2.10.1. de Material y Métodos), cargando en todas las calles la misma cantidad total de proteína. En la figura 23. A. se ha puesto de manifiesto el efecto que ejerce sobre

la translocasa TIM22 la concentración de digitonina empleada en la preparación de los extractos. Se aprecia, que incluso con concentraciones de detergente de 0,25% (calle 2), inferiores a las recomendadas en la bibliografía, ya se obtiene una señal con una masa aproximada de 300 kDa, característica del complejo TIM22 (Koehler, Murphy et al. 2000).

El análisis de este experimento, permite establecer que el rango de concentraciones de digitonina, entre las cuales, la integridad del complejo TIM22 permanece inalterada, se podría fijar entre el 0,25% y el 2%. Por el contrario, el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones superiores al 2% de digitonina da como resultado una progresiva disminución en la intensidad de las señales del complejo (Figura 23. D.), consecuencia probable de la incipiente desnaturalización ocasionada por la digitonina (Stubbs, Smith et al. 1976).

Para excluir la posibilidad de que la disminución de la señal del complejo nativo que se ha observado con las concentraciones de detergentes más elevadas, sea consecuencia de la degradación de la propia proteína Tim22p (utilizada en la inmunodetección), las muestras se han sometido de forma paralela, a electroforesis en condiciones desnaturalizantes, seguida de inmunodetección, sin que se observasen cambios significativos en la cantidad neta de Tim22p (Figura 23. C.). Por lo que cabe interpretar que la disminución de la señal correspondiente al complejo TIM22 en BN-PAGE, tras el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones de digitonina superiores al 2%, podría ser atribuido a una disociación del mismo, y a la consecuente y rápida movilidad de la proteína Tim22p libre, que migraría con el frente del gel en la electroforesis (Dienhart and Stuart 2008).

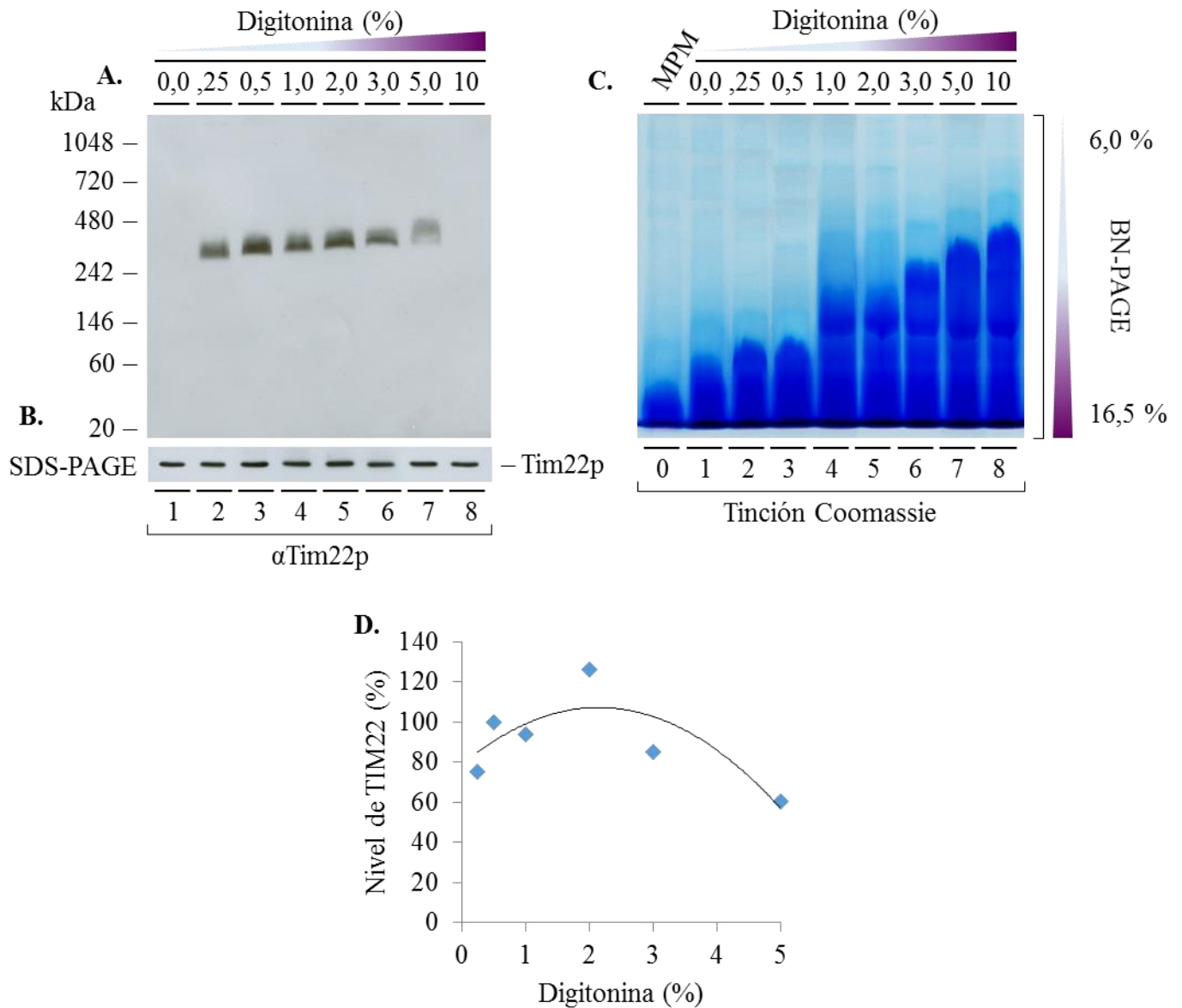


Figura 23. Efecto de la digitonina sobre la integridad molecular de la translocasa TIM22

A. Mitocondrias de la estirpe control (CDD38) se han lisado empleando cantidades crecientes de digitonina y separado mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o BN-PAGE, utilizando para ello un gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 16,5%. De cada muestra se ha cargado 5 μ g de proteína total por calle. La inmunodetección se ha realizado con el anticuerpo frente a Tim22p a una concentración de 1:5000. **B.** Las muestras de BN-PAGE se han sometido paralelamente a electroforesis SDS-PAGE, resuspendiéndolas directamente en tampón Laemmli, sin calentamiento. En cada calle se han cargado 5 μ g de proteína total y la inmunodetección se ha llevado a cabo con el anticuerpo α Tim22p. **C.** Imagen del mismo gel tras la BN-PAGE. **D.** Representación de la densidad de las señales del complejo TIM22 obtenidas en A. Los valores se han expresado en porcentaje y en función de la señal de muestra tratada con 0,5% de digitonina, a la que se ha asignado el valor del 100%.

No obstante, en la figura 23. A., también se observa una progresiva modificación del patrón de migración de la translocasa TIM22, en función del aumento de la concentración de digitonina. De tal manera que la migración se ralentiza con el aumento de la concentración del detergente. Este efecto también se ha detectado en el propio gel durante la electroforesis (Figura 23. B.), apreciándose un progresivo aumento de la señal de arrastre que deja el Coomassie G-250, presente en el buffer del cátodo, con el aumento de la concentración de digitonina en las muestras.

Finalmente, a pesar de que la concentración óptima de digitonina pudiera encontrarse alrededor del 2%, se ha optado por una concentración menor, del 0,5%, en la que la interferencia en la migración ocasionada por el azul de Coomassie es mínima.

Ante la posibilidad de la existencia de interacciones entre las translocasas, se hace conveniente determinar también el efecto de la disgregación con digitonina sobre las otras translocasas mitocondriales, TIM23 y TOM.

La translocasa TIM23 se encuentra integrada por las proteínas Tim17p, Tim23p y Tim50p, las cuales se encuentran agrupadas formando distintos complejos de masa molecular comprendida entre 250 y 100 kDa, indicativos de las sucesivas etapas de la biogénesis de esta translocasa (Zhang, Xu et al. 2012). Por su parte, el complejo TOM está formado por un mayor número de proteínas, Tom40p, Tom5p, Tom6p, Tom7p y los receptores Tom20p, Tom22p y Tom70p. En las electroforesis en condiciones nativas todas estas proteínas se pueden localizar formando un único complejo de masa molecular aproximada de 400 kDa (Dekker, Ryan et al. 1998).

El estudio del efecto que produce la digitonina sobre la integridad de TOM y TIM23, se ha realizado reproduciendo el experimento anterior. Para ello se han sometido a BN-PAGE los lisados mitocondriales previamente descritos. Estas electroforesis se han analizado empleando en la inmunodetección los anticuerpos frente a las proteínas Tom40p y Tim23p, componentes principales de cada una de estas translocasas.

La figura 24. A. muestra el efecto producido sobre la translocasa TOM por el aumento de la concentración de digitonina durante el procesamiento de las mitocondrias. El efecto del detergente se puede comprobar que es similar al que se observa en los

immunoblots revelados con α Tim22p. A concentraciones de detergente de 0,25% ya se ha obtenido una señal, en este caso con una masa aproximada de 400 kDa, coincidente con lo que se espera para la translocasa TOM (Dekker, Ryan et al. 1998, Model, Meisinger et al. 2001, Dukanovic, Dimmer et al. 2009, Becker, Wenz et al. 2011). Se ha detectado también cómo el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones de digitonina superiores al 2% resulta en una progresiva disminución en la intensidad de la señal obtenida. Finalmente, a una concentración del 10% se ha llegado a observar la disgregación de TOM en dos subcomplejos distintos.

Por su parte, el efecto de la digitonina sobre la translocasa TIM23 (Figura 24. B.) indica que el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones de detergente superiores al 0,5% ya afecta de forma significativa al patrón de bandas característico de esta translocasa. Se observa una progresiva desaparición de las formas moleculares de menor masa molecular con el aumento de la concentración de digitonina. A concentraciones del 5 y 10% se llega a producir la degradación completa del complejo (calles 7 y 8).

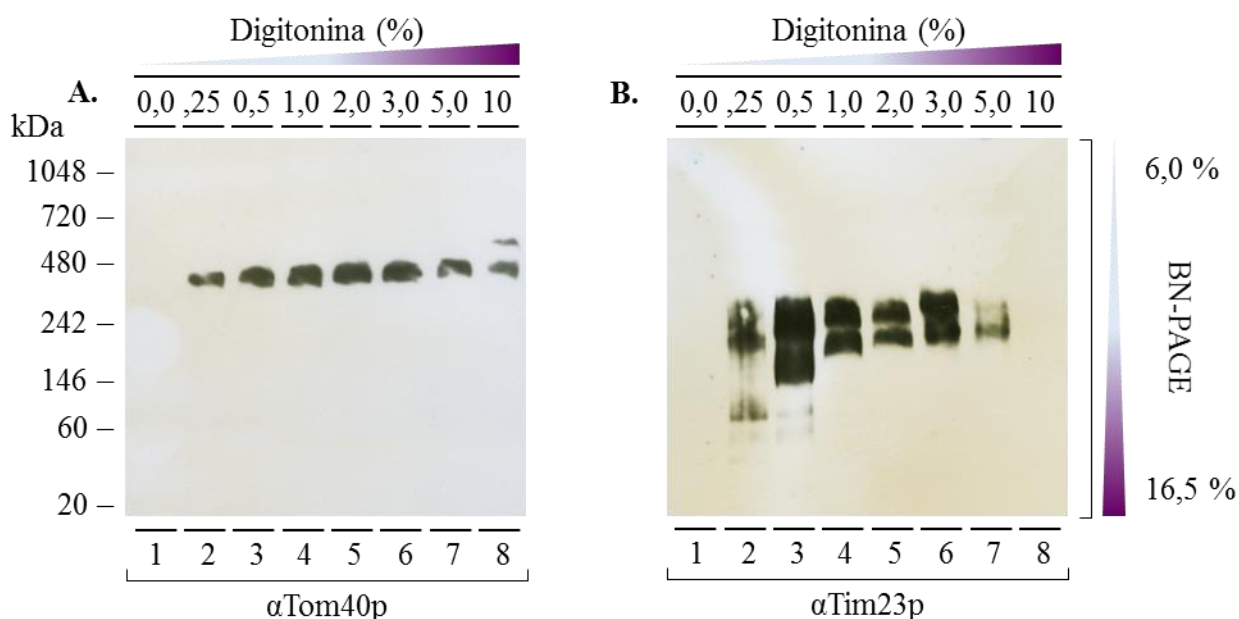


Figura 24. Efecto de la digitonina sobre la integridad molecular de las translocasas TOM y TIM23

Mitocondrias de la estirpe control (CDD38), se han lisado con cantidades crecientes de digitonina, y se han separado mediante electroforesis BN-PAGE, en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. Para cada muestra se ha cargado 5 μ g de proteína total. A. La inmunodetección se ha realizado con el anticuerpo α Tom40p a una concentración de 1:4000, usando como secundario el antisuero α Rabbit en concentración 1:5000. B. La inmunodetección del complejo TIM23 se ha llevado a cabo con el anticuerpo frente a Tim23p a una concentración de 1:5000, usando como secundario el antisuero α Goat en concentración 1:3000. Los tiempos y condiciones de incubación de los anticuerpos han sido: primario, durante toda la noche a 4 °C, y secundario, durante una hora y media a temperatura ambiente.

A la vista de todos los resultados anteriores y teniendo en cuenta los efectos producidos por la digitonina sobre los patrones de bandas, el desplazamiento y la disgregación de las tres translocasas (TOM, TIM23 y TIM22), así como los problemas inherentes derivados de la utilización de detergentes en membrana (Shukolyukov 2009), finalmente para la preparación de los extractos proteicos se ha optado por utilizar una concentración de digitonina del 0,5% en peso/volumen.

4.1. Estructura nativa y composición molecular de la translocasa TIM22

A continuación se ha querido comprobar si además de Tim22p, las otras dos proteínas de membrana del complejo TIM22, están también presentes en la banda de 300 kDa que se reconoce en las electroforesis no desnaturalizantes (Figura 23). Para ello, la primera aproximación utilizada ha sido la identificación de las subunidades del complejo TIM22 que co-inmunoprecipitan con el anticuerpo α Tim22p.

La co-inmunoprecipitación se ha realizado empleando mitocondrias de la estirpe control CDD38, solubilizadas en tampón de lisis conteniendo un 0,5% de digitonina. Este lisado se ha incubado con el anticuerpo α Tim22p, previamente inmovilizado en un soporte inerte de Dynabeads. Tras la correspondiente elución las proteínas que se encuentran interaccionando con Tim22p se han separado e identificado mediante electroforesis SDS-PAGE, seguida de western blots.

Paralelamente y con el fin de descartar la posibilidad de co-inmunoprecipitaciones inespecíficas, en todos los casos se han llevado a cabo una serie de controles. Así por cada muestra se han analizado también las señales debidas a: el suero preinmune del animal previo a su inoculación con el antígeno, el propio anticuerpo α Tim22p, las señales debidas a otro anticuerpo no dirigido frente a Tim22p (IgG α Goat). Además en los experimentos se ha incluido una muestra de mitocondrias intactas de la estirpe control, otra del lisado mitocondrial tras el tratamiento con digitonina y también del sobrenadante que se descarta tras la co-inmunoprecipitación. Estas tres últimas muestras se corresponden con las diferentes etapas del proceso de lisis y extracción de complejos al que se someten las mitocondrias, al tiempo que permiten una estimación de la eficacia del proceso de co-inmunoprecipitación. Por último y además del propio co-inmunoprecipitado con anticuerpo α Tim22p, se ha llevado a cabo una co-inmunoprecipitación control con anticuerpo α Goat, cuyo resultado se ha analizado en paralelo, con el fin de descartar posibles interacciones inespecíficas.

La figura 25 muestra el resultado de la inmunodetección revelada con α Tim22p de una de estas co-inmunoprecipitaciones. La calle 1 pone de manifiesto que este anticuerpo (α Tim22p) no interacciona con el suero preinmune del animal en el que se ha obtenido (Cabra). Por otra parte, la IgG α Goat sometida a electroforesis, cuando se revela

con α Tim22p, da una serie de bandas de masas moleculares superiores a 50 kDa (calle 2); mientras que la electroforesis del anticuerpo α Tim22p, revelado consigo mismo, además de compartir estas bandas de masa molecular superior a 50 kDa, da dos señales más características de los anticuerpos, una de 50 kDa, típica de las cadenas pesadas de las IgGs y otra de 25 kDa correspondiente a las cadenas ligeras (calle 3). Las siguientes calles de la figura (calles 4, 5 y 6) corresponden a las sucesivas etapas del proceso de lisis y de extracción de complejos al que se someten las mitocondrias durante la co-inmunoprecipitación. En todas ellas se identifica la señal correspondiente a Tim22p. Resulta interesante comprobar cómo a igualdad de carga proteica por calle, la intensidad en la señal de sobrenadante que se descarta, es menor que la del lisado de partida, lo que parece indicar que al menos una parte de la proteína Tim22p co-inmunoprecipita, con su anticuerpo.

Las tres señales de 22, 25 y 50 kDa presentes en la calle 7, cabe inferir que corresponden al componente Tim22p de la translocasa y a las respectivas cadenas ligera y pesada, del propio anticuerpo utilizado en la co-inmunoprecipitación. La ausencia de bandas en el último control recogido en la calle 8, demuestra la especificidad de la reacción de co-inmunoprecipitación. En definitiva, este experimento demuestra que el anticuerpo utilizado en la co-inmunoprecipitación es capaz de interactuar de forma específica con Tim22p.

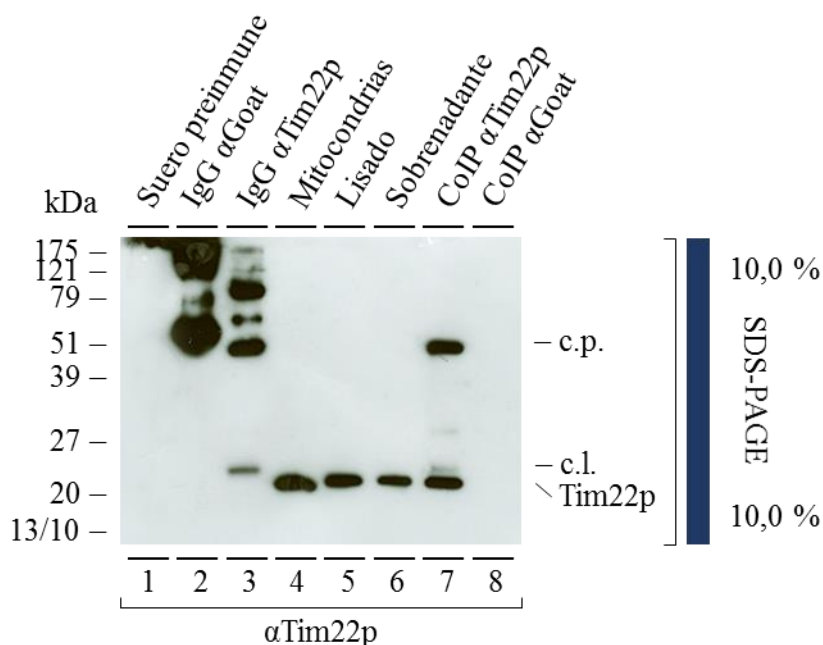


Figura 25. Co-inmuprecipitación de la proteína Tim22p con el anticuerpo α Tim22p

100 µg de mitocondrias de la estirpe control (CDD38) se han lisado empleando una concentración del 0,5% de digitonina. Este lisado se ha enfrentado al anticuerpo α Tim22p previamente inmovilizado en soporte inerte, Dynabeads (casa comercial Invitrogen), siguiendo el procedimiento de co-inmunoprecipitación tal y como se describe el en apartado 3.2.11. Las proteínas se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en un gel de poliacrilamida al 10%. La inmunodetección de Tim22p se ha realizado con el anticuerpo específico frente a esta proteína a una concentración de 1:5000, incubando la membrana durante toda la noche a 4 °C. Como anticuerpo secundario se ha utilizado antisuero α Goat en concentración 1:3000 e incubando la membrana durante una hora y media a temperatura ambiente. Las cantidades de proteína que se han utilizado en el experimento son: suero preinmune y ambos IgG 1 µg (calle 1 – 3); mitocondrias, lisado y sobrenadante 0,5 µg (calle 4 – 6); y finalmente las dos últimas calles que corresponden a los dos productos de inmunoprecipitación, en los que se ha cargado todo el producto de co-inmunoprecipitación. Las siglas c.p. y c.l se corresponden con la cadena pesada y ligera del anticuerpo respectivamente.

La siguiente pregunta es conocer si en estas mismas condiciones, y junto a Tim22p, se encuentran también los otros dos componentes de la translocasa TIM22. Para ello basta con reproducir el experimento anterior, con la única diferencia de que los anticuerpos utilizados en los revelados de los Westerns sean α Tim54p y α Tim18p, respectivamente.

En las calles 7.A y 7.B de la figura 26 se pone de manifiesto que en mis condiciones de estudio tanto Tim54p como Tim18p, coinmunoprecipitan con Tim22p, en mitocondrias de la estirpe control. Por otro lado, en las calles 4 – 6 se comprueba la naturaleza policlonal de estos dos anticuerpos, no disponibles comercialmente, que tiene su reflejo en la aparición de varias bandas, además de las señales esperadas a la altura de 54 (Figura 26. A.) o de 18 kDa (Figura 26. B.) respectivamente. Estas señales adicionales, corresponden a posibles uniones inespecíficas de ambos anticuerpos con otras proteínas presentes en la muestra. No obstante, es significativo comprobar cómo estas bandas inespecíficas desaparecen en la muestra resultado de la co-inmunoprecipitación (calles 7.A y 7.B), confirmando así la selectividad del proceso.

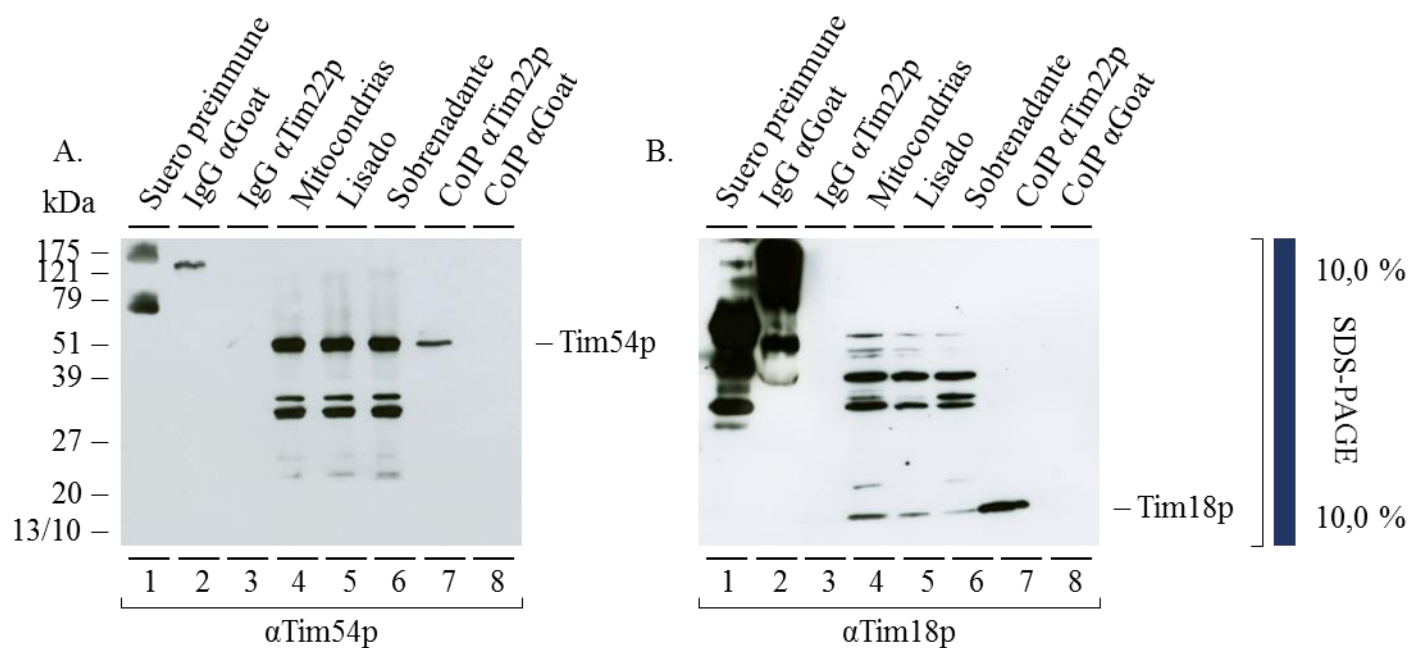


Figura 26. Co-inmuprecipitación de las proteínas Tim54p y Tim18p con α Tim22p

A. 150 μ g de mitocondrias de la estirpe control (CDD38) se han lisado empleando una concentración del 0,5% de digitonina, siguiendo a continuación con el procedimiento de co-inmuprecipitación descrito en el apartado 3.2.11. Las proteínas se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en un gel de poliacrilamida de concentración del 10%. La inmunodetección de Tim18p se ha realizado con el anticuerpo diseñado frente a esta proteína a una concentración de 1:3000, incubando la membrana con el mismo durante toda la noche a 4 °C. Por su parte, se ha usado como secundario el anticuerpo α Rabbit en concentración 1:5000, e incubando la membrana con este durante una hora y media a temperatura ambiente.

B. La inmunodetección de la proteína Tim54p se ha llevado a cabo con el anticuerpo específico frente a esta proteína a una concentración de 1:3000, usando como secundario el anticuerpo α Rabbit en concentración 1:5000. Los tiempos y las condiciones de incubación con estos anticuerpos han sido las mismas que las que se han utilizado para el anticuerpo α Tim18p. Las cantidades de proteína que se han utilizado en el experimento son: suero preimmune y ambos IgG 1 μ g (calles 1 – 3); mitocondrias, lisado y sobrenadante 0,5 μ g (calles 4 – 6); y las calles 7 y 8 correspondientes a las dos inmuprecipitaciones, en las que se ha cargado todo el producto de co-inmuprecipitación.

En la figura 26. A. y B. también se aprecia cómo en estos casos, a diferencia de los inmublots revelados con α Tim22p (Figura 25), las bandas características de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos, no se llegan a detectar (calles 2 y 7).

Una vez comprobado que las condiciones de aislamiento y extracción de TIM22 que se han utilizado, mantienen la integridad estructural del núcleo central de esta translocasa, se ha considerado oportuno comprobar la especificidad de las técnicas y protocolos empleados para ello. Así, los resultados de las co-inmunoprecipitaciones anteriores se han revelado también con α Tim23p.

Este análisis se muestra en la figura 27. Las tres primeras calles correspondientes a diferentes controles para la co-inmunoprecipitación, presentan un patrón muy parecido al del inmunoblot revelado con α Tim22p (Figura 25). En consecuencia, no se ha detectado señal alguna en el suero preinmune; el anticuerpo α Goat da las bandas características de este anticuerpo a masa molecular superior a 50 kDa. Asimismo, en la calle 3 en la que directamente se ha cargado anticuerpo α Tim22p, se observan las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, así como otras de masa molecular superior a 50 kDa, similares a las que también se detectan en los inmunoblots revelados con α Tim22p (Calle 3; Figura 25). En las calles que contienen mitocondrias, lisado tras el tratamiento con detergente y el sobrenadante eliminado después de la co-inmunoprecipitación, solo se detecta la señal correspondiente a la proteína Tim23p. Además, tampoco se aprecia ninguna diferencia entre la intensidad de las señales de estas dos últimas muestras, lo cual es indicativo de que Tim23p no parece haberse arrastrado junto con Tim22p.

Por su parte, las calles 7 y 8 correspondientes a los resultados de las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p y α Goat respectivamente, ponen de manifiesto que la proteína Tim23p no está presente en estos casos y que en consecuencia, ninguno de los dos antisueros es capaz de arrastrarla durante el proceso. En la calle 7 se detectan además las bandas características de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo que también se aprecian en la calle 3. Estos resultados ponen de manifiesto que la Tim23p no co-inmunoprecipita junto a los componentes de la translocasa TIM22.

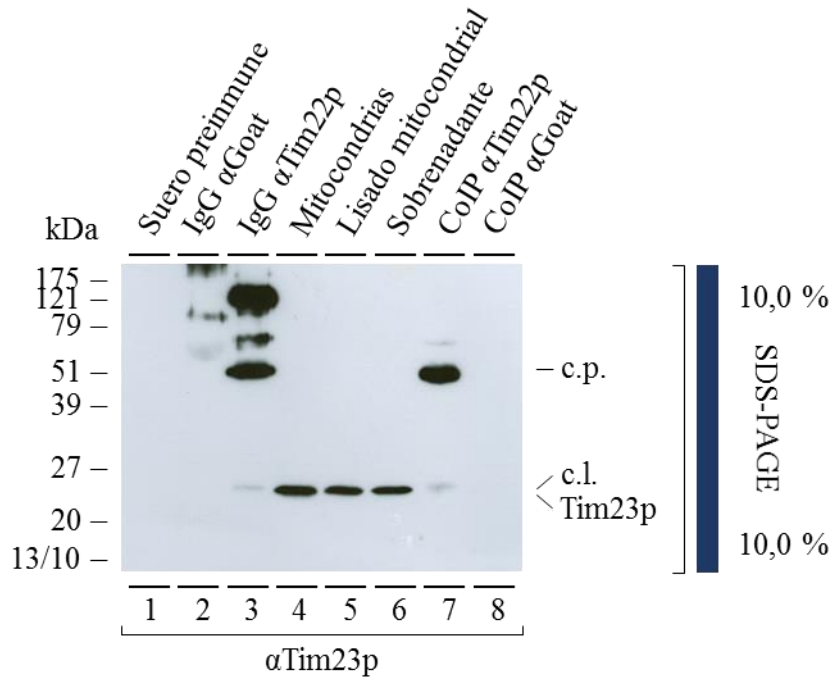


Figura 27. Co-inmuprecipitación de la proteína Tim23 con el anticuerpo α Tim22p

75 μ g de mitocondrias de la estirpe control lisadas con una concentración del 0,5% de digitonina. Se han co-inmunoprecipitado con el anticuerpo α Tim22p. Las proteínas se han separado mediante electroforesis desnaturizante, en un gel de poliacrilamida de concentración del 10%. La inmunodetección con α Tim23p se ha realizado durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario a una concentración de 1:5000, como secundario se ha incubado la membrana con α Goat en concentración 1:3000, durante una hora y media a temperatura ambiente. Las cantidades totales de proteínas cargadas son idénticas a las empleadas previamente en los tres experimentos anteriores de co-inmunoprecipitación.

Una vez se ha comprobado que las tres proteínas integrales de la translocasa TIM22 se encuentran presentes en el complejo nativo, se ha querido estudiar el efecto que tiene la eliminación de alguno de los componentes de esta translocasa, en su estructura nativa y en la de TIM23. Así, se ha realizado la electroforesis en condiciones no desnaturizantes de lisados de las mitocondrias aisladas de las 8 líneas celulares, portadoras de mutaciones en una de estas dos translocasas.

Con la finalidad de que los resultados de las electroforesis BN-PAGE puedan ser comparables entre las diferentes líneas celulares, como control de carga se ha tomado la cantidad de VDAC1 presente en cada uno de los extractos mitocondriales. Para ello, previamente los extractos se han sometido a electroforesis SDS-PAGE seguida de

inmunodetección con α VDAC1. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas ha permitido determinar en cada caso la cantidad de proteína total a cargar para cada una de las estirpes mutantes (Figura 28.B).

En la figura 28 se ha analizado el efecto de la eliminación de las proteínas Tim18p, Tim22p, Tim54p y Tim23p sobre la estructura nativa de la translocasa TIM22. Se ha observado cómo la integridad de este complejo, definida por una banda que se corresponde con una masa molecular aproximado de 300 kDa (Kerscher, Holder et al. 1997, Koehler, Jarosch et al. 1998, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000), se mantiene en las calles 1, 3, 5 y 8, procedentes de estirpes en las que, de acuerdo con lo representado en la figura 16, los tres componentes integrales de TIM22 se encuentran presentes simultáneamente (Figura 16, calles 1, 3, 5 y 8). Por el contrario, cualquier disminución significativa en cualquiera de las tres proteínas integrales de la translocasa, impide la correcta biogénesis de TIM22.

Los datos bibliográficos describen la estructura nativa de la translocasa TIM22 como una única banda presente en una región cercana a los 300 kDa; producto a su vez del ensamblaje de sus tres proteínas integrales de membrana Tim22p, Tim18p y Tim54p (Kerscher, Holder et al. 1997, Koehler, Jarosch et al. 1998, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000).

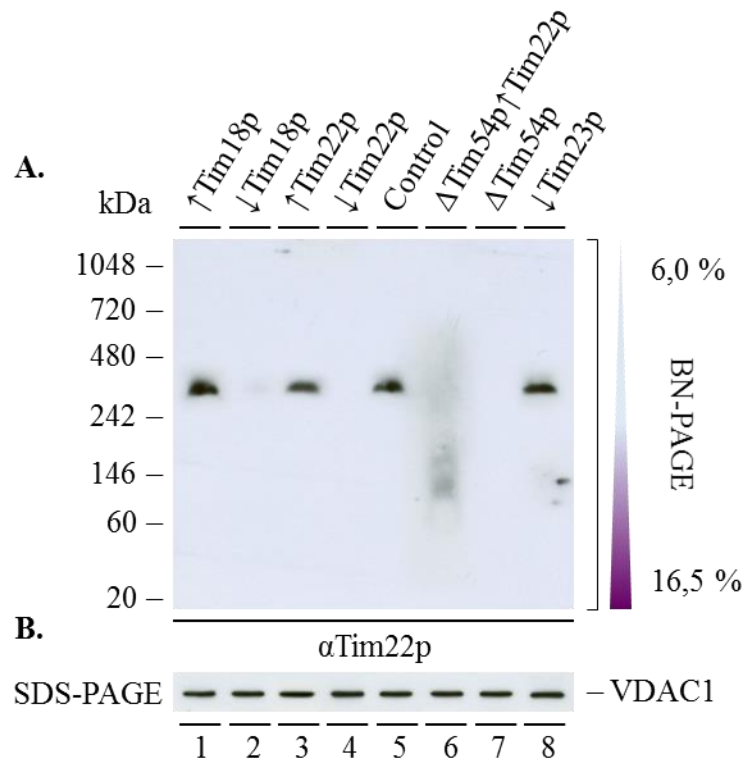


Figura 28. Efecto de las alteraciones en el nivel de expresión de los componentes de la translocasa TIM22 sobre la biogénesis del complejo

A. Extractos mitocondriales (75 µg) de las estirpes mutantes en los componentes de la translocasa TIM22 y en la proteína Tim23p, se han sometido a electroforesis BN-PAGE en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad total de proteínas que se ha cargado por pocillo oscila entre 3 y 15 µg, en función del nivel de expresión de VDAC1, previamente determinado mediante electroforesis SDS-PAGE. La inmunodetección se ha realizado con el anticuerpo específico frente a Tim22p. **B.** Los mismos extractos se han sometido a electroforesis SDS-PAGE, añadiendo en cada pocillo la misma cantidad de proteína que para la BN-PAGE (entre 3 y 15 µg). La inmunodetección se ha llevado a cabo con α VDAC1.

Se ha de reseñar que la sobre expresión de la proteína Tim22p (ver figura 16, calle 6), inherente a las células de la cepa Δ Tim54 \uparrow Tim22, las cuales a su vez carecen de Tim54p, no conlleva un incremento en la señal de esta banda, sino que por el contrario esta se difumina y arrastra hasta dar lugar a un intermediario de aproximadamente 100 kDa.

También resulta significativo que la eliminación de Tim23p, componente nuclear de la translocasa TIM23, no modifica la biogénesis de TIM22 (calle 8).

Finalmente, en la figura 28. B. se comprueba que la intensidad de la señal correspondiente a VDAC1 en todas las muestras, es materialmente idéntica, lo que permite garantizar que los resultados obtenidos puedan ser comparables entre sí.

4.2.Efecto de las mutaciones en TIM22 sobre la estructura de translocasas y porina mitocondriales

En el apartado 4.1. se ha comprobado que en algunas de las líneas celulares mutantes, la eliminación de alguno de los componentes de TIM22, comporta la modificación del nivel de expresión de una o más proteínas de la propia translocasa, pero también de TIM23, su análoga en la membrana interna (Figura 16 y 19). La pregunta que surge entonces es: cómo esta circunstancia puede afectar a la estructura nativa de las translocasas TIM23 de membrana interna, así como a otros componentes de la membrana externa mitocondrial como la translocasa TOM o a la proteína más abundante de esta membrana, VDAC1.

Una vez constatada la presencia simultánea de las 3 proteínas integrales del complejo TIM22 y corroborado que el principal componente de la translocasa TIM23 no forma parte de este núcleo, se ha extendido este estudio a la translocasa TIM23.

Como ya se ha apuntado, TIM23 está integrada por tres proteínas de membrana: Tim17, Tim23 y Tim50. Además de ellas este complejo consta de un motor asociado (PAM), entre cuyos componentes se encuentra Tim44p.

La co-inmunoprecipitación al igual que en los experimentos anteriores, se ha realizado con mitocondrias de la estirpe control, disgregadas en tampón de lisis con un 0,5% de digitonina. Este lisado se ha enfrentado al anticuerpo α Tim23p, inmovilizado previamente en un soporte inerte. Tras la incubación, posterior elución de las proteínas unidas y separación de las mismas mediante electroforesis desnaturizante, se ha comprobado cuáles de los componentes esenciales de TIM23 co-inmunoprecipitan junto a Tim23p.

Al mismo tiempo se han llevado a cabo una serie de controles, como las señales debidas al anticuerpo α Tim23p y las mitocondrias intactas de la estirpe control utilizada en la co-inmunoprecipitación, junto con el propio inmunoprecipitado con el anticuerpo frente a Tim23p.

En la figura 29 se muestra el resultado de la co-inmunoprecipitación del complejo TIM23. Este análisis se ha llevado a cabo para los componentes de membrana de TIM23 (Figura 29. A. B. y C.) y Tim44p (Figura 29. D.) componente del motor de la translocasa. Se ha observado cómo la integridad de este complejo, definido por las proteínas integrales de membrana: Tim23p, Tim17p y Tim50p, se mantiene en mis condiciones de co-inmunoprecipitación (calles 3.A., 3.B. y 3.C.). Asimismo, en la calle 3.D de la figura se pone de manifiesto que Tim44p se encuentran también interaccionando con Tim23p, en las mitocondrias de la estirpe control.

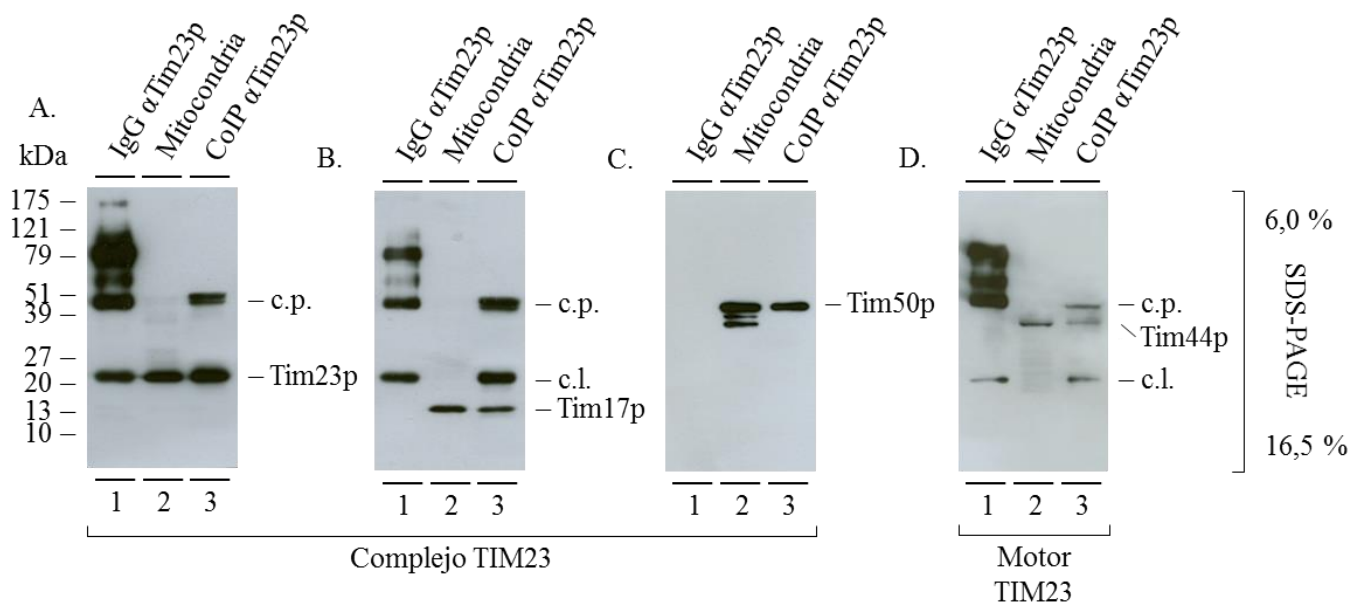


Figura 29. Co-inmuprecipitación de los componentes de la translocasa TIM23 con el anticuerpo α Tim23p

Lisados de mitocondrias (75 μ g) de la estirpe control, con 0,5% de digitonina, se han sometido a co-inmuprecipitación con el anticuerpo inmovilizado α Tim23p. Las proteínas se han separado mediante SDS-PAGE, en gradiente del 6 al 20%. La inmunodetección de Tim23p, Tim17p y Tim44p se ha realizado mediante incubación durante 12 horas a 4°C con una dilución 1:5000 del anticuerpo específico frente a cada una de estas proteínas. Como secundario se ha utilizado el antisuero α Goat en concentración 1:3000, durante hora y media a temperatura ambiente. La detección de Tim50p se ha realizado con el anticuerpo policlonal correspondiente, a concentración 1:8000, usando como secundario suero α Rabbit diluido 1:5000. Las condiciones y tiempos de incubación son los mismos que se han utilizado previamente para estos mismos anticuerpos.

Estos resultados permiten confirmar que las dos translocasas de membrana interna mitocondrial, TIM22 y TIM23, son entidades independientes y que su independencia e integridad se mantienen en mis condiciones de estudio. Condiciones que son lo suficientemente suaves para que también se mantenga la interacción de los componentes integrales de TIM23 con otros que se unen transitoriamente a ella, como es el caso de Tim44p, componente del motor de esta translocasa (Josyula, Jin et al. 2006).

Por su parte, el estudio de la estabilidad estructural de la translocasa TIM23 por el efecto de la eliminación de estos mismos componentes (Tim22p, Tim18p y Tim54p)

se ha realizado de forma análoga. Así, cantidades de muestra idénticas a las utilizadas en los experimentos anteriores, se han sometido también a electroforesis BN-PAGE, seguidas del inmunoblotting, en este caso con el anticuerpo α Tim23p.

En la figura 30 se observa cómo la integridad de TIM23, definida por una serie de complejos con masas moleculares comprendidos entre los 100 y 300 kDa, indicativos de las sucesivas etapas de la biogénesis de la translocasa, no se ve afectada por la eliminación de las proteínas Tim18p o Tim54p (calles 1, 2, 6 y 7). A diferencia de lo que sí se ha observado para la translocasa TIM22 (Figura 28). No obstante, las estirpes \uparrow Tim22p y \downarrow Tim22p, que de forma constitutiva han experimentado una reducción significativa de la proteína Tim17p inherente a estas estirpes (ver figura 19), del orden del 70 y 90% respectivamente, experimenta una reducción de la intensidad de las señales correspondientes a la translocasa TIM23, lo que sugiere una dependencia de este complejo con el nivel de expresión de las proteínas integrantes del mismo e independiente a TIM22. En concordancia, en el resto de estirpes estudiadas, el nivel de expresión de las proteínas Tim17p, Tim23p y Tim50p es comparable (ver figura 19); de ahí que la variación en la intensidad de la señal de TIM23 sea menos acusada.

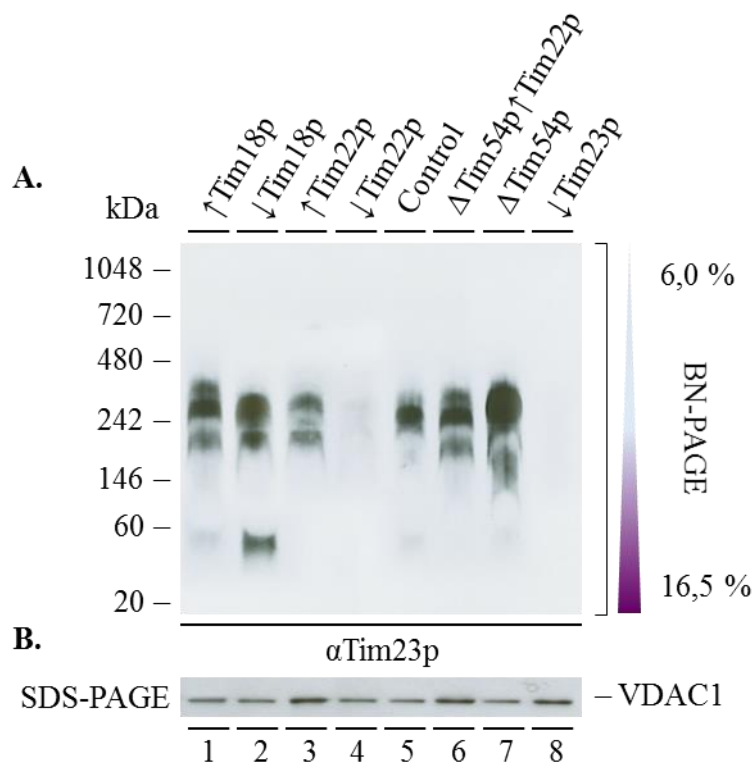


Figura 30. Efecto de las alteraciones en la expresión de los componentes de TIM22 sobre la biogénesis de TIM23

A. Mitocondrias de las estirpes mutantes en los componentes de TIM22 (calles 1-7) y en Tim23p (calle 8), se han lisado con 0,5% de digitonina y sometido a electroforesis BN-PAGE en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad total de proteína cargada oscila entre 3 y 15 μ g, en función del nivel de VDAC1 utilizado como control de carga. La inmunodetección se ha realizado con α Tim23p en una dilución de 1:5000, empleando su antisuero secundario α Goat en concentración 1:3000. **B.** Para determinar la carga de cada pocillo, previamente los lisados mitocondriales se han sometido a SDS-PAGE, con idéntica cantidad de proteína por calle (no mostrado) y a la vista de los resultados se han ajustado las cantidades de cada muestra, de manera que todas ellas contengan la misma cantidad de VDAC1.

Una vez establecida la existencia de una correlación entre la presencia de las 3 proteínas integrales de la translocasa TIM22, la integridad estructural de este complejo, y descartado también que la alteración de estas proteínas tenga un efecto directo sobre la estabilidad de TIM23, se ha decidido estudiar el efecto que las mutaciones en los componentes del complejo TIM22 pudieran tener sobre la translocasa TOM de la membrana externa mitocondrial.

Hasta el momento se ha descrito que TOM conforma el canal en el que confluyen todas las rutas de transporte de proteínas mitocondriales. Una vez que una proteína en tránsito hacia la mitocondria rebasa la membrana externa mediante TOM, y siempre que esta membrana no constituya su destino final, las preproteínas optan por uno de los posibles itinerarios, al espacio intermembrana, la membrana interna o la matriz mitocondrial. Las translocasas TIM22 y TIM23 presentan un papel fundamental en la localización de proteínas en estas dos últimas ubicaciones. Esta íntima relación entre TOM y las translocasas de membrana interna hace plantearse la posibilidad de que las mutaciones que afectan a la estabilidad de uno de estos complejos, como es el caso de la translocasa TIM22, puedan afectar a su vez a TOM.

El complejo TOM, como se ha descrito en apartados anteriores, se encuentra integrado por una pluralidad de proteínas, entre las cuales el canal Tom40p y los receptores Tom20p, Tom22p y Tom70p, forman un complejo con una masa molecular aproximada de 400 kDa (Dekker, Ryan et al. 1998, Hill, Model et al. 1998, Künkele, Juin et al. 1998, Ahting, Thun et al. 1999, van Wilpe, Ryan et al. 1999, Vögtle, Schmidt et al. 2010). El efecto que sobre este complejo tiene la presencia o ausencia de cada una de las proteínas integrantes del complejo TIM22 se ha estudiado por inmunoblotting revelado con α Tom40p. Al igual que todas las aproximaciones anteriores, el análisis de la estabilidad del complejo TOM se ha llevado a cabo utilizando como control de carga la cantidad total de VDAC1 presente en los lisados mitocondriales. Esto permite que los resultados entre las distintas estirpes puedan ser comparables.

La figura 31 muestra el efecto producido sobre la translocasa TOM por la variación en el nivel de expresión de las proteínas Tim22p, Tim18p, Tim54p y Tim23p. Se observa cómo la integridad de TOM, definida por una banda en la región próxima a los 400 kDa, no se ve alterada por la expresión de las proteínas integrales de la translocasa TIM22, ni tampoco por el componente central de la translocasa TIM23.

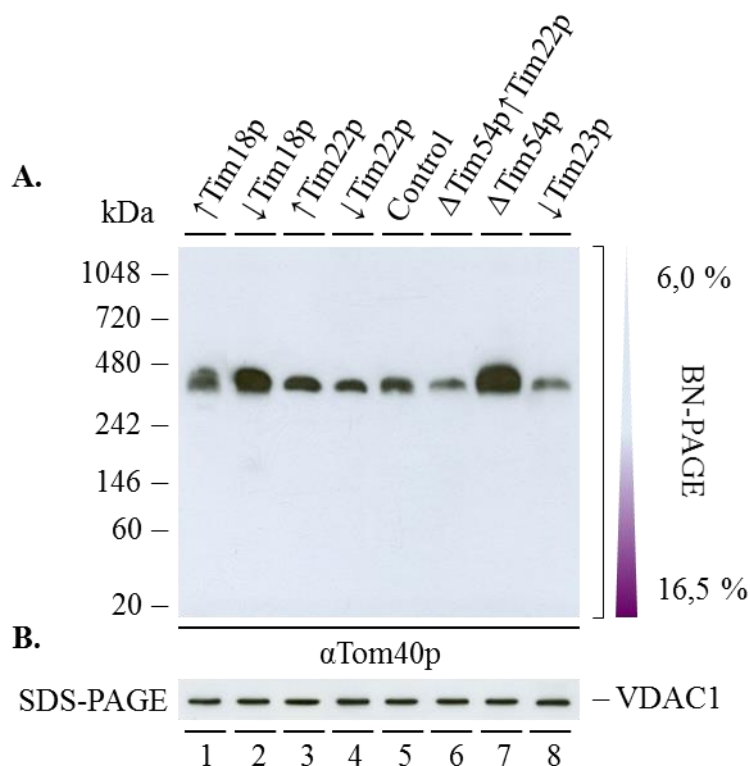


Figura 31. Efecto de las alteraciones en la expresión de los componentes de la translocasa TIM22 sobre la biogénesis de TOM

A. Las mitocondrias mutantes en los componentes de la translocasa TIM22 y en Tim23p, lisadas con un 0,5% de digitonina se han sometido a BN-PAGE en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad de proteínas cargada por pocillo varía en función del nivel de expresión de VDAC1, entre 3 y 15 μ g. **B.** Los extractos mitocondriales se han sometido conjuntamente a electroforesis SDS-PAGE, tomando la misma cantidad de proteína que en el experimento nativo. Y se ha inmunodetectado VDAC1.

Por su parte, VDAC es la proteína más abundante de la membrana externa mitocondrial. Forma un canal aniónico dependiente de voltaje de grandes dimensiones. Presenta una estructura similar a la de la proteína Tom40p, perteneciendo ambas al grupo de proteínas con estructura β -barril de 19 hebras (Zeth 2010). En la literatura se ha descrito que VDAC establece numerosas interacciones con otros muchos componentes mitocondriales, incluso de membrana interna (Allouche, Pertuiset et al. 2012, Huang, Hu et al. 2013), si bien, hasta la fecha no se ha descrito ninguna interacción entre VDAC y la translocasa TIM22, y esto es lo que se ha querido comprobar en este apartado.

Estructuralmente la porina mitocondrial o VDAC está formada por una única cadena polipeptídica de 27-30 kDa (Peng, Blachly-Dyson et al. 1992), que en SDS-PAGE se detecta como una única banda a una altura aproximada de 27 kDa. VDAC se expresa en múltiples isoformas, tanto en mamíferos (Blachly-Dyson, Zambronicz et al. 1993, Ha, Hajek et al. 1993, Sampson, Lovell et al. 1996) como en plantas (Heins, Mentzel et al. 1994, Elkeles, Devos et al. 1995). En *Saccharomyces cerevisiae* también se han identificado dos genes que codifican a VDAC (Blachly-Dyson, Song et al. 1997). La estructura nativa de VDAC1 se ha descrito como dos complejos diferentes, situados al nivel de los marcadores de masa molecular de 440 y 200 kDa. Asimismo, una observación más detallada, permite en ocasiones discernir una tercera señal, de menor intensidad y localización alrededor de 400 kDa (Krimmer, Rapaport et al. 2001).

Al igual que en los casos anteriores, la aproximación elegida para determinar si existe o no una interdependencia estructural entre la translocasa TIM22 y VDAC se ha basado en su comportamiento en las electroforesis no desnaturizantes BN-PAGE. También en este caso, y con el fin de evitar la posible variabilidad entre estirpes que el proceso de extracción de membranas con detergentes pudiera haber ocasionado, tras el tratamiento con digitonina y previo a la BN-PAGE, se ha tenido especial precaución en equiparar la cantidad de proteína a cargar en cada calle del gel. Para ello, tras la correspondiente extracción de las mitocondrias de cada estirpe con el detergente, los sobrenadantes resultantes se han separado primero mediante SDS-PAGE. El objetivo de este paso ha sido determinar la cantidad presente de VDAC1 en cada una de las muestras (Figura 32.B.), para de esta forma asegurar que en las BN-PAGEs todas las calles contienen la misma carga de esta proteína.

Los inmunoblottings de estas electroforesis, cuando se revelan con α VDAC1, han permitido identificar, en mis condiciones de ensayo, las tres bandas mencionadas, próximas a los marcadores de 440, 400 y 250 kDa respectivamente (ver calle 5, Figura 32). Estos resultados corroboran así los de otros autores y permiten afirmar que la utilización de concentraciones de detergente inferiores a las de otros estudios, mantienen no obstante la efectividad del proceso de extracción y el comportamiento de VDAC1 en las electroforesis en condiciones nativas.

El siguiente paso ha sido analizar si la eliminación de las proteínas de la translocasa TIM22: Tim18p, Tim22p, Tim54p, así como Tim23p, ocasiona alguna alteración en el comportamiento electroforético de VDAC1. En la figura 32 resulta muy significativo comprobar cómo el patrón electroforético de VDAC1 que se acaba de describir, solo se mantiene en los extractos procedentes de estirpes en los que los tres componentes integrales de TIM22 se encuentran presentes de manera simultánea (Figura 16, calles 1, 3, 5 y 8). Por el contrario, la disminución o eliminación de cualquiera de ellos se ve indefectiblemente asociada a la desaparición de todas las especies moleculares en las que de otra forma VDAC1 se encuentra presente.

Resulta aún más significativo que la eliminación de Tim23p, componente principal de la translocasa TIM23, no modifica el patrón de bandas de VDAC1 (calle 8).

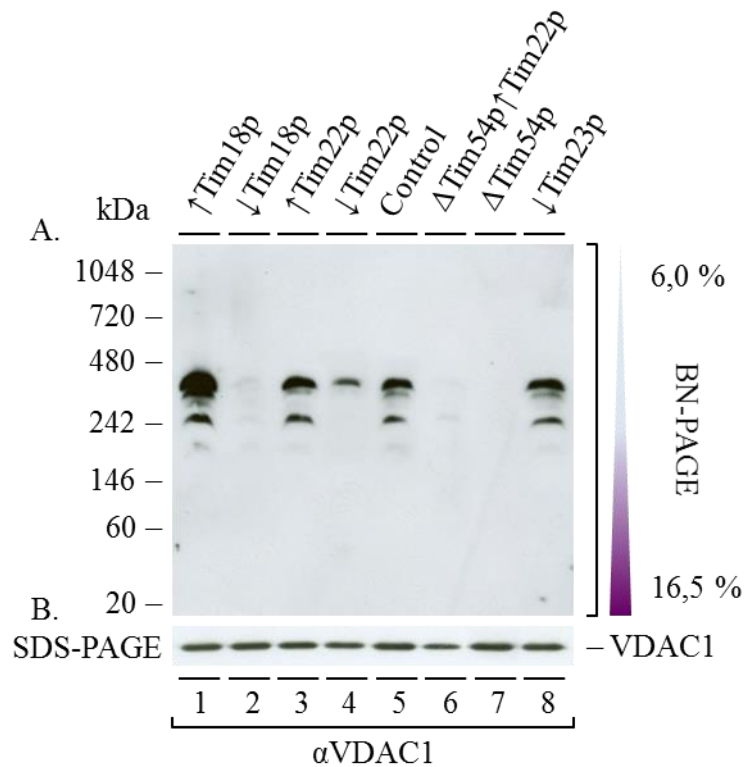


Figura 32. Efecto de las alteraciones en la expresión de los componentes de la translocasa TIM22 sobre la estructura supramolecular de VDAC1

A. Los extractos mitocondriales de las estirpes mutantes en los componentes de la translocasa TIM22 y en la proteína Tim23, obtenidos con un 0,5% de digitonina, se han sometido a electroforesis nativa en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad de proteína cargada se ha determinado en función del nivel de expresión de VDAC1 en las distintas estirpes celulares. **B.** SDS-PAGE de los lisados mitocondriales revelados con VDAC1, utilizados como control de carga en A. La inmunodetección de VDAC1 se ha realizado con el anticuerpo a una concentración 1:5000 y como anticuerpo secundario α Mouse en concentración 1:2500. Este experimento se ha realizado 6 veces obteniendo siempre el mismo resultado.

Finalmente, los datos recogidos en la figura 32. B. ponen de manifiesto que en condiciones desnaturalizantes, la intensidad de la señal correspondiente a VDAC1 en todas las muestras es prácticamente idéntica, lo que permite descartar que las diferencias en la intensidad de las señales observadas en las BN-PAGEs sean debidas a diferencias en la carga de esta proteína.

Tomados en conjunto, todos estos datos parecen desvelar la existencia de una correlación entre la biogénesis del complejo TIM22 y la porina mitocondrial, VDAC1.

4.3. Interacción molecular entre TIM22 y VDAC

Previamente, se ha descrito en numerosos trabajos que el empleo de concentraciones elevadas de detergentes (utilizados para la disgregación de las membranas celulares), puede producir la destrucción de complejos proteicos y/o la agregación de proteínas (Bisetto, Giorgio et al. 2007, Dienhart and Stuart 2008, Shukolyukov 2009). Estos efectos, en especial la agregación de proteínas podría ser la causa de aparentes asociaciones proteína-proteína, inexistentes en las membranas no tratadas.

Por ello, una vez establecida la correlación entre la biogénesis de TIM22 y VDAC1, lo primero que se ha querido comprobar es si la inesperada relación que he encontrado entre la biogénesis de la translocasa TIM22 y la presencia de la porina mitocondrial VDAC1, pudiera ser consecuencia de una interacción inespecífica entre ambas, ocasionada por la digitonina utilizada para la disgregación de las membranas mitocondriales.

4.3.1. Estudios de Colocalización

Para estudiar si es este el efecto que justifica la aparición de una señal de VDAC1 ligada a la de la translocasa TIM22, se ha examinado el efecto producido por la cantidad de detergente en la preparación de los extractos mitocondriales. Del mismo modo que lo que se describe en el apartado 4., las mitocondriales de la estirpe control (CDD38), se han tratado con cantidades crecientes de digitonina desde el 0,25% al 10%. Estos extractos se han analizado a continuación mediante electroforesis no desnaturante, teniendo especial cuidado a la hora de cargar en todas las calles la misma cantidad de total de proteína. En la figura 33. A. se pone de manifiesto el efecto que este tratamiento ejerce sobre los complejos en los que se desarrolla VDAC1 en este tipo de electroforesis.

Así, concentraciones de detergente, del 0,25% no llegan a resolver el patrón de bandas característico de VDAC1, ya que solo se consigue observar una señal muy tenue, a una altura próxima al marcador de 300 kDa. A partir de esta concentración, y hasta el 2,0% sí se detectan las 3 bandas típicas de esta proteína, a las alturas de 400, 350 y 250 kDa (Krimmer, Rapaport et al. 2001), aproximadamente. Por otra parte, el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones de digitonina superiores al 2%, da como resultado una progresiva disminución en las intensidades de las señales obtenidas, que afecta sobre todo a la señal de menor masa molecular, pero que a concentraciones elevadas, llega a alcanzar a todas las demás señales. Finalmente, a concentraciones del 1 y 2% de digitonina, exposiciones prolongadas permiten revelar una cuarta banda por debajo de las anteriormente citadas. Al igual que en casos anteriores (ver Figuras 23.A. y 24), aquí también hay que notar la progresiva ralentización de la migración de las señales de VDAC1 con el aumento de la concentración de digitonina, paralela al arrastre que deja el Coomassie G-250 del buffer del cátodo y que puede ser indicativo de la interferencia entre ambos reactivos.

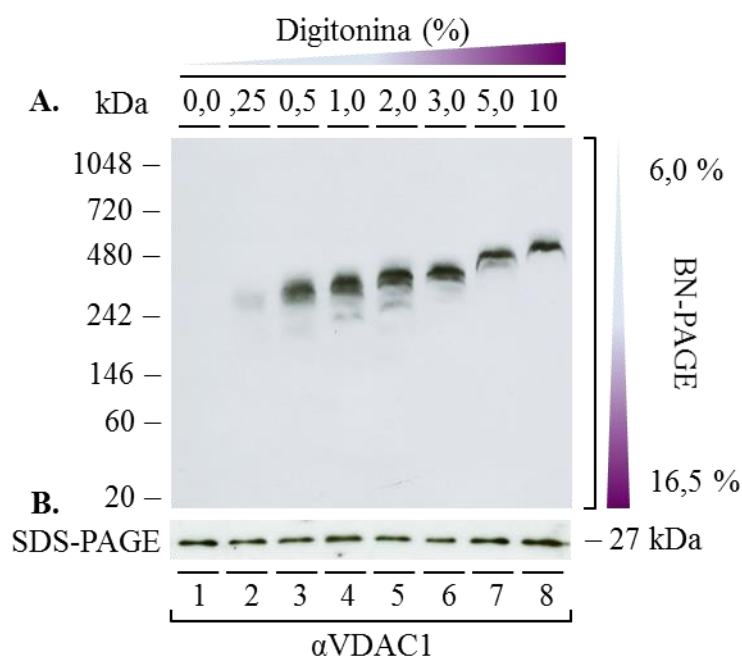


Figura 33. Efecto de la digitonina sobre las formas supramoleculares de VDAC1

Mitocondrias de la estirpe control (CDD38) se han lisado empleando cantidades de digitonina comprendidas entre el 0 y 10% de detergente y se han separado mediante electroforesis BN-PAGE en gradiente del 4 al 16,5%. Para cada muestra se ha cargado 5 μ g de proteína total. **A.** La inmunodetección se ha realizado con el anticuerpo frente a VDAC1 a una concentración de 1:10000, usando como secundario el anticuerpo α Mouse en concentración 1:2500. **B.** Las muestras utilizadas en el experimento de BN-PAGE se han resuspendido en tampón Laemmli y sometido a SDS-PAGE, para posteriormente inmunodetectar VDAC1.

Paralelamente las muestras se han sometido también a SDS-PAGE. Los resultados de la Figura 33.B. permiten descartar que la disminución de las señales detectadas a concentraciones inferiores al 0,5% y superiores al 2,0% sea consecuencia de una menor cantidad de proteína cargada (figura 34. B.).

En cualquier caso, la figura 33. A. permite sugerir que independientemente de la concentración de digitonina utilizada, el comportamiento de VDAC1 transcurre de forma paralela al de TIM22, recogido en la figura 23. No obstante y para confirmarlo, se ha comprobado si existe una superposición entre ambas imágenes.

Para ello un mismo gel se ha sometido consecutivamente a inmunoblotting con los anticuerpos α VDAC1 primero y α Tim22p después, de manera que los resultados

puedan ser completamente comparables. Con ayuda del software informático Adobe Photoshop CS5, se han coloreado de forma diferente cada una de las imágenes. El complejo TIM22 se ha marcado en tonos rojizos, mientras que las formas moleculares de VDAC1 se han coloreado en azul.

La figura 34 muestra el resultado de la superposición de ambas imágenes. En ella se pone de manifiesto la colocalización de la banda de VDAC1 descrita a aproximadamente 350 kDa junto a la señal de la translocasa TIM22. Esta colocalización se mantiene hasta una concentración del 2% de digitonina. Por el contrario, el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones superiores al 2% da como resultado una progresiva separación y reducción en la intensidad de las señales de ambas proteínas.

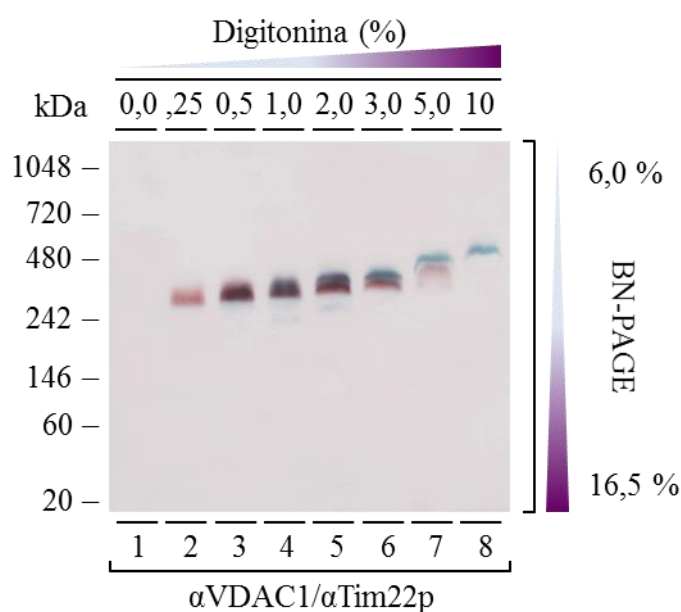


Figura 34. Efecto de la digitonina sobre la colocalización de las estructuras supramoleculares de TIM22 y VDAC1

Las inmunodetecciones realizadas de las electroforesis BN-PAGE con los anticuerpos α Tim22p (representada en color rojo) y α VDAC1 (representada en color azul) en el mismo gel de electroforesis, de extracciones mitocondriales con cantidades crecientes de digitonina, se han superpuesto con ayuda del software informático Adobe Photoshop CS5. La inmunodetección se ha realizado inicialmente con α Tim22p y tras un tratamiento de stripping se ha inmunodetectado α VDAC1. Este experimento se ha realizado en 4 ocasiones, obteniéndose idéntico resultado en todos ellos.

Estos resultados, aunque por si solos no son concluyentes, apuntan a que la colocalización de las señales de TIM22 con VDAC1 no es producto de la posible agregación proteica a veces inherente al empleo de detergentes

4.3.2. Estudios de electroforesis bidimensional e inmunodetección

A la vista de los resultados precedentes se hace necesario profundizar en la naturaleza de lo que pudiera ser una correlación estructural o interacción molecular entre la translocasa TIM22 y VDAC. Para ello se han seguido dos estrategias diferentes. La primera consiste en la electroforesis bidimensional de extractos mitocondriales de la estirpe control (CDD38) seguida de la inmunodetección de las señales obtenidas que permitan identificar todas las proteínas o asociaciones proteicas en las que tanto Tim22p como VDAC1 se encuentran presentes. La segunda aproximación ha consistido en analizar la composición de los complejos que co-inmunoprecipitan unidos al anticuerpo α Tim22p.

Una vez se demostrado que las condiciones de aislamiento y extracción de TIM22 utilizadas experimentalmente mantienen la integridad estructural del núcleo central de esta translocasa, así como la necesidad de la presencia simultánea de los tres componentes integrales de la misma para mantener la estabilidad del complejo TIM22 en condiciones nativas, y descrita la existencia de una correlación entre la biogénesis de TIM22 y VDAC1, se ha estudiado la posibilidad de que este paralelismo entre la biogénesis de ambas estructuras moleculares este asociado con una interacción directa entre ambas.

Para ello se ha llevado a cabo la electroforesis bidimensional (Apartado 2.10.3.). Se han utilizado mitocondrias aisladas de la cepa control, disgregadas en tampón de lisis con digitonina al 0,5%. Tras el tratamiento con detergente y previo a las electroforesis nativas, de forma rutinaria se vuelve a determinar la cantidad de proteínas, para asegurarse de que todas las calles se cargan de manera uniforme con 10 μ g de proteína. Una vez producida la separación de los complejos proteicos se someten a una segunda dimensión o separación, esta vez en condiciones desnaturalizantes. Los resultados de esta nueva disgregación molecular se analizan mediante inmunoblotting con anticuerpos frente a

Tim22p y a VDAC1 de forma correlativa. En la Figura 35. A. el inmunoblotting con el anticuerpo α Tim22p resuelve una única banda, cercana a los 300 kDa, en condiciones nativas; indicativa de la presencia del complejo TIM22. No obstante, la forma oblonga de la banda sugiere la presencia de más de una forma molecular de complejos en los que Tim22p es un componente integrante.

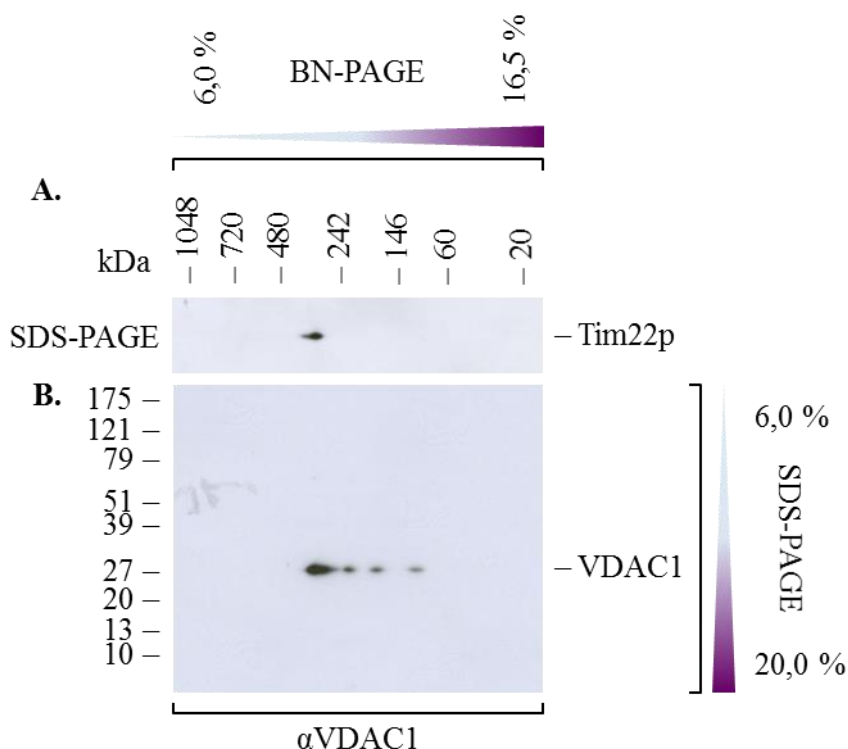


Figura 35. Electroforesis bidimensional de las estructuras supramoleculares de VDAC1 y Tim22p

Mitocondrias de la estirpe control CDD38, se han lisado con un 0,5% de digitonina y sometido a electroforesis bidimensional BN-PAGE/SDS-PAGE. 10 μ g de proteínas se han sometido a una primera dimensión en BN-PAGE en gradiente del 6 al 16,5%. Las estructuras nativas resultantes se han separado en una segunda dimensión en SDS-PAGE en gradiente del 6 al 20%. **A.** Inmunodetección con α Tim22p a una concentración de 1:10000, usando como secundario el anticuerpo α Goat en concentración 1:3000. **B.** Inmunodetección con el anticuerpo monoclonal α VDAC1 a una concentración de 1:5000, usando como secundario el anticuerpo α Mouse en concentración 1:2500. Los marcadores de masa molecular de la parte superior indican la dirección de separación de los complejos en BN-PAGE; mientras que los marcadores de la izquierda corresponden a las masas moleculares de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE.

Por su parte, la inmunodetección que se ha realizado con el anticuerpo VDAC1 se distribuye en varias bandas con masas moleculares comprendidos entre 400 y 120 kDa.

En particular en la figura 35. B. se pueden llegar a distinguir entre cuatro y cinco complejos en los que la proteína VDAC1 se encuentra presente. De ellos los dos de menor masa molecular se sitúan en 200 y 120 kDa respectivamente, el tercero lo hace a 240 kDa, mientras que en la zona entre 300 y 400 kDa también se detecta una señal asimétrica; siendo estos 3 últimos complejos los descritos en la bibliografía para VDAC1 en estado nativo (Krimmer, Rapaport et al. 2001).

El análisis mediante densitometría de barrido y consiguiente superposición de las señales obtenidas con cada anticuerpo permite resolver un perfil de densidades y colocalizar las diferentes proteínas en su estado nativo.

En la figura 36 se ha observado cómo para la densitometría de barrido de VDAC1 (representada en color gris), en la franja de masas moleculares comprendidos entre 400 y 300 kDa, las dos bandas de elevada masa molecular que previamente se han identificado (hacer referencia a la figura donde mejor se vean), aunque no llegan a separarse totalmente en la doble dimensión, sí dan lugar a un pico claramente asimétrico con un hombro en su tramo derecho. Las señales de las otras tres formas moleculares de menor masa molecular se resuelven en picos individuales y simétricos. Por su parte, en el perfil densitométrico correspondiente a Tim22p (representado en color negro) se ha detectado un solo pico, también asimétrico, que en cualquier caso se solapa con la señal de VDAC1 encontrada en la franja entre 400 y 300 kDa. La asimetría de estos picos es no obstante opuesta en intensidad entre VDAC1 y α Tim22p, ya que mientras la señal del primero presenta un hombro en el tramo derecho del pico, la asimetría de la señal de Tim22p se sitúa en el tramo izquierdo del mismo.

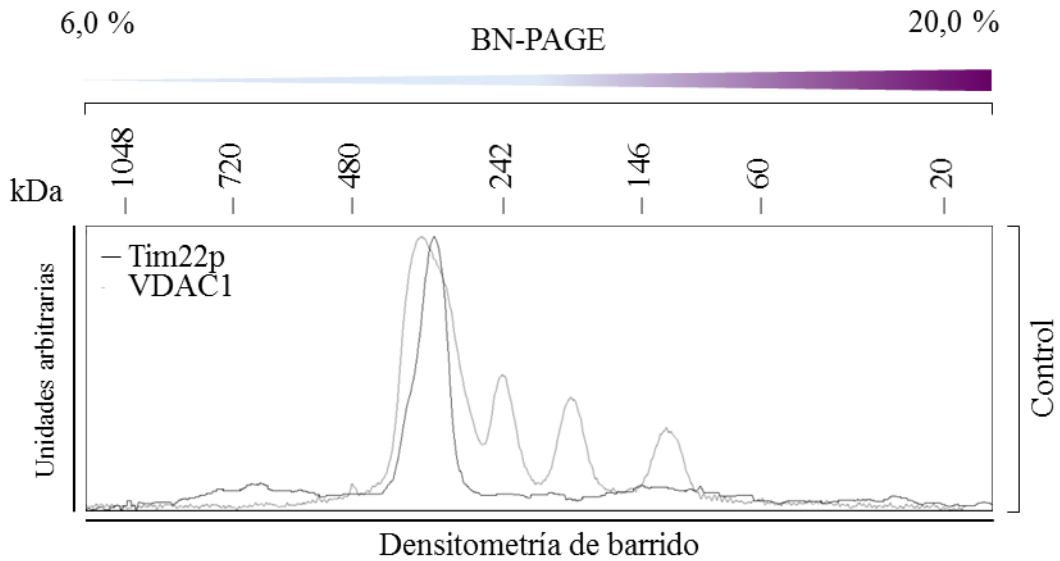


Figura 36. Diagrama de barrido y superposición de las señales de VDAC1 y Tim22p

Tras la electroforesis bidimensional las señales de VDAC1 y Tim22p se han sometido a análisis de densitometría de barrido con ayuda del software informático ImageJ 1.33u. La densitometría de barrido se ha realizado tomando la totalidad del gel, de tal forma que ambas densitometría sean comparables entre sí. Seguidamente ambos perfiles se han superpuesto con el editor de imagen Adobe Photoshop CS5. Las estructuras en las que Tim22p se encuentra presente se han representado en color negro, mientras que las que corresponden a VDAC1 se han representado en gris.

Estos resultados permiten constatar la existencia de una colocalización entre VDAC1 y Tim22p en estado nativo. Por otra parte la asimetría opuesta en el perfil de ambas señales indica que cada uno de ellos contiene dos especies moleculares pero con diferente preponderancia. De tal modo que la forma prevalente de VDAC coincide con la menos abundante de Tim22p y viceversa.

4.3.3. Estudios de Co-inmunoprecipitación

Para poder discernir entre proteínas que simplemente migran a la misma altura de las que además pudieran estar interaccionando directamente, este mismo extracto mitocondrial se ha sometido a una segunda aproximación, consistente en la co-inmunoprecipitación del complejo TIM22 a través del anticuerpo α Tim22p y la posterior detección de VDAC1 en el mismo.

Al igual que en las co-inmunoprecipitaciones llevadas a cabo en apartados anteriores se han realizado también una serie de controles, analizándose las bandas procedentes de: el suero preinmune del animal en el que se ha obtenido el anticuerpo, el propio anticuerpo α Tim22p, y α Goat, además de las muestras correspondientes a las diferentes etapas del proceso de lisis y extracción de complejos y de una co-inmunoprecipitación control realizada con α Goat.

En la figura 37 se muestra el resultado de la inmunodetección revelada con α VDAC1 de estos experimentos. En ella se pone de manifiesto que α VDAC1 no interacciona con el suero preinmune del animal en el que se ha obtenido el anticuerpo α Tim22p (calle 1), con el que se ha de realizarse la co-inmunoprecipitación. Por su parte, las IgG α Goat y α Tim22p sometidas a electroforesis y reveladas con α VDAC1 (calles 2 y 3) presentan un patrón de bandas muy parecido al del inmunoblot revelado con α Tim22p (Figura 25). En consecuencia, las bandas que se observan para la IgG α Goat (calle 2) se sitúan a masas moleculares superiores a 50 kDa, con un fuerte arrastre de la señal y una débil banda a la altura de 26 kDa. En lo que respecta a α Tim22p (calle 3) se observan las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, así como otras de masa molecular superior a 50 kDa. En las siguientes calles 4, 5 y 6 se muestran las sucesivas etapas del proceso de co-inmunoprecipitación. En todas ellas y como cabe esperar, se aprecia la señal correspondiente a la presencia de VDAC1, a una altura de 27 kDa. No obstante la intensidad de la señal se va reduciendo a medida que el proceso avanza, lo que es congruente con el fraccionamiento de VDAC en dos porciones, una de las cuales se encontraría unida al inmunoprecipitado, en detrimento de la señal en el sobrenadante.

Es significativo comprobar cómo en las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p (calle 7) y α Goat (calle 8) la proteína VDAC1 solo está presente, junto a las respectivas cadenas ligera y pesada del anticuerpo, si la co-inmunoprecipitación se lleva a cabo con α Tim22p (calle 7). Estos resultados demuestran, la existencia de una interacción directa entre el complejo TIM22 y VDAC1. Además, la ausencia de bandas en el último control de co-inmunoprecipitación con α Goat (calle 8), demuestra la especificidad de la reacción de co-inmunoprecipitación. En definitiva estos resultados ponen de manifiesto que VDAC1 co-inmunoprecipita junto a los componentes de la translocasa TIM22.

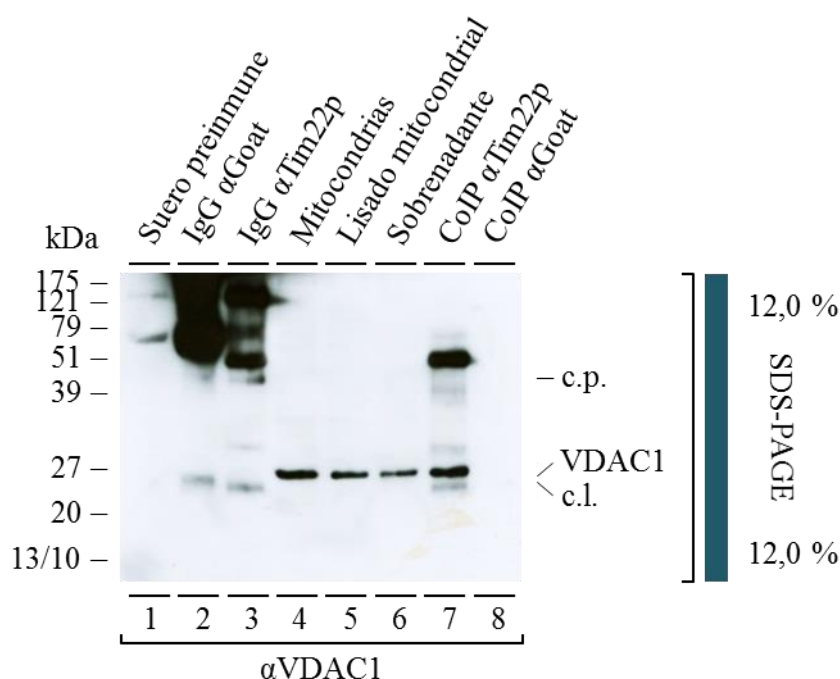


Figura 37. Co-inmunoprecipitación de VDAC1 y Tim22p

75 μ g de mitocondrias de la estirpe control lisadas con una concentración del 0,5% de digitonina. Se han co-inmunoprecipitado con el anticuerpo α Tim22p. Las proteínas se han separado mediante SDS-PAGE en un gel al 10%. La inmunodetección con α VDAC1 se ha realizado tras incubación durante toda la noche a 4 °C con una dilución 1:5000 del anticuerpo primario, seguido de hora y media a temperatura ambiente en contacto con el secundario α Mouse a dilución 1:5000. Las cantidades de proteína que se han utilizado en el experimento son: suero preimmune y IgG α Goat e IgG α Tim22p, 1 μ g; mitocondrias, lisado y sobrenadante 0,5 μ g; y las calles correspondientes a las Co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p y α Goat, todo el producto de la co-inmunoprecipitación.

4.3.4. Especificidad de la interacción

Teniendo en cuenta la cooperación funcional entre ellas, hasta la fecha, el candidato principal de la membrana externa para interactuar directamente con la translocasa TIM22 parecía ser el complejo TOM. No obstante TOM, que es la puerta de entrada a la mitocondria común para todas las proteínas de origen nuclear, no se ha logrado relacionar físicamente con TIM22. Este hecho, unido al origen evolutivo común de VDAC1 y Tom40p (Pusnik, Charrière et al. 2009) y a la similitud estructural que presentan sus canales (Zeth 2010), permite establecer la hipótesis de que VDAC1 pudiera desempeñar algún papel en la entrada de proteínas a la mitocondria. Por ello se ha decidido profundizar en la interacción VDAC-TIM22, analizando el efecto que tienen sobre ella cada uno de componentes de la translocasa TIM22.

En el apartado 3.1. se ha puesto de manifiesto que en las líneas celulares mutantes que han eliminado alguno de los componentes integrales de membrana de TIM22, esta eliminación comporta la modificación en la biogénesis de la translocasa. La pregunta que surge ahora es cómo esta circunstancia puede afectar a la interacción entre la translocasa TIM22 y VDAC1.

La aproximación más inmediata para comprobarlo es la realización de la co-inmunoprecipitación mediante α Tim22p de lisados de las mitocondrias aisladas de las 8 líneas celulares, portadoras de mutaciones en la translocasa TIM22 y en el componente principal de la translocasa TIM23, para a continuación determinar la presencia o ausencia de VDAC1 en las muestras.

Los resultados previos mostrados (figura 28) me han permitido demostrar que la integridad de TIM22 solo se mantiene en las mitocondrias de estirpes en las que los tres componentes integrales del complejo están presentes y que cualquier disminución significativa en alguno de ellos impide la biogénesis de TIM22, a su vez que la biogénesis de VDAC1 parece estar condicionada por la integridad de la translocasa TIM22 (Figura 34).

Por eso para comprobar la especificidad de la interacción entre VDAC1 y TIM22, se ha realizado la co-inmunoprecipitación con α Tim22p de lisados de todas las estirpes

mutantes en las proteínas integrales de la translocasa TIM22 anteriormente descritas y el resultado de las mismas se ha analizado mediante Western blotting, buscando la presencia de VDAC1 y Tim22p. En este caso, los controles utilizados han sido: las mitocondrias de la estirpe control y el anticuerpo α Tim22p.

En la figura 38 se ha analizado el efecto de la eliminación de las proteínas Tim18p, Tim22p, Tim54p y Tim23p sobre la interacción de la translocasa TIM22 con VDAC1. En la calle 1 se detecta la banda característica de VDAC1 presente en mitocondrias, que migra junto al marcador de 27 kDa; mientras que la calle 2 corresponde al típico patrón de bandas de un anticuerpo α Tim22p, descrito ya en el apartado 4.4.3. (Figura 25., calle 3). En la figura también se puede observar cómo la integridad de la interacción, definida por la coprecipitación de la proteína VDAC junto a α Tim22p, se mantiene en las calles 3, 5, 7 y 10, pertenecientes a las estirpes en las que los tres componentes integrales de TIM22 se encuentran presentes simultáneamente (ver Figura 16, calles 1, 3, 5 y 8). Por el contrario, la disminución significativa en cualquiera de las tres proteínas integrales de la translocasa, impide la detección de VDAC1 junto a Tim22p (calles 2, 4, 6 y 7).

En todas las calles correspondientes a las co-inmuprecipitaciones se han detectado además de la señal correspondiente a VDAC1, las señales características de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, a 25 y 50 kDa respectivamente presentes en las estirpes \uparrow Tim18p, \uparrow Tim22p, control y \downarrow Tim23p.

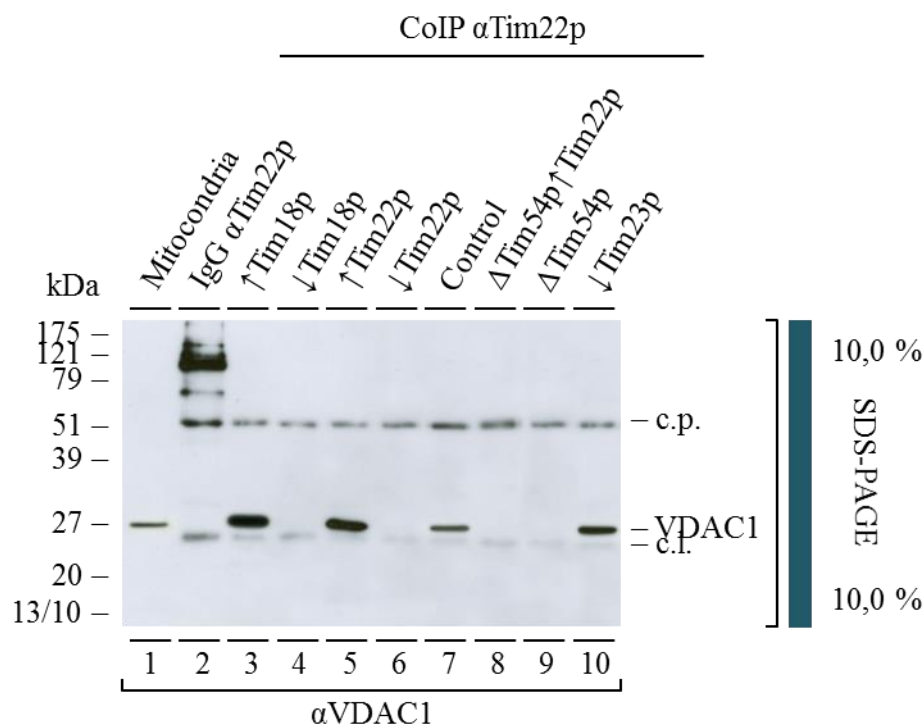


Figura 38. Co-inmuprecipitación de VDAC1 y Tim22p en las estirpes mutantes en la translocasa TIM22

75 μ g de mitocondrias de cada una de las estirpes mutantes en la translocasa TIM22 se han lisado utilizando una concentración del 0,5% de digitonina. Estos lisados se han co-inmunoprecipitado con α Tim22p siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.11. Por cada co-inmunoprecipitación se ha cargado el 50% del volumen que se ha obtenido de la misma, 25 μ l en este caso, mientras que en la calle 1, mitocondrias control (CDD38), y en la calle 2, α Tim22p, se han cargado 0,25 y 0,5 μ g de proteínas respectivamente. Y se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida de un 10% de concentración. La inmunodetección de VDAC1 se ha realizado con el anticuerpo específico frente a esta proteína en una dilución 1:5000, usando como secundario su antisuero en dilución 1:2500.

Estos resultados indican que la interacción entre VDAC1 y TIM22 es específica para la translocasa y no solo para su componente Tim22p, puesto que no se ha detectado la señal correspondiente a VDAC1 en las calles 4, 8 y 9, pertenecientes a las co-inmunoprecipitaciones de las estirpes: \downarrow Tim18p, en la que solo se encuentran presentes Tim22p y Tim54p; Δ Tim54p \uparrow Tim22p, en la que coexiste la proteína Tim18p junto a una sobre expresión superior al 500% de Tim22p; y Δ Tim54p, en la que el nivel de expresión de Tim18p es del orden de tres veces superior al de Tim22p.

Con todo se ha considerado oportuno verificar la especificidad de las técnicas y protocolos empleados. Por eso los resultados de las co-inmunoprecipitaciones anteriores se han sometido de forma paralela a inmunodetección con el anticuerpo α Tim22p.

En la figura 39 se comprueba que en las mitocondrias de todas las células en las que Tim22p está presente (calles 3-5 y 7-10) se produce la coprecipitación con el anticuerpo. Además, no se aprecian diferencias significativas entre la intensidad de las señales, a excepción de las calles 6 y 8, correspondientes a las estirpes \downarrow Tim22p y Δ Tim54p \uparrow Tim22p respectivamente. En la primera de ellas (calle 6) y como consecuencia de la delección de la proteína Tim22p que presenta esta estirpe, solo se pueden apreciar las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. Por otra parte, en la calle 8, correspondiente a las células Δ Tim54p \uparrow Tim22p, se evidencia que junto a las señales pertenecientes a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se produce un incremento de la señal de la banda de Tim22p; por lo que cabe inferir que la sobreexpresión de Tim22p, inherente a las células de esta estirpe, está correlacionada con el aumento de la cantidad libre de esta proteína.

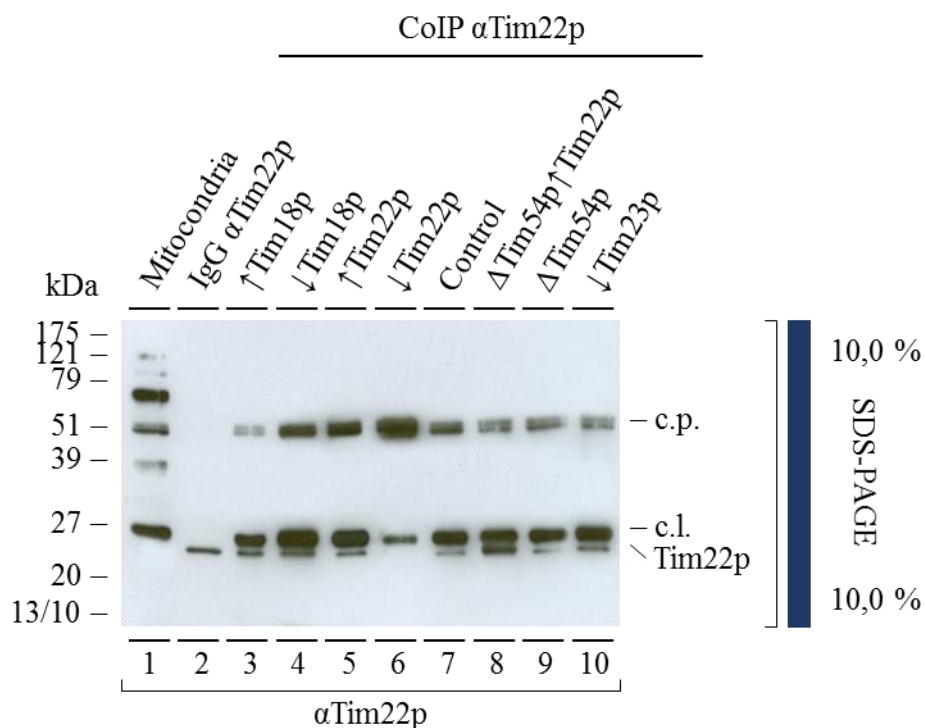


Figura 39. Inmunoprecipitación de Tim22p en las estirpes mutantes en la translocasa TIM22

25 μ l de los productos de co-inmunoprecipitación del experimento anterior se han sometido nuevamente a electroforesis SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida de un 10% de concentración. Así, del mismo modo, en la calle 1 se cargaron: mitocondrias control (CDD38), y en la calle 2, α Tim22p, en las que se han cargado 0,25 y 0,5 μ g de proteínas respectivamente. La inmunodetección de Tim22p se ha realizado con el anticuerpo específico en dilución 1:5000, y su antisuero α Goat en 1:2500. El tiempo de exposición para la detección de esta proteína ha sido de 10 minutos.

Estos resultados permiten interpretar que la ausencia de cambios significativos en la intensidad de la señal correspondiente a Tim22p en el resto de estirpes mutantes, obedece a la eficiente co-inmunoprecipitación en todos los casos.

Otra forma de corroborar la especificidad de la interacción entre VDAC1 y TIM22 es mediante el experimento antagónico; es decir la co-inmunoprecipitación de Tim22p junto a VDAC1 pero a través del anticuerpo α VDAC1. Esto es: comprobar si es posible arrastrar a Tim22p junto a VDAC1, cuando el anticuerpo inmovilizado es el específico para esta porina.

Con este fin mitocondrias de la cepa control se han lisado con un 0,5% de digitonina y el extracto se ha enfrentado por separado a los anticuerpos específicos para las proteínas Tim22p, VDAC1 y Tim23p previamente inmovilizados. Como control se ha utilizado la señal de Tim22p procedente directamente de una muestra de mitocondrias sin lisar.

En la figura 40 se han recogido estos resultados. La primera calle corresponde a mitocondrias de la estirpe control, donde se identifica la señal correspondiente a Tim22p, que como cabe esperar migra a la altura del marcador de 22 kDa. Las calles 2, 3 y 4 corresponden a las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p, α VDAC y α Tim23p, respectivamente. Tim22p solo se detecta en las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p y α VDAC1, mientras que esta proteína no es capaz de interactuar con el componente de la translocasa TIM23. La diferencia observada en la intensidad de las señales entre las calles 2 y 3 puede tener su explicación en el hecho de que, como se ha demostrado, en condiciones nativas VDAC1 se reparte entre varias especies moleculares (ver Figura 32), de las cuales solo una fracción es la que se colocan con TIM22; siendo esta la fracción susceptible de co-inmunoprecipitar con α Tim22p. En definitiva, estos experimentos corroboran que la coprecipitación de VDAC1 junto a TIM22 se produce con independencia de cuál de los dos anticuerpos se utiliza, siendo además específica entre ambas.

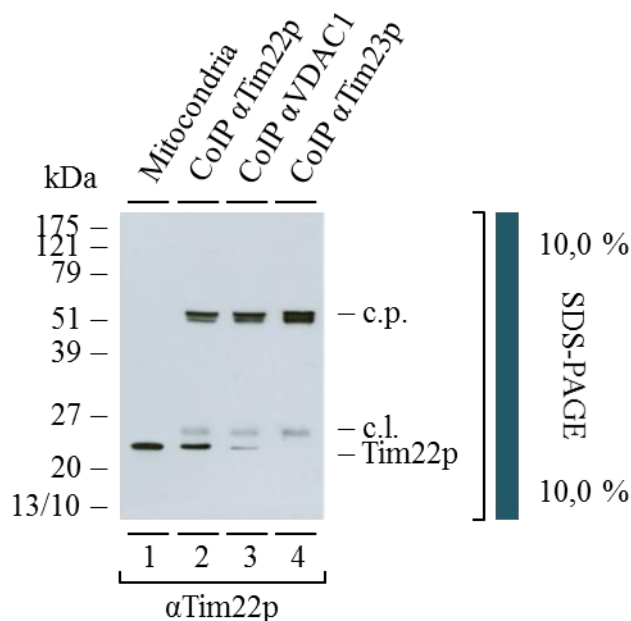


Figura 40. Co-inmuprecipitación de Tim22p con anticuerpos frente a Tim22p, VDAC1 y Tim23p

Tras el lisado de 225 μ g de mitocondrias de la estirpe control con 225 μ l de tampón de lisis, estos se dividieron en 3 fracciones de 75 μ l y se han sometido a co-inmunoprecipitación con los anticuerpos α Tim22p, α Tim23 y α VDAC1. El 50% del producto de coprecipitación se ha separado mediante electroforesis SDS-PAGE, e inmunodetectado la proteína Tim22p con su anticuerpo específico. En las calles de la 2 a la 4 se han cargado el producto de co-inmunoprecipitación con α Tim22p, α VDAC1 y α Tim23p respectivamente, así como control en la calle 1 se han añadido 0,5 μ g de mitocondrias de la estirpe control. Las siglas c.l. y c.p. se refieren a las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos respectivamente.

La siguiente cuestión a analizar es si en estas mismas condiciones y junto al componente principal de la translocasa TIM23 (Tim23p), proteína homóloga de Tim22p, se pudiera también encontrar VDAC1. Para ello basta con incubar nuevamente la membrana con el anticuerpo específico frente a la proteína que se desea inmunodetectar, en este caso α VDAC1.

En las calles 2 y 3 de la figura 41, una vez más se pone de manifiesto que en mis condiciones experimentales, bajo un 0,5% de digitonina, VDAC y Tim22p se encuentran interaccionando, en mitocondrias de la estirpe control.

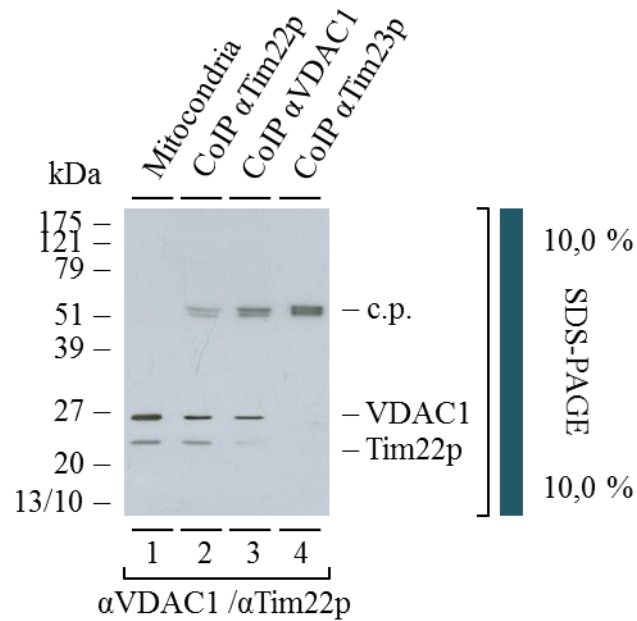


Figura 41. Co-inmuprecipitación de VDAC1 con los anticuerpos frente a Tim22, VDAC1 y Tim23p

La membrana que se ha utilizado en el experimento anterior, se ha incubado con el anticuerpo α VDAC1, de tal forma, que simultáneamente se han detectado las proteínas VDAC1 y Tim22p. Las siglas c.p. corresponden a la cadena pesada.

No obstante es significativo comprobar cómo, la señal de VDAC1 no está presente en la muestra resultado de la co-inmunoprecipitación con α Tim23p (calle 4), confirmando así la selectividad del proceso de co-inmunoprecipitación de VDAC1 con la translocasa TIM22, pero no con la TIM23.

Finalmente, se ha querido descartar que estos resultados fuesen fruto de una incorrecta co-inmunoprecipitación con el anticuerpo α Tim23p.

En la figura 42 se ha revelado la señal correspondiente a Tim23p no solo en la calle 1 (mitocondrias) utilizada como control, sino que también junto a las señales correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo α Tim23p empleado en el proceso de co-inmunoprecipitación (calle 4). Algo que no ha sucedido en las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p y α VDAC1.

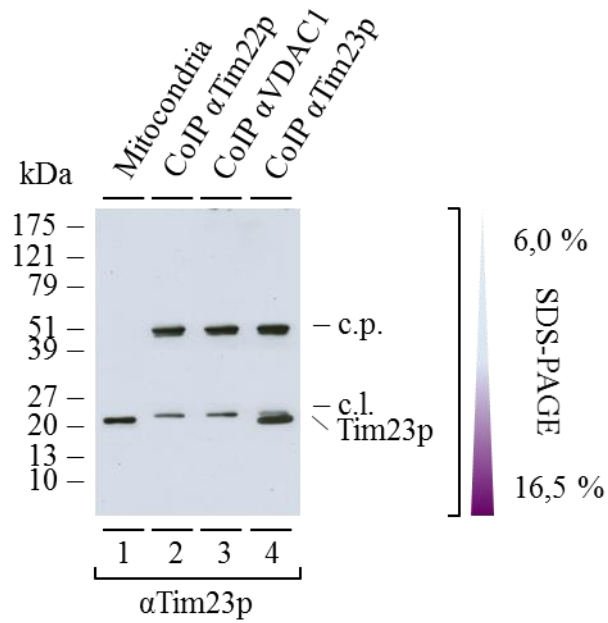


Figura 42. Co-inmuprecipitación de Tim23p con los anticuerpos α Tim22, α VDAC1 y α Tim23p

El 50% de los productos de co-inmunoprecipitación previamente descritos se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. El orden de carga en los 3 experimentos es el mismo. Al igual que en los experimentos anteriores en la calle 1 se han cargado 0,25 μ g de proteína total de mitocondrias control.

Estos resultados tomados en su conjunto, demuestran la especificidad de interacción entre la translocasa TIM22 y la porina mitocondrial, al tiempo que descartan la participación de la translocasa homóloga TIM23 en la misma.

4.3.4.1. Estudios de Co-inmunoprecipitación

Una vez establecida la concomitancia entre la biogénesis de VDAC1 y la presencia simultánea de las 3 proteínas integrales de TIM22, y constatada también la existencia de una interacción específica entre ellas, parece lógico averiguar si, del mismo modo que la integridad estructural de TIM22 afecta a la biogénesis de VDAC1 (referirse al apartado correspondiente), también VDAC (y en particular sus distintas isoformas), pudieran comprometer la estabilidad de la translocasa. Para ello se ha decidido estudiar el efecto que las mutaciones en las isoformas de VDAC tienen sobre la estructura nativa de la translocasa TIM22 y su interacción con VDAC1.

Hasta la fecha se han descrito dos isoformas de la porina mitocondrial, VDAC1 y VDAC2, en *Saccharomyces cerevisiae*. Los mutantes Δ Por1, Δ Por2 y Δ Por1 Δ Por2, previamente descritos (apartado 3.2.) presentan la delección de la mayor parte del gen que codifica a cada una de estas dos proteínas, que son sustituidos por los genes marcadores *LEU2* o *TRP1*. De esta forma, la expresión de estas proteínas se encuentra condicionada por la presencia en el medio de cultivo de los aminoácidos leucina y/o triptófano (BlachlyDyson, Song et al. 1997).

La primera aproximación para comprobar el efecto de VDAC sobre la translocasa TIM22 ha consistido en: las electroforesis en condiciones nativas de mitocondrias aisladas de las 3 líneas celulares portadoras de mutaciones en una, otra o las dos isoformas de VDAC, así como de su estirpe isogénica parental.

Con la finalidad hacer comparables los resultados y ante la imposibilidad de utilizar a VDAC1 como control de carga, las BN-PAGE se han realizado tomando como referencia la cantidad de Tim22p de estas cuatro estirpes, previamente determinada en SDS-PAGE e inmunodetección con α Tim22p.

En la figura 43. A. se ha analizado el efecto de la eliminación de VDAC1, VDAC2 y de ambas isoformas, sobre la estructura nativa de la translocasa TIM22. Como ya he comprobado TIM22 se define por la presencia de una banda que se corresponde con el marcador de 300 kDa (figura 28), cuya integridad se mantiene en todos los casos, con independencia de la presencia o ausencia de las distintas isoformas de VDAC. Incluso la

eliminación simultánea de las dos isoformas de VDAC (calle 4) parece conllevar un ligero incremento en la intensidad señal de TIM22. Con estos resultados se comprueba que la biogénesis de la translocasa TIM22 no sigue el mismo patrón que el experimentado por VDAC1 (Figura 32), la cual he visto que está siempre ligada a la presencia simultánea de los 3 componentes integrales de TIM22. Por el contrario, la disminución significativa de cualquiera de las isoformas de VDAC (Figura 43.C.) mantiene la estructura del complejo TIM22 (Figura 43.A.).

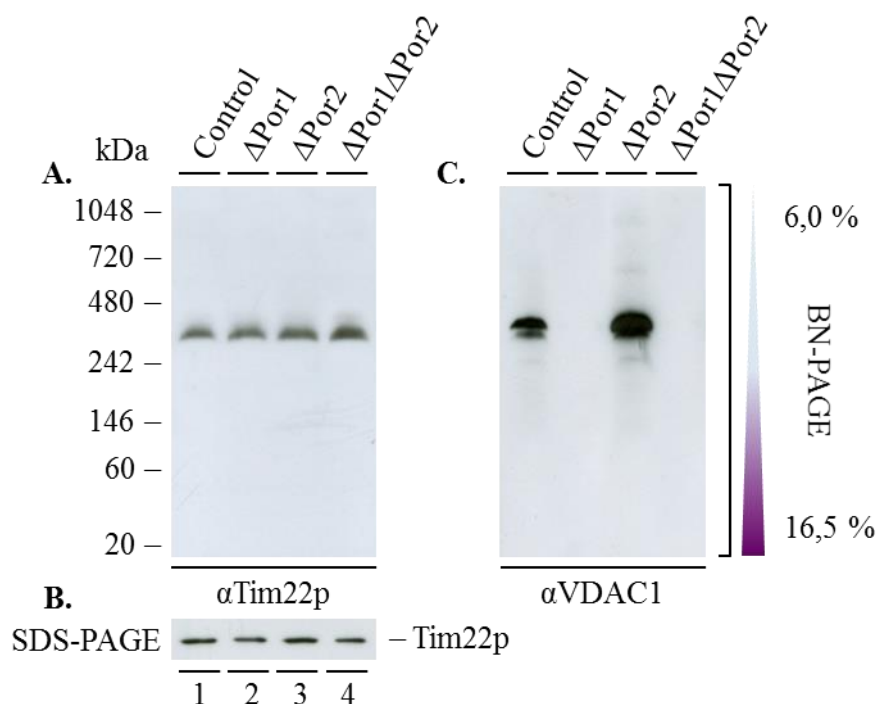


Figura 43. Efecto de eliminación de VDAC sobre la biogénesis de TIM22.

A. Extractos mitocondriales obtenidos con un 0,5% de digitonina, de las estirpes mutantes en las dos isoformas de VDAC conocidas en *Saccharomyces*, se han sometido a electroforesis BN-PAGE en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad total de proteínas que se ha cargado por pocillo oscila entre 4 y 10 μg , en función del nivel de expresión de Tim22p, proteína utilizada como control de carga. La inmunodetección se ha realizado con el anticuerpo αTim22p en una concentración de 1:10000, utilizando como secundario el anticuerpo αGoat en concentración 1:3000. **B.** Los mismos extractos mitocondriales se han sometido a SDS-PAGE para verificar el control de carga en A. La inmunodetección de Tim22p en SDS-PAGE se ha realizado del mismo modo que en el experimento anterior. **C.** En el mismo gel de electroforesis estos extractos previamente descritos y separados mediante BN-PAGE se han inmunodetectado con αVDAC1 , con el anticuerpo a una dilución 1:5000 y utilizando como anticuerpo secundario αMouse a 1:2500.

La figura 43.C. muestra que la eliminación de VDAC2 no altera la estabilidad estructural de las formas moleculares de VDAC1, que como previamente se ha descrito se definen como tres bandas entre 250 y 400 kDa. En la calle 3, Δ Por2, se observa cómo la eliminación de VDAC2 que se ha encontrado correlacionada con una sobre expresión de VDAC1 (figura 21) tiene su reflejo en un incremento significativo de las formas moleculares de VDAC1.

A continuación se ha querido comprobar si la eliminación de VDAC2 compromete de alguna manera la asociación entre TIM22 y VDAC1, o si por el contrario ambas isoformas de la porina son necesarias para mantener la integridad de esta interacción. Para ello, la primera aproximación utilizada ha sido la detección de VDAC1 entre las proteínas que co-inmunoprecipitan con α Tim22p, en las mitocondrias mutantes en una, otra o las dos formas de la porina.

En la figura 44.A. la calle 1 permite identificar la señal característica de Tim22p en mitocondrias. Por su parte, las tres bandas de 22, 25 y 50 kDa presentes en las calles 2 – 5, cabe inferir que se corresponden respectivamente con Tim22p y con las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En definitiva, este experimento demuestra la eficiencia del proceso de co-inmunoprecipitación de Tim22p en todas las líneas con mutaciones en VDAC.

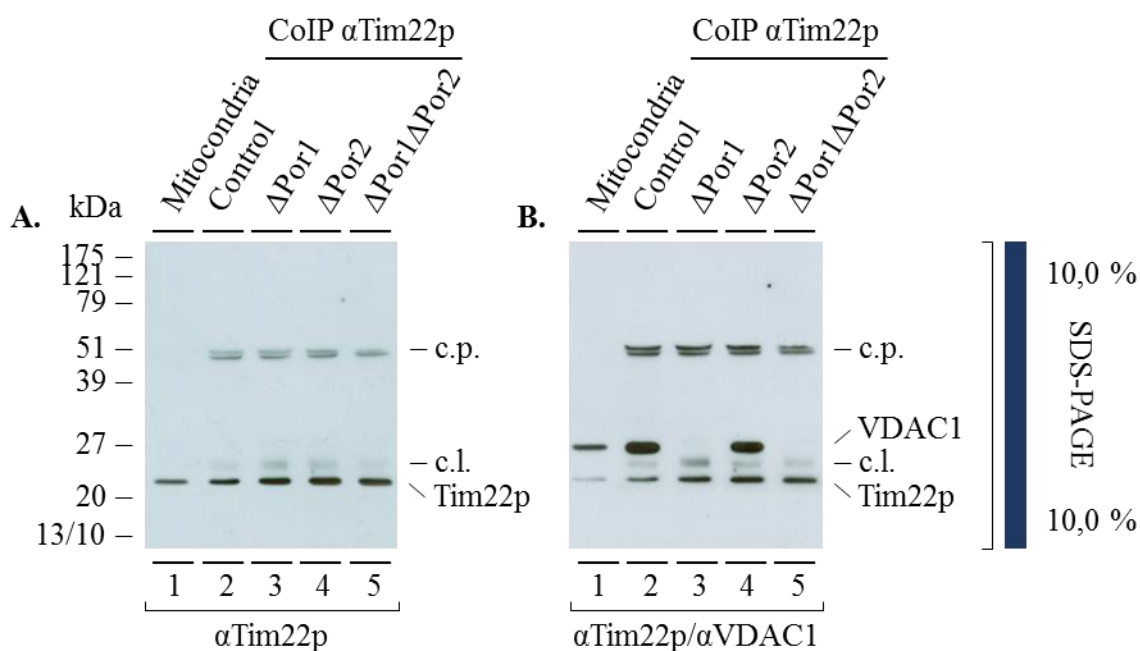


Figura 44. Co-inmuprecipitación de las proteínas Tim22p y VDAC1 en los mutantes en las isoformas de VDAC

A. Lisados obtenidos con un 0,5% de digitonina de las estirpes Δ Por1, Δ Por2 y doble mutante, Δ Por1 Δ Por2, junto con su parental, se ha enfrentado al anticuerpo específico frente a Tim22p previamente inmovilizado, siguiendo el procedimiento de co-inmuprecipitación. Las proteínas se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida del 10%. La inmunodetección de Tim22p se ha realizado con el anticuerpo específico frente a esta proteína en dilución 1:10000, mientras que su secundario α Goat a 1:3000. **B.** La inmunodetección de VDAC1 se ha realizado sobre la membrana previamente incubada con el anticuerpo α Tim22p, de forma que ambas proteínas han podido ser inmunodetectadas simultáneamente. La dilución de los anticuerpos primario y secundario ha sido 1:5000 y 1:2500 respectivamente.

En segundo lugar, la figura 44.B permite también comprobar que VDAC1 co-inmuprecipita junto a Tim22p en las mitocondrias en las que ambas proteínas se encuentran presentes (calles 2 y 4), y que esta asociación es independiente de la presencia (calle 2) o ausencia (calle 4) de VDAC2. De todo lo cual cabe inferir que VDAC2 no parece ser necesario ni condiciona la interacción entre TIM22 y VDAC1. Como es lógico, la señal de VDAC1 está ausente en las calles 3 y 5, en las que las muestras no contienen esta isoforma de la porina. La falta de disponibilidad de un anticuerpo que específicamente reconozca a VDAC2, me ha impedido comprobar, en este caso, si esta isoforma es susceptible o no de co-inmuprecipitar con Tim22p.

4.3.4.2. Efecto de la digitonina

A pesar de que los apartados previos me conducen a descartar la posibilidad de que la interacción entre la translocasa TIM22 y VDAC1, sea producto de una agregación proteica inespecífica inherente al empleo de detergentes, la trascendencia de afianzar este argumento ha seguido centrando una buena parte de este estudio. Por eso se han llevado a cabo varios análisis bioquímicos adicionales.

En el apartado 4.1. se ha visto que la biogénesis de la translocasa TIM22 está alterada en la línea celular mutante \downarrow Tim22p, como consecuencia de la drástica reducción del nivel de su componente integral Tim22p (Figura 16). Esta alteración genética sin embargo no afecta al nivel de expresión de VDAC1. Por su parte, la estirpe Δ Por1 descrita en el apartado 3.2. conlleva la delección del gen que codifica a VDAC1, lo que como he comprobado, no afecta a la formación del complejo TIM22, ni al nivel de expresión de los componentes de esta translocasa (Figura 21).

Teniendo en cuenta estos resultados previos, una aproximación muy directa para comprobar si la interacción entre VDAC1 y TIM22 es o no consecuencia del empleo de detergente durante el procesamiento de las muestras, es la co-inmunoprecipitación del extracto de una mezcla de mitocondrias provenientes de las dos estirpes anteriores, obtenido con una concentración de digitonina del 0,5%, idéntica a la empleada para el lisado de mitocondrias en el resto de experimentos. De esta forma, en el extracto de esta mezcla de mitocondrias se encontrarían simultáneamente presentes la translocasa TIM22, proveniente de la estirpe Δ Por1 y VDAC1 procedente de las células \downarrow Tim22p.

La co-inmunoprecipitación se ha realizado así empleando mitocondrias de ambas cepas solubilizadas en tampón de lisis conteniendo un 0,5% de digitonina, durante 30 minutos a 0 °C. Transcurrido este tiempo, este lisado se ha incubado con el anticuerpo α Tim22p, previamente inmovilizado en el soporte inerte. Tras la coprecipitación las proteínas que se encuentran interaccionando con Tim22p se han separado e identificado mediante SDS-PAGE, seguida de inmunoblot con los anticuerpos frente a Tim22p y VDAC1 respectivamente.

Paralelamente y con el fin de descartar la posibilidad de co-inmunoprecipitaciones inespecíficas, se han llevado a cabo una serie de controles. Así se han analizado también las señales de las co-inmunoprecipitaciones de lisados procedentes de cada una de las dos estirpes por separado empleadas en la mezcla: Δ Por1 y \downarrow Tim22p, así como de la estirpe control. Además en los experimentos se ha incluido una muestra de mitocondrias intactas de la estirpe control.

Con carácter previo, se han analizado también los niveles de expresión de Tim22p y VDAC1 en los 4 extractos mitocondriales analizados. Como control para la carga en la caracterización proteica, se ha empleado los niveles de VDAC1 y Tim22p en la estirpe control. De forma que la cantidad de mitocondrias lisadas de Δ Por1 y mezcla Δ Por1/ \downarrow Tim22p, se han ajustado para dar un nivel de Tim22p comparable al de la cepa control. De forma similar se ha ajustado la cantidad de VDAC1 en las muestras \downarrow Tim22p y mezcla Δ Por1/ \downarrow Tim22p. Los niveles de expresión de proteínas observados en los Western blots y en los análisis densitométricos que los acompañan (Figura 45), demuestran que tal y como se pretendía, la mezcla de Δ Por1 y \downarrow Tim22p (calles 7-9) presenta niveles de VDAC1 y Tim22p similares a los de la estirpe control (calles 1-3). Como cabe esperar, los extractos de las mitocondrias aisladas de las estirpes Δ Por1 (calles 4-6) y \downarrow Tim22p (calles 10-12), se han mostrado totalmente deficientes en VDAC1 y Tim22p respectivamente.

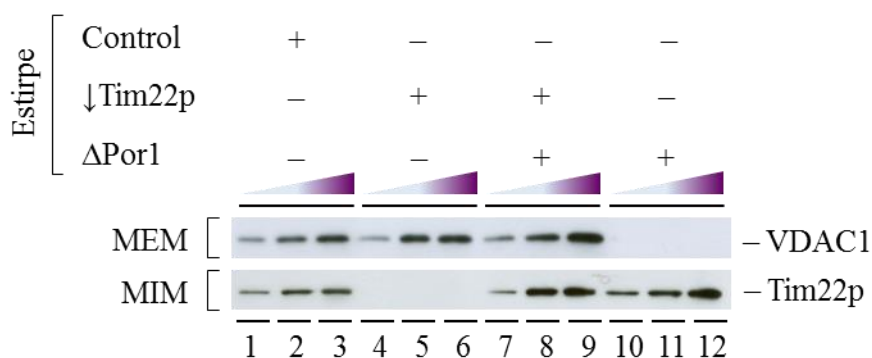


Figura 45. Composición proteica de VDAC1 y Tim22p en la mezcla de estirpes Δ Por1 y \downarrow Tim22p

Las proteínas procedentes de lisados de las mitocondrias: control, Δ Por1, mezcla Δ Por1/ \downarrow Tim22p y \downarrow Tim22p, se han separado mediante SDS-PAGE y sometido a análisis de Western blot específico para los anticuerpos frente a las proteínas VDAC1 y Tim22p, cargando por cada muestra tres cantidades crecientes de proteína e iguales de cepa a cepa, estas oscilan entre el 0,5 y 2 μ g de proteína total. Los anticuerpos que se han utilizado en la dilución descrita en el apartado Anticuerpos de Material y Métodos.

Los histogramas representativos del nivel de expresión de proteínas observados en los Western blots y en los análisis densitométricos se han realizado mediante el análisis de los extractos estudiados (Figura 46). Tomando como referencia para su elaboración el nivel de las dos proteínas en la estirpe control, que se ha considerado como el 100%, comparándose todas ellas entre sí en función de la proteína tomada como control de carga.

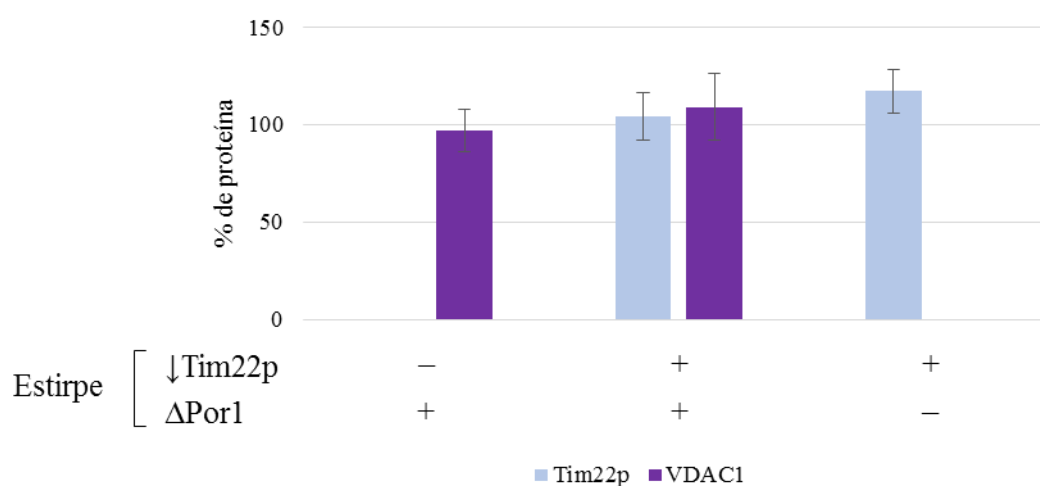


Figura 46. Nivel de expresión de las proteínas VDAC1 y Tim22p en los extractos mitocondriales de mezclas de las estirpes Δ Por1 y \downarrow Tim22p

La representación gráfica de la cuantificación de la expresión de las proteínas a estudio en los extractos mitocondriales, se ha realizado mediante diagramas de barras, expresando los resultados en porcentaje. Los valores se han obtenido por el análisis de los Western Blot previamente mostrados, ajustando los valores de los mismo a una línea recta. Estos valores se han obtenido mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU, expresando los valores en función de la muestra control.

Una vez constatado el nivel de expresión de las dos proteínas a estudio en los distintos extractos, se han analizado las señales debidas a las co-inmunoprecipitaciones, separando e identificando las proteínas de interés, mediante SDS-PAGE y western blots. En el inmunoblotting correspondiente a Tim22p (Figura 47. A.) se muestra cómo tanto en mitocondrias intactas como en los extractos en los que Tim22p se encuentra presente (calles 1-3 y 5), es posible detectar la banda correspondiente a esta proteína. Este hecho confirma así que proceso de co-inmunoprecipitación ha sido correcto. Por su parte y,

como es de esperar, en la muestra ↓Tim22p no se ha detectado esta señal. Además, en las cuatro co-inmunoprecipitaciones (calles 1 – 4) se han detectado también las señales correspondientes a las cadenas ligera y pesa del anticuerpo, que migran a una altura de 25 y 50 kDa respectivamente.

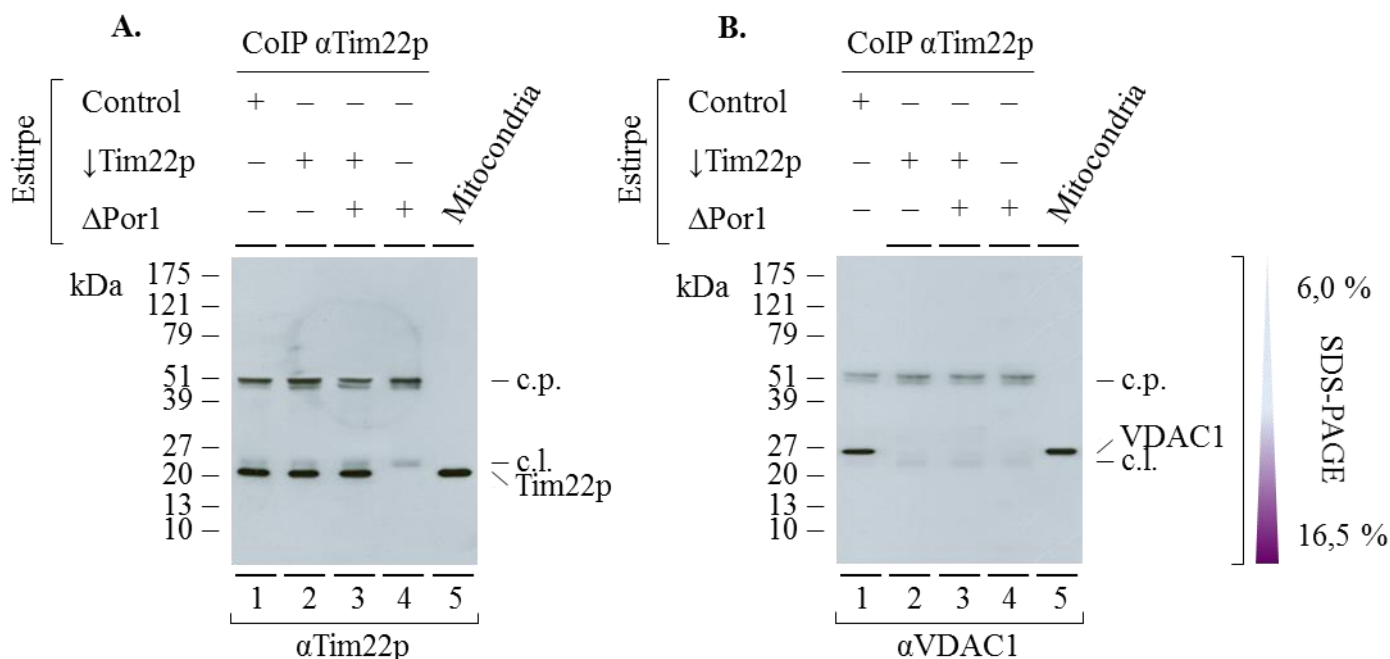


Figura 47. Co-inmunoprecipitación de Tim22p y VDAC1 en mitocondrias de mezclas de células ΔPor1 y ↓Tim22p

A. Las co-inmunoprecipitaciones de los extractos procedentes de las muestras control, ΔPor1, mezcla ΔPor1/↓Tim22p y ↓Tim22p, así como mitocondrias de las estirpes control (CDD38) se han sometido a electroforesis SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida en gradiente de concentración del 6 al 16,5%, separando las proteínas que posteriormente se han inmunodetectado con el anticuerpo αTim22p, a una concentración de 1:5000, usando como secundario el anticuerpo αGoat en concentración 1:3000. **B.** La inmunodetección con el anticuerpo αVDAC1 se ha realizado con el anticuerpo αVDAC1 en concentración de 1:5000, usando como secundario el anticuerpo αMouse en concentración 1:2500. Por cada co-inmunoprecipitación se ha cargado el 50% del co-inmunoprecipitado, un volumen de 25 μl, cargando 0,25 μg de proteína control en la muestra de mitocondrias (calle 5).

Análogamente se ha realizado la inmunodetección de VDAC1 (Figura 47.B.). Así, cantidades de cada co-inmunoprecipitado, idénticas a las utilizadas en el experimento anterior, se han sometido también a SDS-PAGE e inmunoblotting, en este caso con el anticuerpo αVDAC1.

De la figura 47. B. se desprende que la integridad de la interacción entre VDAC1 y TIM22, definida por la co-inmunoprecipitación de la proteína VDAC1 junto a Tim22p, obedece a la necesidad de que ambas maquinarias moleculares se encuentren presentes dentro de la mitocondria, algo que de forma natural solo ocurre en las mitocondrias control (calle 1); puesto que la mezcla de mitocondrias de la calle 3, si bien contiene ambas proteínas, estas no proceden de las mismas mitocondrias. Con todo se ha comprobado que la interacción VDAC1-TIM22 no es consecuencia de una agregación inespecífica que pudiera estar causada por del empleo de detergente durante el lisado y extracción de las proteínas mitocondriales.

Una vez comprobado que las condiciones de aislamiento y extracción de las proteínas mitocondriales que se han utilizado no comprometen la formación de una interacción entre las maquinarias de VDAC1 y TIM22, se ha querido comprobar también si un aumento en la cantidad de Tim22p o de VDAC1 (proteína que suele formar agregados) podrían afectar a esta interacción.

Para ello, en la mezcla de mitocondrias procedentes de estirpes diferentes, se han empleado cantidades crecientes de la línea \downarrow Tim22p, 3 y 10 órdenes de magnitud superiores a las utilizadas en el experimento previo, manteniendo en todos los casos la cantidad de las mitocondrias de la línea Δ Por1. Se ha de reseñar que la estirpe \downarrow Tim22p, a pesar de carecer de la translocasa TIM22, presenta una expresión de VDAC1 similar a la de las células control, (Figura 21).

En este caso, el análisis se ha realizado en tres mezclas mitocondriales de las estirpes Δ Por1 y \downarrow Tim22p. En la primera de ellas se han reproducido las cantidades utilizadas en el experimento anterior (A), tomándose esta proporción como control. En las otras dos preparaciones, las cantidades de \downarrow Tim22p que se han utilizado son del orden de 3 (B) y 10 veces (C) superiores a la control. Siguiendo el procedimiento habitual, se han lisado las distintas mezclas de mitocondrias con un 0,5% de digitonina, y se han determinado los niveles de expresión de proteínas observados en los Western blots.

La figura 48 demuestran que tal y como se pretendía, en los tres casos los tres extractos mantienen el mismo nivel de expresión de Tim22p. A su vez, se ha comprobado que en las muestras B y C, el aumento de la cantidad de mitocondrias \downarrow Tim22p se ve acompañado por un incremento en VDAC1 del 300% y superior al 900%, respectivamente.

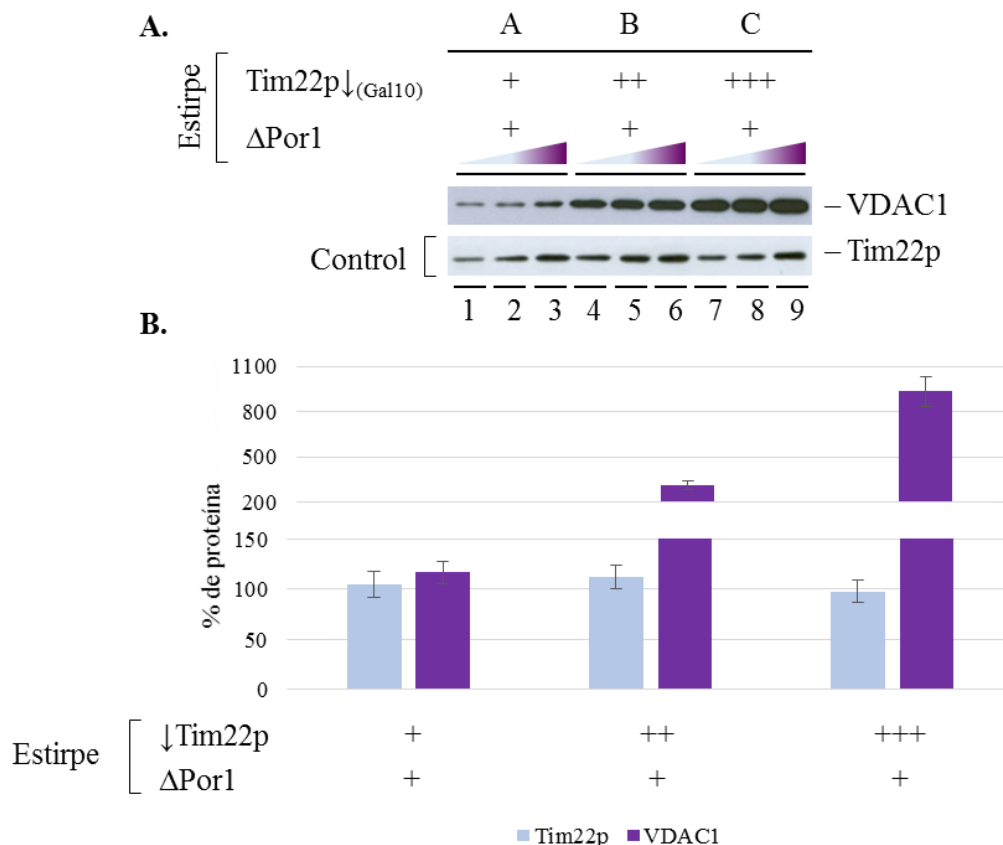


Figura 48. Determinación de VDAC1 y Tim22p en mezclas de mitocondrias de la estirpe Δ Por1 con cantidades crecientes de mitocondrias de \downarrow Tim22p

A. Mitocondrias de las estirpes \downarrow Tim22p y Δ Por1 se han mezclado en proporciones 1/1 (A), 3/1 (B) y 10/1 (C). Así la mezcla 1/1 presenta una cantidad total de proteína mitocondrial de 50 μ g (25 μ g de \downarrow Tim22p/25 μ g de Δ Por1). Estas mezclas se han lisado con 100 μ l de tampón de lisis con 0,5% de digitonina, y se han separado mediante SDS-PAGE y sometido a análisis de Western específico para los anticuerpos frente a las dos proteínas de interés, VDAC1 y Tim22p. Se han cargado cantidades crecientes de proteínas: 0,5, 1 y 2 μ g de proteína total por cada línea celular. La inmunodetección se ha realizado con los anticuerpos en la dilución especificada en el apartado Anticuerpos de Material y Métodos. **B.** La representación gráfica de la cuantificación de la expresión de las proteínas a estudio en los extractos mitocondriales, se ha realizado mediante diagramas de barras, expresando los resultados en porcentaje. Los valores se han obtenido por el análisis de los Western Blot previamente mostrados, ajustando los valores de los mismo a una línea recta. Estos valores se han obtenido mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU, expresando los valores en función de la muestra A, que se ha tomado como control.

Para la elaboración de los histogramas representativos de la expresión de proteínas (Figura 48.B), se ha tomado como referencia el nivel de ambas proteínas en el extracto control (A), que se han considerado como el 100%.

Tras la caracterización proteica de los extractos de estas mezclas mitocondriales se ha procedido a estudiar el efecto que sobre la co-inmunoprecipitación de VDAC1 y Tim22p pudiera tener tanto la procedencia como la cantidad de ambas proteínas. La figura 49. A. muestra cómo incluso con niveles de VDAC1 del 900% con respecto a su expresión en mitocondrias control, si su procedencia es de mitocondrias que no contienen TIM22, no se consigue su co-inmunoprecipitación con Tim22p proveniente de otra estirpe. Al igual que en experimentos anteriores, como control de la eficiencia de la co-inmunoprecipitación se han utilizado mitocondrias intactas de la estirpe control CDD38 (calle 4).

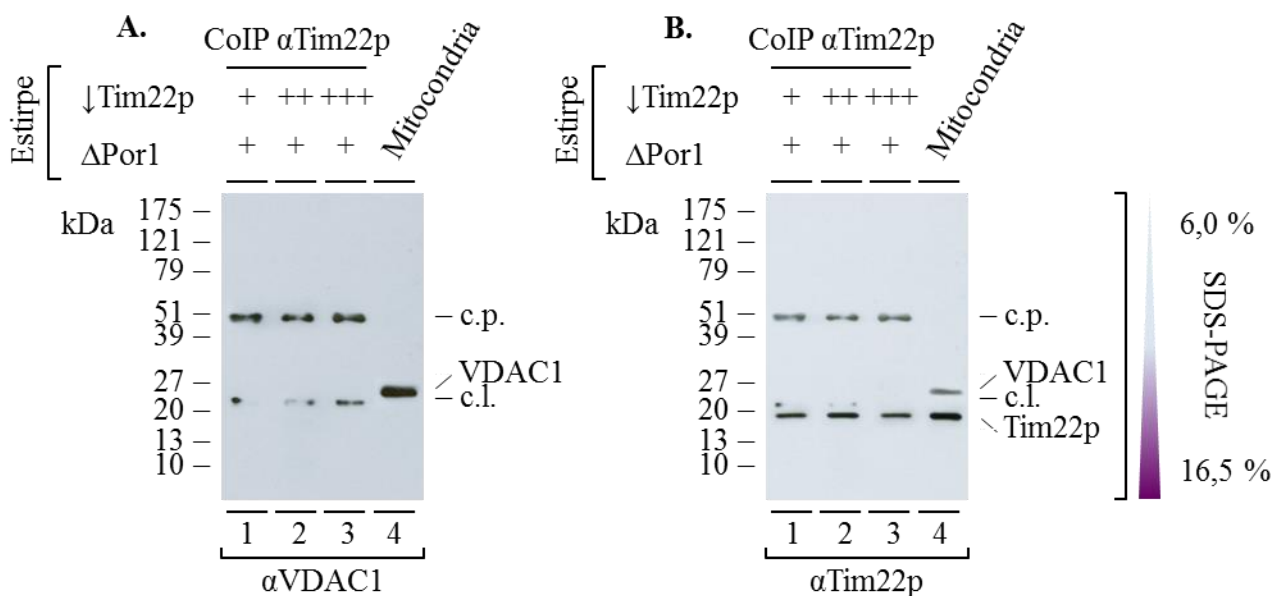


Figura 49. Co-inmuprecipitación de Tim22p y VDAC1 en mezclas de mitocondrias de Δ Por1 con cantidades crecientes de mitocondrias de \downarrow Tim22p

A. Extractos procedentes de mezclas de Δ Por1 y \downarrow Tim22p previamente descritas se han sometido a co-inmunoprecipitación con α Tim22p. Posteriormente se han separado en electroforesis SDS-PAGE, junto a una muestra de mitocondrias intactas de las estirpes control, en gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. VDAC1 se ha inmunodetectado con α VDAC en dilución 1:5000. **B.** Por su parte, la inmunodetección de Tim22p se ha realizado con su anticuerpo específico a igual dilución, sobre el gel en el que previamente se había inmunodetectado VDAC, de forma que ambas proteína son visibles. Por cada co-inmunoprecipitación se han cargado 25 μ l del producto de co-inmunoprecipitación, y 0,125 μ g de proteína en la muestra de mitocondrias control (calle 4).

A fin de confirmar que en estos experimentos la co-inmunoprecipitación ha funcionado de forma correcta, se ha llevado a cabo la inmunodetección de Tim22p, que se recoge en la figura 49.B. En la calle 4 perteneciente a la muestra control de mitocondrias sin tratar se identifican las señales correspondientes a Tim22p y VDAC1, migrando a la altura de los marcadores de 22 y 27 kDa respectivamente. Las tres señales de 22, 25 y 50 kDa presentes en las calles de la 1 – 3, cabe concluir que corresponden con Tim22p y a las respectivas cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En definitiva, se demuestra la correcta inmunoprecipitación de Tim22p en todos los extractos.

Tomados en su conjunto, todos estos resultados parecen demostrar la especificidad de la interacción existente entre el complejo TIM22 y VDAC1, al tiempo que descartan que dicha interacción pueda ser consecuencia del tratamiento previo de las mitocondrias con detergentes.

4.3.4.3. Análisis de la interacción VDAC1-TIM22 en mitoplastos

Tanto estudios llevados a cabo por otros autores como los presentados en este trabajo, permiten constatar la existencia de interacciones estructurales entre componentes y maquinarias proteicas situados en membranas mitocondriales distintas (Schleyer and Neupert 1985, Rassow, Guiard et al. 1989, Rassow, Hartl et al. 1990, Wienhues, Becker et al. 1991, Jascur, Goldenberg et al. 1992, Dekker, Martin et al. 1997, Kanamori, Nishikawa et al. 1997, Schülke, Sepuri et al. 1997, Chacinska, Rehling et al. 2003, Shi, Chen et al. 2003, Vyssokikh and Brdiczka 2003, Mokranjac, Popov-Celeketić et al. 2005). Centrando la atención en VDAC1 y TIM22, y teniendo en cuenta la asimetría estructural de ambas membranas, la forma en la que esta interacción responde a la separación física entre ellas puede aportar información sobre su grado de estabilidad, además de sobre su localización y distribución. En particular, el espacio entre la membrana externa y las crestas mitocondriales es muy estrecho, llegando a aparecer sitios en los que ambas membranas se llegan a fusionar en una sola (Hackenbrock 1968). Estas yuxtaposiciones entre las dos membranas mitocondriales, que no son estructuras fijas y estables sino dinámicas, se conocen como sitios de contacto (Schleyer and Neupert 1985, Rassow, Guiard et al. 1989, Rassow, Hartl et al. 1990, Wienhues, Becker et al. 1991, Jascur,

Goldenberg et al. 1992, Kanamori, Nishikawa et al. 1997, Schülke, Sepuri et al. 1997). Tanto una fracción de VDAC1, a través de su probable relación con ANT en el MPTP, como TIM23 por su interacción con TOM, se han relacionado con los sitios de contacto (Dekker, Martin et al. 1997, Chacinska, Rehling et al. 2003, Shi, Chen et al. 2003, Vyssokikh and Brdiczka 2003, Mokranjac, Popov-Celeketić et al. 2005). Si bien, no hay ningún estudio en la literatura que relacione a la translocasa TIM22 con estos sitios.

A continuación se ha querido comprobar si esta interacción entre VDAC1 y TIM22 persiste en mitoplastos; es decir, mitocondrias desprovistas en su mayor parte de membrana externa. Entre los numerosos métodos para la obtención de mitoplastos se ha elegido el tratamiento de las mitocondrias con la Prensa de French[®], debido a que permite fragmentar la membrana externa mitocondrial, manteniendo intacta la interna, al tiempo que se preserva la integridad de gran parte de los sitios de contacto entre ambas membranas.

De este modo, mitocondrias de la estirpe control se han sometido al tratamiento en Prensa de French[®] para obtener los mitoplastos. Una vez concluido el tratamiento y al igual que en experimentos anteriores, se han determinado los niveles de Tim22p y VDAC1 presentes en los extractos, tanto de mitocondrias intactas como de mitoplastos (Figura 50). Al carecer los mitoplastos de la mayor parte de la membrana externa, como control de carga en la caracterización proteica, se ha tomado el nivel Tim22p. Además, la comparación de los niveles de expresión de las diferentes proteínas se ha llevado a cabo con respecto a las mitocondrias de la cepa control (CDD38), a partir de las cuales se han obtenido los mitoplastos.

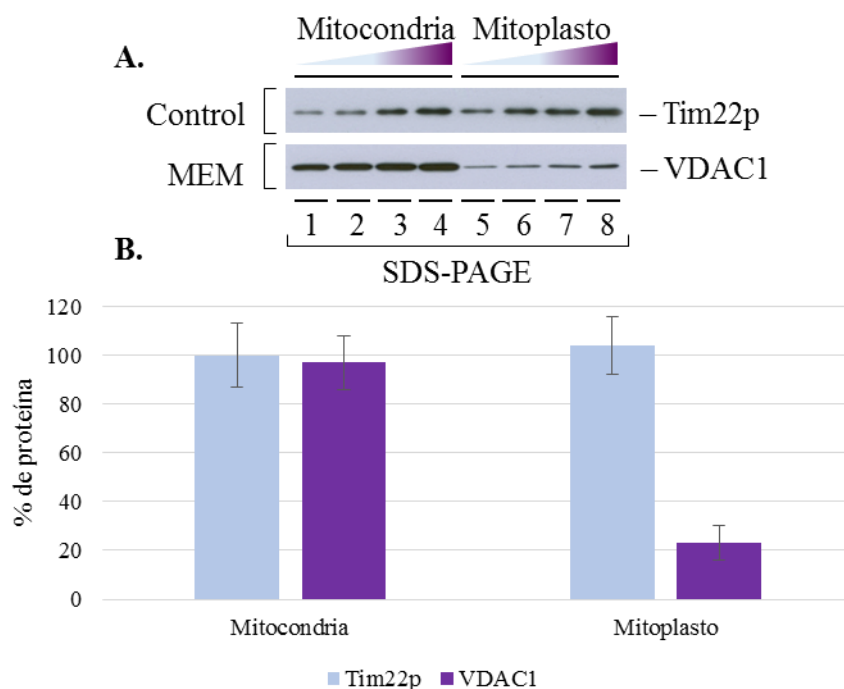


Figura 50. Composición proteica de Tim22p y VDAC1 en mitocondrias y mitoplastos

A. Lisados de mitocondrias y mitoplastos de la estirpe control (CDD38), se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE y sometidas a análisis de Western blot específico para los anticuerpos frente Tim22p y VDAC1. Como control de carga se ha usado la cantidad de proteína Tim22p en condiciones desnaturalizantes. Así la cantidad de proteína utilizada en este experimento oscila entre los 6,0 y 3,0 μg de proteína total en la muestra de mitocondrias, y los 1,5 - 0,5 en la de mitoplastos. **B.** Los diagramas representan la cuantificación de las proteínas a estudio en las distintas muestras expresadas en porcentaje. Los valores son el resultado del análisis densitométrico de las bandas proteicas representadas en los blots, mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU, expresando los valores en función de la muestra de mitocondrias de la estirpe control (CDD38) y de Tim22p, tomada como control.

Como cabe esperar, la eliminación de la mayor parte de la membrana externa mediante el tratamiento de las mitocondrias con la Prensa de French[®], está asociada a una significativa reducción de VDAC1 en la preparación de mitoplastos, con respecto a la de mitocondrias, con la que se compara y que se establece en el 100%. En la figura 50. B. se ha representado la cuantificación de la expresión proteica.

La pregunta que surge ahora es cómo la eliminación de la mayor parte de VDAC1 puede afectar a la interacción entre esta proteína y la translocasa TIM22. La aproximación

elegida para comprobarlo es la realización de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.

Para hacer comparables los resultados, las electroforesis BN-PAGE se han realizado tomando como control de carga la cantidad de Tim22p presente en las dos preparaciones de mitocondrias y mitoplastos respectivamente. Para ello y de forma previa, se ha determinado la cantidad de esta proteína derivada del análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

En la figura 51 se muestra el efecto de la eliminación de la mayor parte de la membrana externa mitocondrial sobre la translocasa TIM22 y las formas moleculares de VDAC1. Se ha observado cómo la integridad del TIM22, no se ve afectada en mitoplastos (Figura 51. B.). Por el contrario, se ha detectado una reducción proporcional en las formas moleculares nativas de VDAC1, como consecuencia de la eliminación casi completa de la membrana externa mitocondrial en mitoplastos (Figura 51.A.).

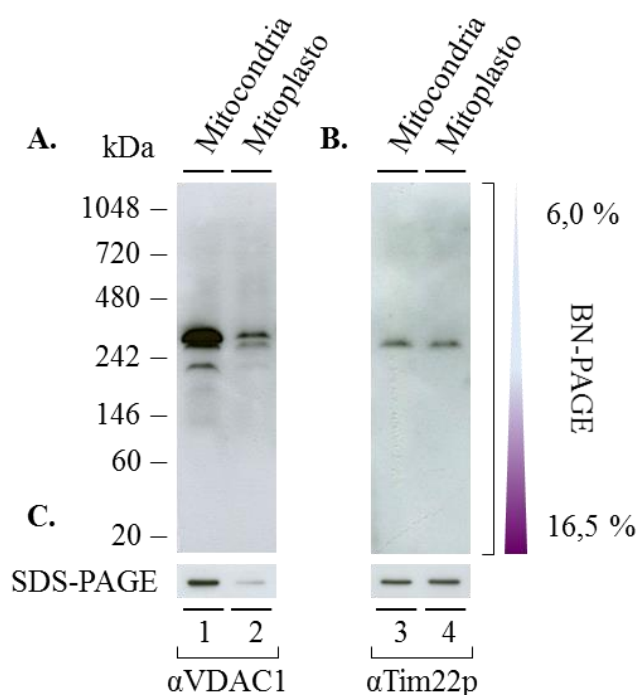


Figura 51. Efecto de la eliminación de la mayor parte de la membrana externa sobre TIM22 y VDAC1 Lisados obtenidos con un 0,5% de digitonina tanto de mitocondrias como de mitoplastos se han sometido a electroforesis BN-PAGE en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad total de proteína cargada fue de 6,5 μ g en la muestra de mitocondrias y 3 μ g en la muestra de mitoplastos, en función del nivel de expresión de la proteína Tim22p. Se han analizado las formas moleculares de VDAC (A.) y Tim22p (B.) en estado nativo. C. Paralelamente se ha sometido a electroforesis SDS-PAGE las muestras de BN-PAGE, tomando la misma cantidad de proteínas que en los experimentos de nativa.

Mediante densitometría de barrido de las electroforesis nativas las señales detectadas en los westerns se han resuelto en un perfil de densidades, que al superponerse permite comprobar la colocación de las diferentes proteínas y complejos proteicos.

Se comprueba que los extractos de mitocondrias y mitoplastos presentan un perfil densitométrico de Tim22p prácticamente idéntico, lo que demuestra que el tratamiento para la separación física de las dos membranas no ha afectado a la integridad del complejo TIM22 (Figura 52. A. y B., representado en color negro). Por su parte, el perfil de densidad para VDAC1 (representado en color gris), muestra cómo en mitoplastos, todas las señales de VDAC1 experimentan una sensible reducción, con respecto a las de mitocondrias. , resolviéndose en dos picos asimétricos, así como la banda presente a aproximadamente 200 kDa se reduce hasta casi desaparecer.

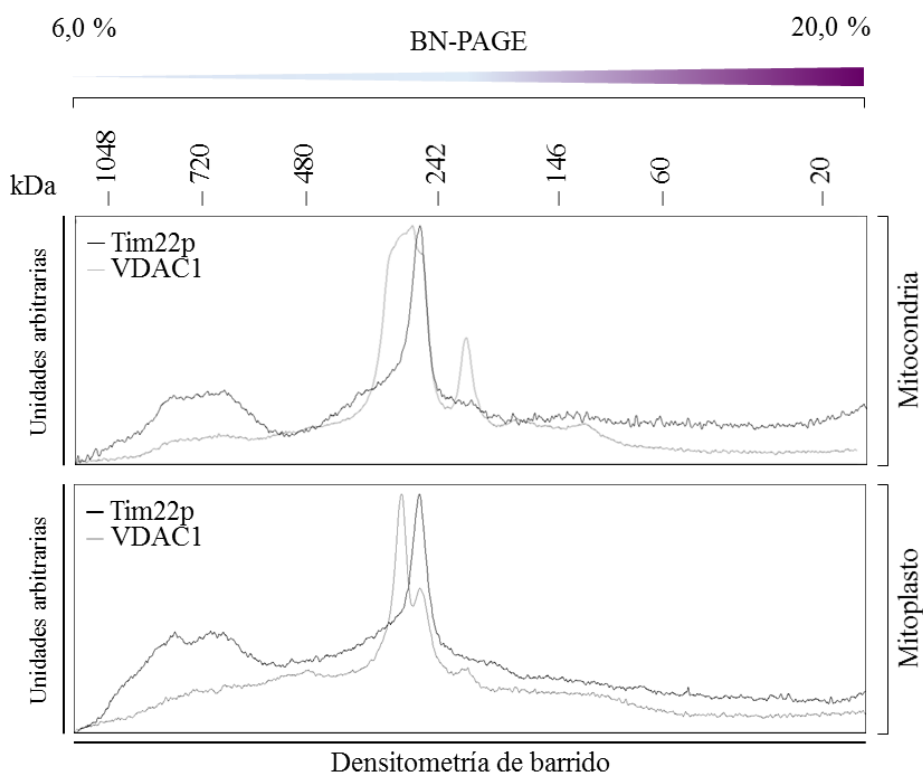


Figura 52. Densitometría de barrido y superposición de las estructuras nativas de VDAC1 y Tim22p en mitocondrias y mitoplastos

Los datos obtenidos mediante electroforesis bidireccional para mitocondrias y mitoplastos se han sometido a análisis de densitometría de barrido con ayuda del software informático ImageJ 1.33u, NIH, EEUU. Posteriormente estos valores se han superpuesto con el editor de imagen Adobe Photoshop CS5. Las estructuras en las que se encuentra presente Tim22p se han representado por una línea de color negro, mientras que en las que se encuentra presente VDAC1 se han representado en color gris.

4.4. Interacciones de TIM22 con otros componentes mitocondriales

Tras el inesperado hallazgo de la interacción entre la translocasa TIM22 y el canal aniónico dependiente de voltaje VDAC1, se ha decidido estudiar la posibilidad de interacciones de esta translocasa con otros componentes de los distintos compartimentos mitocondriales bajo mis condiciones de estudio.

Así, en la membrana interna mitocondrial se ha examinado el intercambiador de nucleótidos ANT, proteína que recientes investigaciones han relacionado con TIM23 y VDAC (Hunter and Haworth 1979, McEnery 1992, Zoratti and Szabò 1995, Beutner, Ruck et al. 1996, Beutner, Rück et al. 1998, Crompton, Virji et al. 1998, Marzo, Brenner et al. 1998, van der Laan, Wiedemann et al. 2006, Dienhart and Stuart 2008, Klingenberg 2008). Del espacio intermembrana se ha estudiado la proteína Tim10p, componente integral de los complejos Tim pequeños encargados de dirigir las preproteínas procedentes del núcleo desde el complejo TOM a TIM22 (Koehler, Merchant et al. 1998, Sirrenberg, Endres et al. 1998, Endres, Neupert et al. 1999, Luciano, Vial et al. 2001, Curran, Leuenberger et al. 2002, Truscott, Wiedemann et al. 2002, Webb, Gorman et al. 2006), ya que se ha descrito su capacidad para establecer uniones estables con Tim54p, junto a Tim9p y Tim12p (Hwang, Claypool et al. 2007, Wagner, Gebert et al. 2008). Finalmente, en la membrana externa mitocondrial se han examinado las proteínas Tom40p y Tom20p, componentes del complejo TOM, puerta de entrada común a la de la inmensa mayoría de las proteínas mitocondriales, y que hasta la fecha no se ha podido relacionar con TIM22, a pesar de que las teorías sobre la inserción de proteínas con estructura β -barril en la membrana interna mitocondrial confluyen en la hipótesis de una interrelación entre TOM y TIM22 (Dudek, Rehling et al. 2013).

Los resultados presentados hasta ahora establecen una interacción entre la translocasa TIM22 y el canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC1. Esta interrelación se encuentra en la línea de la recientemente descrita por Gebert y colaboradores (Gebert, Gebert et al. 2011), entre la translocasa TIM22 y Sdh3, miembro del complejo II de la cadena respiratoria (Oyedotun and Lemire 2004, Sun, Huo et al. 2005). De ahí que se haya decidido estudiar si una de las proteínas de membrana interna más extensamente analizadas, el intercambiador de nucleótidos ATP/ADP (ANT), presenta alguna interrelación con el complejo TIM22.

Como se ha descrito más detalladamente en apartados anteriores, ANT se encuentra integrando varios complejos multiproteicos, entre los que destacan por su relación con VDAC y con las translocasas de proteínas mitocondriales, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) y el supercomplejo citocromo *bc₁* – COX. Aunque la identidad molecular de todos los componentes del MPTP permanece sin poder ser determinada, se cree que VDAC – ANT forman el canal de un complejo integrado también por el receptor mitocondrial para las benzodiazepinas, la creatina cinasa o hexocinasa y la ciclofilina D (CypD) (McEnery 1992, Beutner, Ruck et al. 1996, Beutner, Rück et al. 1998, Crompton, Virji et al. 1998, Marzo, Brenner et al. 1998). En el segundo caso, descubierto más recientemente, se ha establecido que ANT interacciona con una subpoblación del supercomplejo citocromo *bc₁* – COX – TIM23 (van der Laan, Wiedemann et al. 2006, Mick, Wagner et al. 2007, Wiedemann, van der Laan et al. 2007, Dienhart and Stuart 2008).

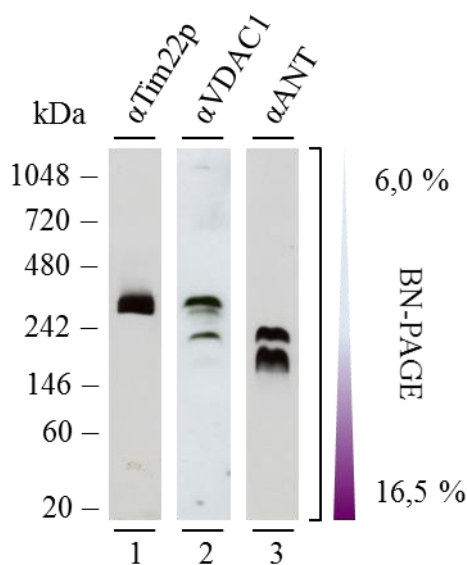
La primera estrategia seguida para analizar la posible relación estructural entre ANT y la translocasa TIM22, consiste en la realización de electroforesis en condiciones nativas de mitocondrias aisladas de las líneas celulares portadoras de mutaciones en el componente principal de la translocasas TIM23, la proteína Tim23p. La elección de mitocondrias que carecen de Tim23p en esta primera aproximación se basa en los resultados obtenidos previamente, en los que se establece que esta estirpe, a pesar de eliminar completamente a Tim23p, no modifica la biogénesis de TIM22, figura 28, calle 8. De ahí que teniendo en cuenta también, los descubrimientos en los que se pone de manifiesto la existencia de interacciones entre ANT y TIM23, se haya decidido utilizar esta estirpe.

La figura 53 muestra todas las especies moleculares en las que Tim22p, VDAC1 y ANT se encuentran presentes en las BN-PAGE de mitocondrias de la estirpe ↓Tim23p, lo que permite determinar el grado de colocalización de estas proteínas en su estado nativo. Se observa cómo la integridad de la translocasa TIM22 está definida por dos bandas en la región próxima a los 300 kDa (calle 1). Por su parte y de acuerdo con lo esperado, la inmunodetección con α VDAC1 da una serie de bandas de masas moleculares comprendidos entre 400 y 120 kDa (calle 2). Los resultados descritos en apartados previos han permitido relacionar las dos estructuras de mayor masa molecular con la translocasa TIM22. La tercera banda se encuentra a unos 240 kDa, y completa las tres formas

moleculares de VDAC descritas en la bibliografía (Krimmer, Rapaport et al. 2001). No obstante, he observado también dos señales más, que migran junto a los marcadores de 200 y 120 kDa respectivamente. En la figura, también se han analizado las formas moleculares en las que ANT se encuentra presente en estas mitocondrias. Se observa cómo ANT se integra en dos complejos, definidos por la presencia de dos bandas que se corresponden con las masas moleculares aproximados de 200 y 120 kDa (calle 3). Esta primera banda de 200 kDa parece comigrar junto con la señal de la misma masa molecular de VDAC1. Por el contrario, las estructuras nativas de ANT y TIM22 están muy alejadas y permiten descartar cualquier interacción entre la proteína integral de TIM22 y el intercambiador de nucleótidos ADP/ATP.

Figura 53. Estructuras nativas de la translocasa TIM22, VDAC1 y ANT

Extractos mitocondriales de la cepa \downarrow Tim23p se han sometido a electroforesis en condiciones nativas, en gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad de proteína total cargada por pocillo ha sido



de 5 μ g. La inmunodetección de Tim22p (1), VDAC1 (2) y ANT (3) se ha realizado con el anticuerpo específico frente a estas proteínas en dilución 1:5000, 1:10000 y 1:8000 respectivamente.

Se ha estudiado también la existencia o no de interacciones entre Tim22p, VDAC1 y ANT, esta vez mediante aproximaciones de co-inmuprecipitación, en mitocondrias de la estirpe control (CDD38). Con este fin, se han realizado extracciones de proteínas de

estas mitocondrias con un 0,5% de digitonina y este extracto se ha enfrentado a los anticuerpos α Tim22p, α VDAC1 y α Tim23p, previamente inmovilizados.

En la figura 54 se han recogido los resultados de las inmunodetecciones con los anticuerpos: α Tim22p, α Tim23p, α VDAC1 y α ANT, para las tres co-inmunoprecipitaciones anteriores. Las tres primeras inmunodetecciones permiten corroborar que el proceso de co-inmunoprecipitación de los lisados mitocondriales ha transcurrido de forma adecuada y según lo esperado (Figura 54 A. B. y C.). Así, en el análisis de inmunodetección con el anticuerpo α Tim22p en la figura 54.A., la primera calle se destina al control, que en este caso corresponde a una muestra de mitocondrias intactas de la estirpe control. En ella se puede detectar la señal perteneciente a Tim22p migrando en paralelo al marcador de 22 kDa. Por su parte, en las calles 2 a 4, en las que directamente se ha cargado el resultado de las co-inmunoprecipitaciones con cada uno de los tres anticuerpos, se observan las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo α Tim22p. Además en las calles 2 y 3, correspondientes a las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p y α VDAC1 respectivamente, se ponen de manifiesto la presencia de la proteína Tim22p. La ausencia de Tim22p en la calle 4 corrobora una vez más la especificidad de la interacción entre TIM22 y VDAC1 y la ausencia de interacción entre TIM23 y VDAC.

Una vez más y a fin de excluir la posibilidad de que la ausencia de señal de Tim22p en la co-inmunoprecipitación realizada con α Tim23p (calle 4), sea consecuencia de un deficiente proceso de co-inmunoprecipitación, las muestras se han sometido de forma paralela a inmunodetección con α Tim23p (Figura 54. B.). Siguiendo el procedimiento habitual la primera calle corresponde al control con mitocondrias intactas, para determinar la altura a la que se detecta la señal de Tim23p. Las 3 calles siguientes corresponden a las 3 co-inmunoprecipitaciones. Como en el caso anterior se observan las bandas correspondientes a las respectivas cadenas ligera y pesada de los anticuerpos.

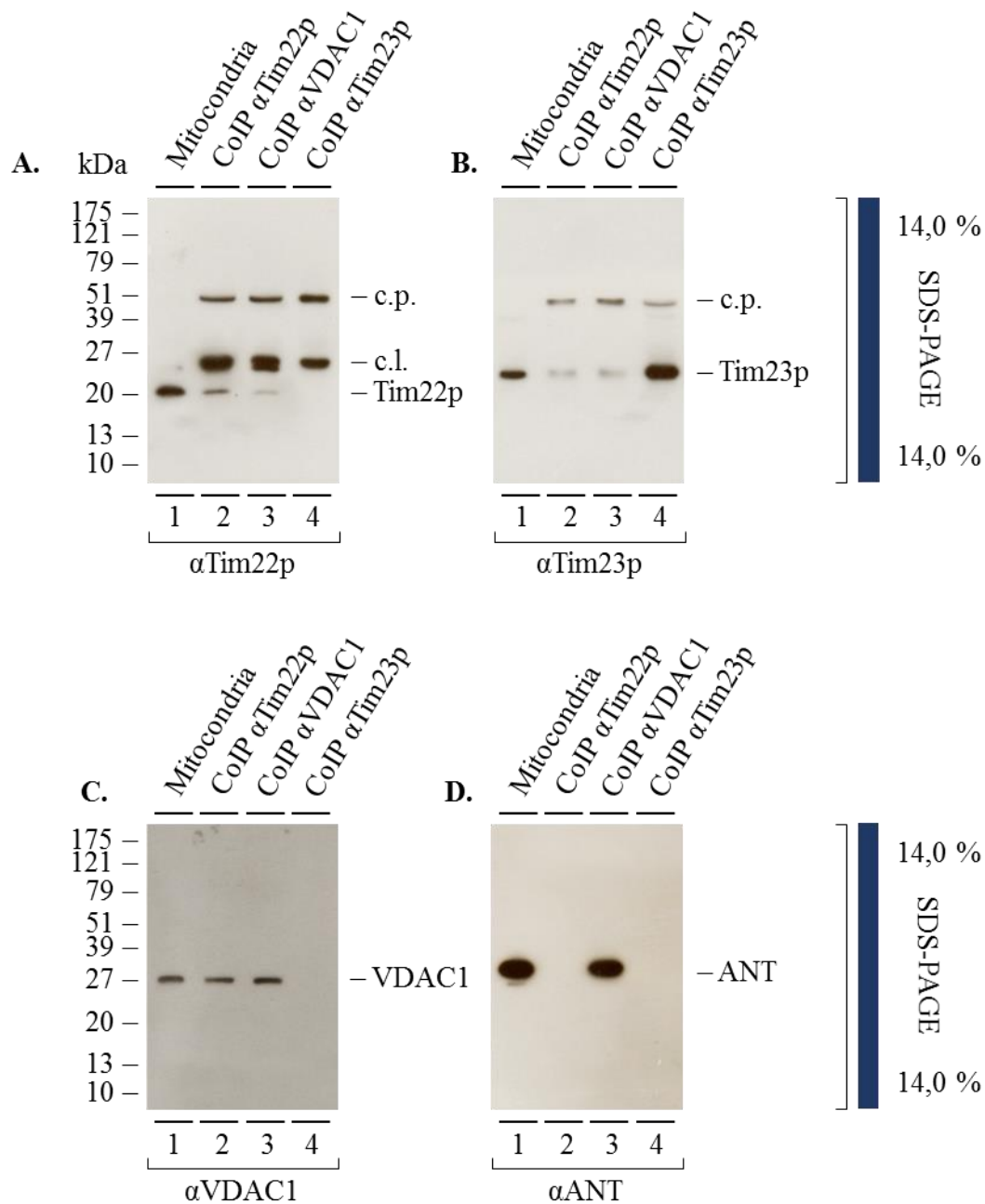


Figura 54. Co-inmuprecipitación de la proteína ANT con los anticuerpos frente a Tim22, VDAC1 y Tim23p

Mitocondrias de la estirpe control (CDD38) previamente lisadas con un 0,5% de digitonina se han sometido a la co-inmuprecipitación con las anticuerpos específicos frente a Tim22p, VDAC1 y Tim23p. Las proteínas se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en un gel en gradiente del 6 al 20% de poliacrilamida. Posteriormente se ha realizado la inmunodetección de Tim22p, Tim23p, VDAC1 y ANT. En todos los experimentos se ha cargado 0,125 μ g de mitocondrias de la estirpe control en la calle 1 y en las siguientes calles el 25% del producto de co-inmuprecipitación. Cada experimento se ha realizado en un gel distinto.

Una vez corroborado el correcto proceso de coprecipitación con los tres anticuerpos, la siguiente pregunta es conocer si en estas mismas condiciones se encuentra también ANT. Para ello basta con reproducir el experimento anterior, con la diferencia de que el anticuerpo utilizado en el revelado de los Western sea α ANT.

Los estudios realizados con este anticuerpo se muestran en la figura 54. D, en la que, como resultado de la co-inmunoprecipitación con α VDAC1, se ha detectado una banda a la altura de 30 kDa, correspondiente a la proteína ANT (calle 3). Cabe inferir que esta señal se corresponde con una asociación entre VDAC1 y ANT; la cual ya ha sido descrita previamente, y en la que ambas proteínas forman parte del denominado poro de transición de permeabilidad de mitocondrias (MPTP) (McEnery 1992, Beutner, Ruck et al. 1996, Beutner, Rück et al. 1998, Crompton, Virji et al. 1998, Marzo, Brenner et al. 1998). Por otra parte las co-inmunoprecipitaciones con α Tim22p y α Tim23p no han revelado la señal perteneciente a ANT (calle 2 y 4).

La siguiente cuestión a analizar es si en estas mismas condiciones, componentes del espacio intermembrana como Tim10p, se localizan también junto a las translocasas TIM22 y TIM23 y/o junto a VDAC1.

Hasta el momento se ha descrito que Tim10p junto a Tim9p conforman uno de los complejos de chaperoninas denominados Tim pequeños del espacio intermembrana. Una vez que una proteína en tránsito hacia la mitocondria rebasa la membrana externa mediante TOM, en lado del IMS las preproteínas son capturadas por este pequeño complejo Tim9p-Tim10p (Koehler, Merchant et al. 1998, Sirrenberg, Endres et al. 1998, Endres, Neupert et al. 1999, Luciano, Vial et al. 2001, Truscott, Wiedemann et al. 2002). Esta unión protege a las proteínas en tránsito de la agregación en el medio acuoso del IMS (Curran, Leuenberger et al. 2002). De esta forma la proteína asociada a este complejo puede ser conducida hasta los complejos SAM o TIM22, en función de que su destino final sea la membrana externa o interna respectivamente.

El núcleo del complejo TIM22 embebido en la membrana interna se compone de Tim22p, Tim18p, Tim54p y Sdh3 (Sirrenberg, Bauer et al. 1996, Kerscher, Holder et al. 1997, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000, Kovermann, Truscott et al. 2002, Rehling, Model et al. 2003, Gebert, Gebert et al. 2011). Este complejo está

asociado a la proteína Tim12p, que media en la posterior inmovilización del intermediario desde el IMS a TIM22, de forma que Tim10p se puede encontrar también asociado a la translocasa TIM22.

La aproximación más inmediata para determinar las asociaciones moleculares entre las maquinarias de TIM22, TIM23 y VDAC1 con la proteína del IMS Tim10p consiste en la co-inmunoprecipitación de lisados obtenidos de la estirpe control con los distintos anticuerpos, seguidos de la inmunodetección con el anticuerpo contra Tim10p. Este análisis se muestra en la figura 55.

En las calles 2 y 4 se pone de manifiesto que en la mitocondrias control y en mis condiciones de estudio, tanto Tim22p como VDAC1 se encuentran interaccionando con Tim10p, no así Tim23p. A su vez, se comprueba la naturaleza policlonal del anticuerpo α Tim10p, por el momento no disponible de forma comercial, que se resuelve en más de una señal (calle 1), además de la esperada a la altura de 10 kDa. posiblemente resultado de uniones inespecíficas. Es significativo que estas bandas desaparecen en las muestras resultado de una co-inmunoprecipitación (calles 2 – 4), lo que confirma la especificidad del proceso.

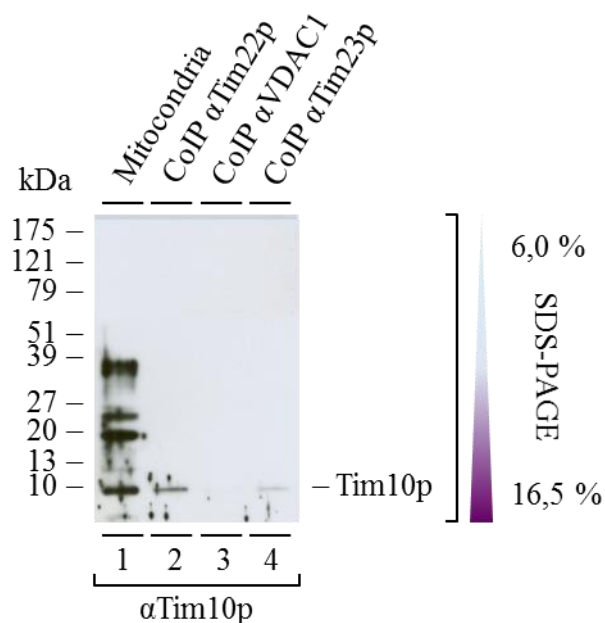


Figura 55. Co-inmuprecipitación de *Tim10p* con los anticuerpos frente a las proteínas *Tim22*, *VDAC1* y *Tim23p*

Los lisados de la estirpe control se han sometido a la co-inmunoprecipitación con los anticuerpos frente a *Tim22p*, *VDAC1* y *Tim23p*, separando mediante SDS-PAGE, en un gel en gradiente de concentración del 6 al 20%, las proteínas. La inmunodetección de *Tim10p* se ha realizado con el anticuerpo policlonal frente a esta proteína en dilución 1:4000, usando como secundario el anticuerpo α Rabbit en 1:5000. Por cada co-inmunoprecipitación se ha cargado todo el producto de coprecipitación, mientras que en la calle que contiene las mitocondrias se han cargado 0,25 μ g de proteínas de la estirpe control.

Por su parte, la calle 3 correspondiente al resultado de las co-inmunoprecipitaciones con α *Tim23p*, pone de manifiesto que la proteína *Tim10p* no está asociada a *Tim23p*, ya que su antisero no es capaz arrastrarla durante el proceso.

Comprobado que en mis condiciones de trabajo uno de los dos componentes principales de las translocasas de membrana interna mitocondrial, *Tim22p*, se encuentran interaccionando físicamente con *Tim10p*, proteína de IMS, al igual que sucede con la proteína *VDAC1* de la membrana externa, la pregunta que surge ahora es si en estas mismas condiciones es posible detectar también si la existencia de una interacción entre las translocasas TOM de membrana externa y *TIM22* de membrana interna. Hasta el momento esta interacción, que favorecería y explicaría la colaboración funcional de

ambas translocasas en la inserción de proteínas de la membrana interna, no ha podido ser comprobada por otros autores.

Para ello, se han llevado a cabo varias aproximaciones. La primera consiste en la electroforesis bidimensional de un lisado de mitocondrias aisladas de cepa control, disgregadas con un 0,5% de digitonina y sometidas a BN-PAGE en la primera dimensión y a SDS-PAGE en la segunda. La identidad de las señales obtenidas tras estos procesos se ha revelado con los anticuerpos representativos de las dos translocasas: α Tim22p y α Tom40p respectivamente.

Tras la doble dimensión el anticuerpo α Tim22p se resuelve en una banda a una altura cercana a los 300 kDa en la BN-PAGE (Figura 56. A.), que presenta la misma asimetría alargada que también se ha descrito en el apartado 4.3.2 y que al igual que ese caso, en ocasiones tampoco llega a resolverse completamente en dos complejos distintos (Figura 36).

Por su parte, en la figura 56. B. los resultados tras la inmunodetección con α Tom40p, ponen de manifiesto que esta proteína está presente en dos grandes complejos bien definidos. No obstante, el primero de ellos se resuelve en una banda alargada, que en BN-PAGE se extiende entre los 480-300 kDa, mientras que el segundo complejo centrado alrededor de los 150 kDa.

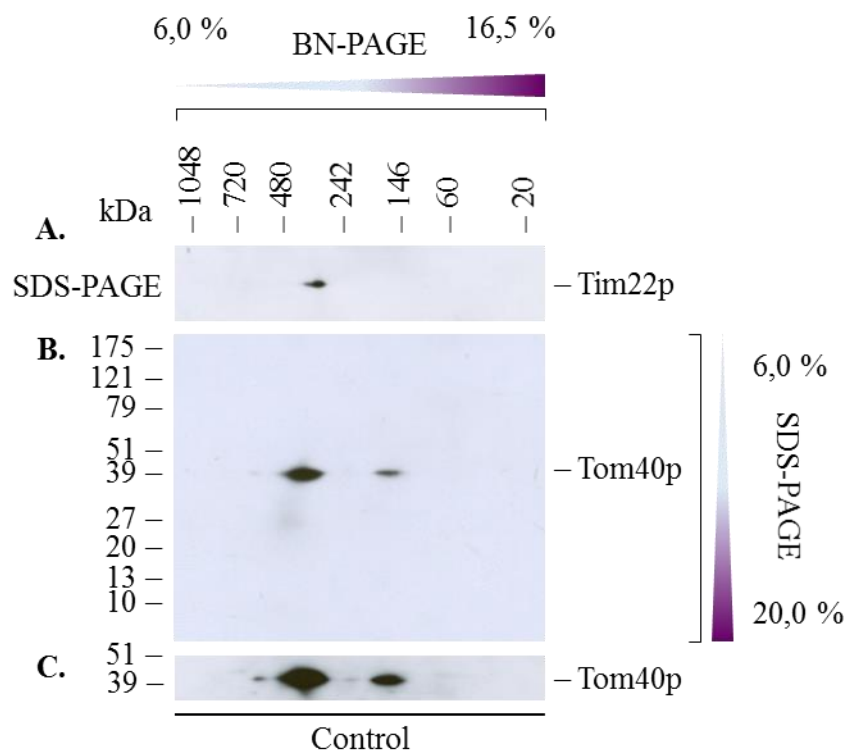


Figura 56. Electroforesis bidimensional de las estructuras nativas de TOM y Tim22p

10 μ g de lisados de mitocondrias de la estirpe control, obtenidos con un 0,5% de digitonina, se han sometido a electroforesis bidimensional BN-PAGE/SDS-PAGE. Una vez se han separado las estructuras moleculares en BN-PAGE, estas se han resuelto en una segunda electroforesis, SDS-PAGE. **A.** La inmunodetección de las estructuras nativas en las que se encuentra presente Tim22p inmunodetectadas con α Tim22p. **B.** Detección de las formas moleculares de TOM con α Tom40p (1:5000). **C.** Finalmente, se muestran las señales de Tom40p tras una exposición más prolongada.

En la figura 56. C. se observa cómo exposiciones prolongadas del inmunoblotting con α Tom40p revelan además la presencia de otras dos señales de menor intensidad. La primera de ellas migra a una altura cercana a los 550 kDa mientras que la segunda se encuentra comprendida entre las dos señales mayoritarias, aproximadamente a unos 250 kDa.

Mediante densitometría de barrido se han resuelto las bandas detectadas en los perfiles densitométricos de cada uno de estos Westerns. La figura 57 muestra la superposición de los perfiles pertenecientes a Tom40p y Tim22p en estado nativo, lo que permite colocalizar las diferentes proteínas dentro de cada complejo nativo. Se observa cómo en la franja de masas moleculares comprendidos entre los 300 y 350 kDa, las señales de Tom40p y Tim22p claramente se solapan, si bien los picos máximos de ambas no coinciden. Por su parte la señal de Tom40p con menor masa molecular se resuelve en un único pico sin correlación aparente con Tim22p en esta zona.

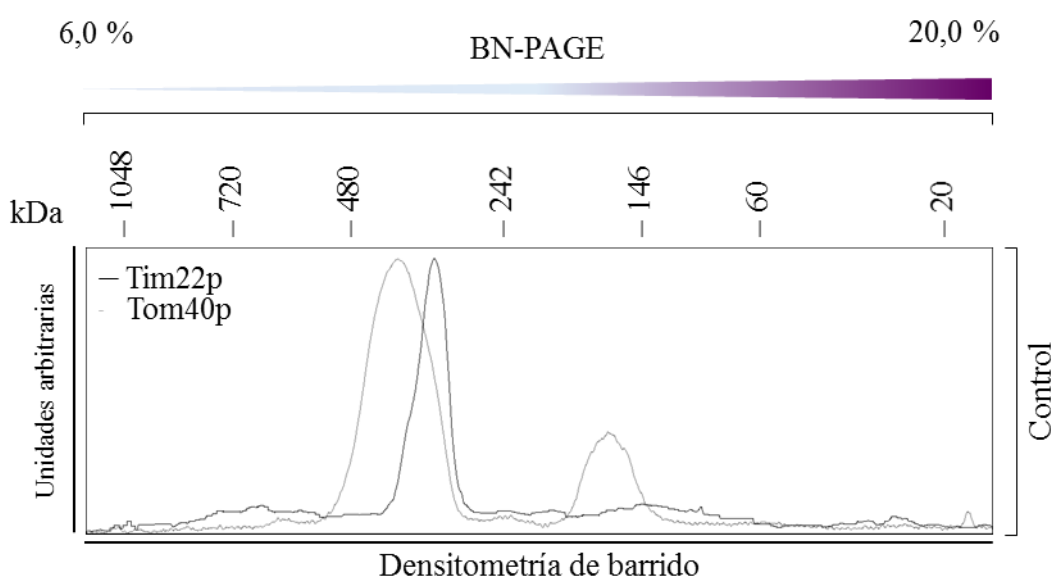


Figura 57. Diagrama de barrido y superposición de las estructuras nativas de Tom40p y Tim22p

Los datos experimentales que se han obtenido mediante electroforesis bidireccional de la estirpe control para los anticuerpos frente a Tom40p y Tim22p se han sometido a análisis de densitometría de barrido con ayuda del software informático ImageJ 1.33u, NIH, EEUU, analizando la totalidad del gel de electroforesis. Posteriormente estos valores se han superpuesto con el editor de imagen Adobe Photoshop CS5. Las estructuras en las que se encuentra presente Tim22p se han representado por una línea de color negro, mientras que en las que se encuentra presente Tom40p se han representado en color gris.

Estos resultados apuntan a la posible existencia de una interacción física entre Tom40p y Tim22p y por ende de sus respectivas translocasas.

Para poder ratificar estos resultados, un extracto mitocondrial obtenido de forma idéntica al utilizado en la experiencia anterior, se ha sometido a la co-inmunoprecipitación

con los anticuerpos para Tim22p, VDAC1 y Tim23p; separando a continuación las proteínas adheridas mediante SDS-PAGE, y revelando los correspondientes Westerns con α Tom20p y α Tom40p, componentes ambos del complejo TOM. Como control se ha analizado simultáneamente una muestra de mitocondrias de la estirpe control sin tratar. En las calles 2 – 4 de la figura 58. A. y B. se pone de manifiesto que en mis condiciones de estudio, tanto Tom20p como Tom40p se encuentran interaccionando además de con Tim23p, interacción ya descrita en la literatura (Jensen and Johnson 2001, Neupert and Brunner 2002, Endo, Yamamoto et al. 2003, Koehler 2004, Rehling, Brandner et al. 2004, Dolezal, Likic et al. 2006), también con VDAC1 y con Tim22p.

Estos resultados permiten identificar por primera vez, la existencia de una interacción entre las translocasas TIM22 y TOM, algo que hasta la fecha ha sido objeto de numeros e infructuosos estudios.

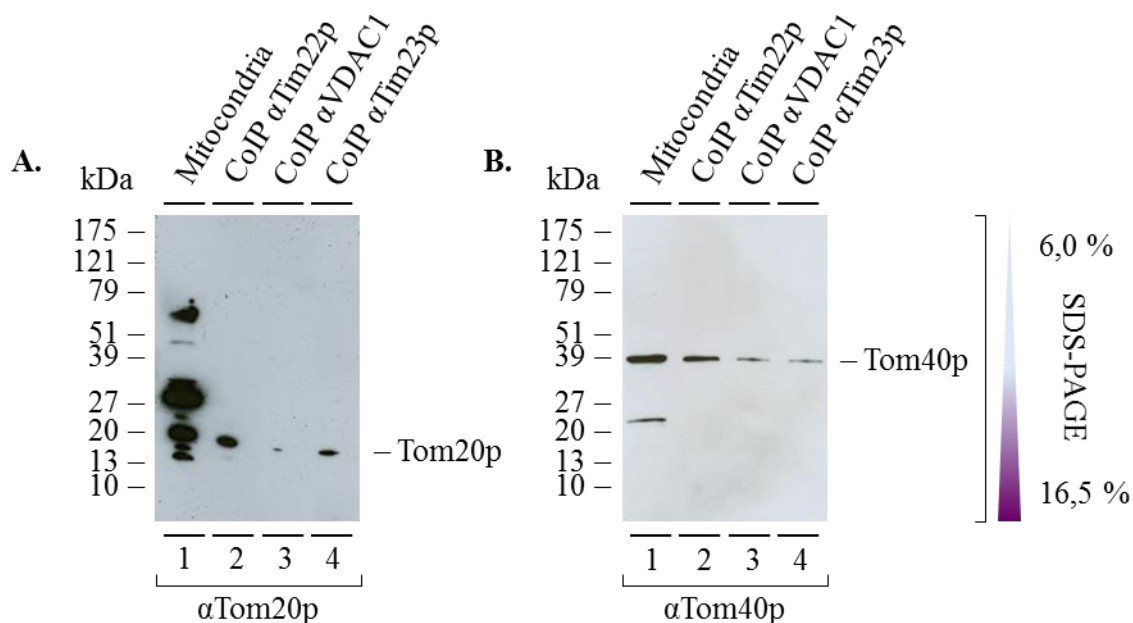


Figura 58. Co-inmuprecipitación de las proteínas Tom40p y Tom20p junto a las proteínas Tim22p, Tim23p y VDAC1

Lisados de mitocondrias de la estirpe control utilizando un 0,5% de digitonina se han sometido a co-inmunoprecipitación con los anticuerpos α Tim22p, α VDAC1 y α Tim23p. Las proteínas se han separado mediante electroforesis SDS-PAGE, en un gel en gradiente del 6 al 20%. La inmunodetección de Tom20p (A.) y Tom40p (B.) se ha realizado con el anticuerpo específico frente a estas proteínas en dilución 1:8000, incubando la membrana durante 12 horas (toda la noche) a 4 °C. Como secundario se ha utilizado el anticuerpo α Rabbit en dilución 1:5000, durante hora y media a temperatura ambiente.

4.5.Efecto de la eliminación de Tim54p sobre la estructura de TIM22

Estudios previos llevados a cabo en el nuestro y en otros laboratorios, han puesto de manifiesto que Tim22p es el componente nuclear de la translocasa TIM22, al formar parte del canal de la misma (Kovermann, Truscott et al. 2002, Peixoto, Graña et al. 2007). Sin embargo, los estudios funcionales obtenidos también en nuestro laboratorio, mediante aproximaciones de patch-clamp en mitocondrias de diversas líneas celulares, que como en el presente trabajo, son portadoras de mutaciones en uno o varios de los componentes de TIM22, me permiten concluir la existencia de una significativa correlación entre la frecuencia de apertura del canal de TIM22 y el grado de expresión del tándem formado por las proteínas Tim22p/Tim18p. De tal manera que la disminución de uno cualquiera de estos dos componentes, va acompañada de una disminución idéntica en la frecuencia

de apertura del canal de la translocasa (Datos no publicados). La pregunta que surge entonces es, cuál es el papel concreto que Tim18p desempeña dentro del complejo TIM22 y más concretamente, si su imprescindible presencia para el funcionamiento del canal tiene su base en que forma parte estructural del mismo. Para abordar esta pregunta, y teniendo en cuenta también, que el papel individual asignado a Tim54p es el de ensamblar el conjunto de la translocasa (Wagner, Gebert et al. 2008) y que su presencia o ausencia no alteran el funcionamiento del canal de TIM22 (datos no publicados), he optado por analizar con más profundidad, las consecuencias estructurales de la eliminación de Tim54p sobre la biogénesis de TIM22.

4.5.1. Caracterización de las estirpes mutantes en Tim54p

Para estudiar los posibles efectos que sobre la formación del canal pudiera tener la eliminación de Tim54p, se han utilizado lisados mitocondriales de tres líneas celulares (más una control), que de acuerdo con la caracterización que he realizado en el apartado 3.1., carecen totalmente o presentan muy disminuida la expresión de Tim54p. En concreto se ha utilizado las estirpes Δ Tim54p, Δ Tim54p \uparrow Tim22p.

En la Figura 59 comprobamos que tanto las mitocondrias de Δ Tim54p \uparrow Tim22p y Δ Tim54p, carecen Tim54p, a pesar de que en la células de Δ Tim54p \uparrow Tim22p, la ausencia de Tim54p se ve acompañada por un gran incremento, superior al 500%, de Tim22p. La ventaja adicional de estas dos líneas celulares es que la expresión de Tim18p no es la misma en ambas. Así, mientras que Tim18p se encuentra en niveles algo superiores a los del control, la estirpe Δ Tim54p experimenta una fuerte reducción en Tim18p (Figura 59., calles 4 – 9). Una circunstancia diferente, pero igualmente útil para mi propósito, deriva de la estirpe Δ Tim18p, en la que el único componente alterado es Tim18p (calles 10 – 12). Como control de carga en esta caracterización proteica, se ha empleado VDAC1.

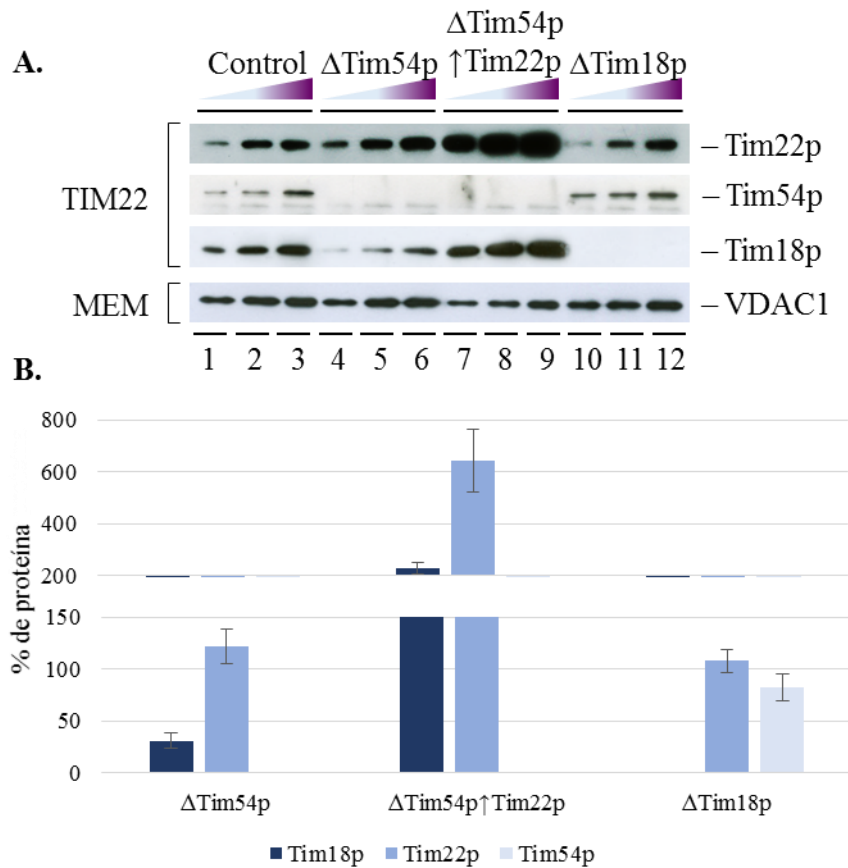


Figura 59. Composición proteica de la translocasa TIM22 en las estirpes mutantes en Tim54p

A. Lisados mitocondriales de las estirpes control, así como de las procedentes de levaduras genéticamente transformadas: Δ Tim54p, Δ Tim54p \uparrow Tim22p y Δ Tim18p, se han separado mediante SDS-PAGE y sometidas a análisis de Western blot específico para los anticuerpos frente a las proteínas integrales del complejo TIM22, usando como control de carga la proteína VDAC1. Las cantidades de proteína que se han cargado por cada muestra oscilan entre 0,5 y 7,0 μ g de proteína total, en función del nivel de expresión de VDAC1. **B.** La representación gráfica de la cuantificación de la expresión de las proteínas a estudio, se ha realizado mediante diagramas de barras, expresando los resultados en porcentaje. Los valores se han obtenido son el resultado del análisis densitométrico de las bandas proteicas representadas en los blots, mediante el software informático ImageJ 1.33e, HIH, EEUU, expresando los valores en función de la estirpe control y de la cantidad de proteína total de VDAC1. Los valores de la concentración de proteínas de las barras cuadrículadas del gráfico se extrapolan en el eje secundario (derecha).

En los histogramas de la Figura 59.B. se recogen todos estos resultados comparados con los de las mitocondrias control de las células CDD38.

4.5.2. Efecto sobre la estructura nativa

En la figura 60 se ha analizado el efecto de la eliminación de Tim54p y Tim18p sobre la translocasa TIM22. La integridad del complejo se mantiene solo cuando los tres componentes integrales de TIM22 se encuentran presentes simultáneamente (calle 1) corroborando los resultados obtenidos (Figura 28). En consecuencia cualquier disminución significativa del nivel de expresión de una de estas dos subunidades, impide la correcta biogénesis del complejo TIM22. Asimismo, como se ha observado en apartados anteriores, la sobre expresión de la proteína Tim22p (calle 3), inherente a la línea Δ Tim54 \uparrow Tim22, no se ve acompañada por un incremento en la señal del complejo, sino que esta señal se difumina y arrastra hasta el nivel del marcador de aproximadamente 100 kDa.

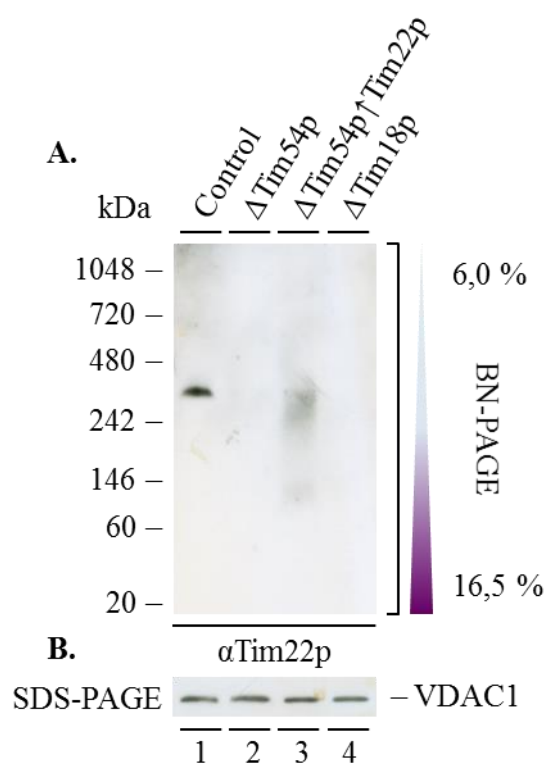


Figura 60. Efecto de las alteraciones en el nivel de expresión de Tim18p y Tim54p sobre la biogénesis de TIM22

A. Extractos mitocondriales de las estirpes mutantes en las proteínas Tim18p y Tim54p, se han obtenido con un 0,5% de digitonina, y sometido a electroforesis BN-PAGE en un gel de poliacrilamida en gradiente del 6 al 16,5%. La cantidad total de proteínas que se ha cargado por pocillo oscila entre 3 y 9 μ g, en función del nivel de expresión de VDAC1, previamente determinado mediante electroforesis SDS-PAGE (**B.**).

Resulta relevante comprobar que Tim22p, presente en todos estos extractos mitocondriales, tal y como se desprende de la figura 60, no se haya podido detectar en BN-PAGE en todas las líneas celulares (Figura 60., calles 2 y 4), lo que está en consonancia con los resultados obtenidos en el apartado 4.1., en los que se demuestra que la integridad de la translocasa TIM22 depende de la presencia simultánea de las 3 proteínas integrales de la translocasa: Tim18p, Tim22p y Tim54p.

4.5.3. Estudios de electroforesis bidireccional e inmunodetección

A continuación es necesario comprobar cuál es la distribución de la proteína Tim18p en condiciones no desnaturalizantes, en las estirpes Δ Tim54p y Δ Tim54p \uparrow Tim22p. Para ello, se han realizado electroforesis bidireccionales con extractos mitocondriales de ambas líneas, además de la cepa control. La ventaja adicional de este tipo de electroforesis es que permite resolver las señales de baja masa molecular, que en ocasiones y por limitaciones técnicas, las BN-PAGE no consiguen revelar. Esta limitación técnica es consecuencia del empleo del reactivo G-250 utilizado en las BN-PAGE. Este reactivo, de intenso color azul, se acumula de forma especial en la parte inferior del gel y se transfiere junto con las proteínas más pequeñas a la membrana de PVDF; de tal forma que enmascara la visualización de estas proteínas tras el revelado.

En la figura 61 se han analizado mediante Western blots con los anticuerpos frente a Tim22p, Tim18p y Tim54p, las electroforesis bidireccionales de los extractos mitocondriales de las cepas: control, Δ Tim54p y Δ Tim54p \uparrow Tim22p. En la estirpe control se resuelve una única banda a una altura cercana a los 300 kDa. No obstante, la asimetría que caracteriza a esta señal es indicativa de su probable heterogeneidad; lo que estaría de acuerdo con las dos bandas muy próximas entre sí que identifican la estructura nativa de TIM22 y que no siempre se consigue separar completamente en las BN-PAGE.

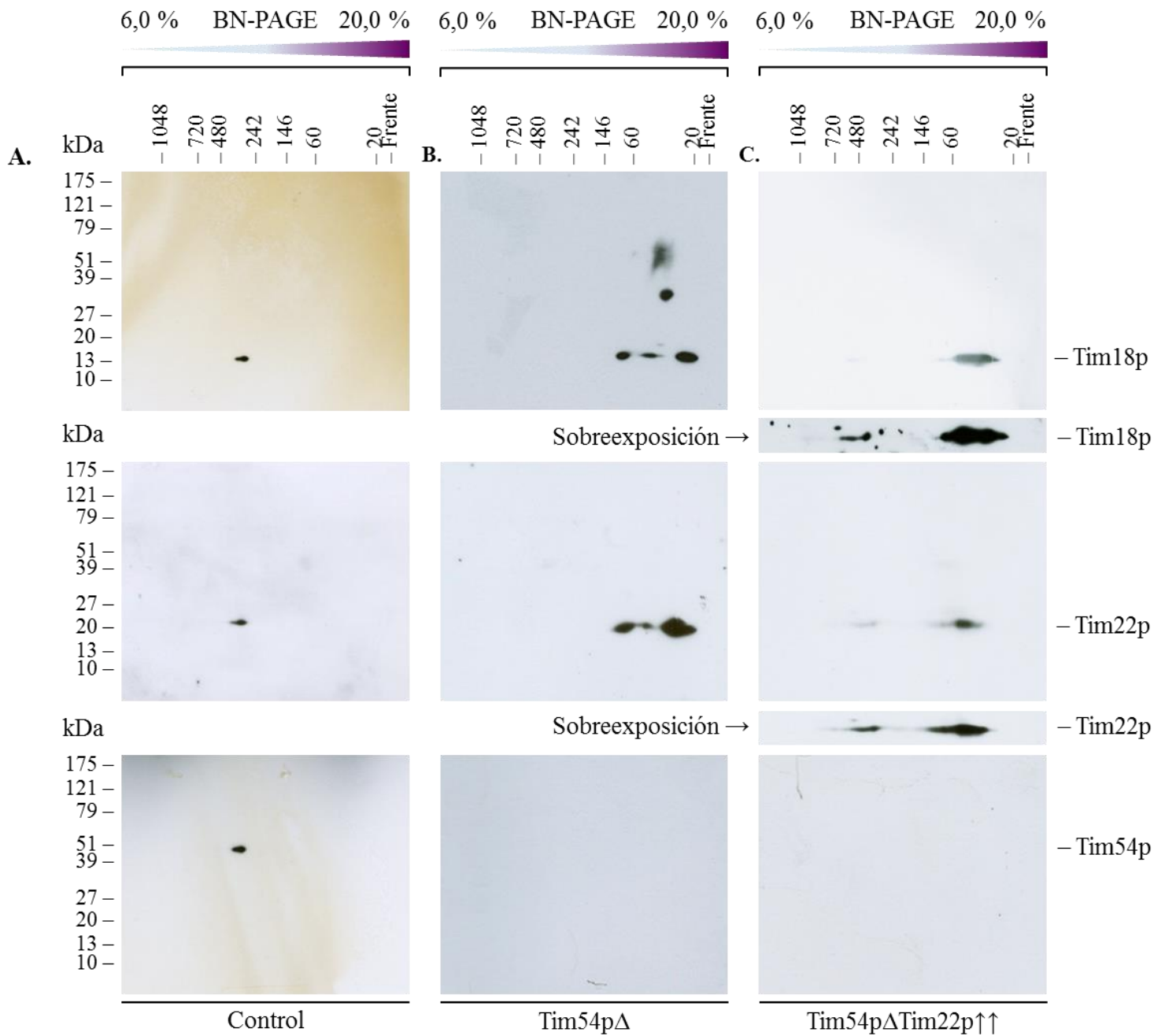


Figura 61. Electroforesis bidireccional de TIM22 de mitocondrias de estirpes mutantes en Tim54p

Lisados mitocondriales de las estirpes mutantes en Tim54p, así como de la cepa control, se han sometido a electroforesis bidireccional. Para ello, 20 µg de proteína de cada estirpe se han sometido a electroforesis en condiciones BN-PAGE y a continuación se han separado las estructuras nativas por SDS-PAGE. Las electroforesis bidimensionales para la estirpe: control **A.**, Δ Tim54p **B.** y Δ Tim54p \uparrow Tim22p **C.** se han sometido a inmunodetección con los anticuerpos α Tim18p, α Tim22p y α Tim54p. Los recuadros más pequeños son el resultado de la sobreexposición durante el revelado de las muestras correspondientes.

Por su parte y como es de esperar en estirpe Δ Tim54p, la inmunodetección con α Tim54p no desvela ninguna señal correspondiente a esta proteína, figura 61.C, a diferencia de lo que se observa con los anticuerpos Tim22p y Tim18p (Figura A. y B.). En estas electroforesis bidimensional se han diferenciado tres formas moleculares de Tim22p y Tim18p, de las cuales, las dos primeras (de izquierda a derecha) parecen comigrar. Si bien, la señal de menor masa molecular en ambos casos no parece coincidir.

El efecto sobre la distribución de Tim22p y de Tim18p, tras la delección de la proteína Tim54p y la sobre expresión subordinada de Tim22p en la estirpe Δ Tim54p \uparrow Tim22p se traduce en dos señales de Tim22p. La primera de ellas (de izquierda a derecha) solo es claramente detectable tras la sobreexposición del film, y se ha localizado a una altura entre los 400 y los 300 kDa en BN-PAGE. Esta señal se encuentra próxima a la altura del complejo nativo de TIM22. Por otro lado, a una altura entre los 120 y 30 kDa se detecta una segunda señal mucho más intensa y asimétrica, que no llega a desdoblarse en complejos discretos. En cuanto a la inmunodetección de Tim18p, se encuentra asociada a una señal que parte de los 120 y llega hasta los 20 kDa. La mayor parte de esta banda se solapa así con la señal equivalente de Tim22p. La sobreexposición de estas mismas membranas permite intuir una señal muy débil de Tim18p en torno a los 400 – 300 kDa. Estos resultados indican que Tim22p y Tim18p son capaces de comigrar, incluso en condiciones en las que el complejo nativo de TIM22 se encuentra desensamblado.

Mediante densitometría de barrido se han establecido los perfiles densitométricos que permiten resolver el grado de colocación de las señales detectadas en estos experimentos.

Así, en la figura 62.A. se ha observado como en la franja de masas moleculares comprendidos entre 400 y 300 kDa, para la densitometría de barrido de las tres proteínas integrales de la translocasa TIM22, la banda asimétrica que previamente se han identificado para los tres anticuerpos, no llega a separarse en dos picos. Si bien, la superposición de estos perfiles electroforéticos permite colocalizar a las tres proteínas en la región comprendida entre los 400 y 300 kDa, formando parte del complejo TIM22.

La figura 62.B. muestra el perfil densitométrico obtenido del análisis del western para α Tim22p y α Tim18p, en el que se han detectado en la franja de masas moleculares entre 120 y 20 kDa, tres picos simétricos. De estos, las dos primeras formas moleculares (de izquierda a derecha) parecen encontrarse a la misma altura, presentando incluso el mismo perfil de simetría las señales de ambas proteínas.

Finalmente, la figura 62.C. representa los perfiles densitométricos de las proteínas Tim22p (representada en color negro) y Tim18p (representada en color azul) de la línea celular Δ Tim54p \uparrow Tim22p. Las inmunodetecciones que previamente se han realizado con los anticuerpo α Tim22p y α Tim18p resuelve dos bandas de masas moleculares comprendidos entre 350 y 60 kDa (Figura 62.B.). La densitometría de barrido distingue cinco formas moleculares de estas proteínas en las que parecen comigrar.

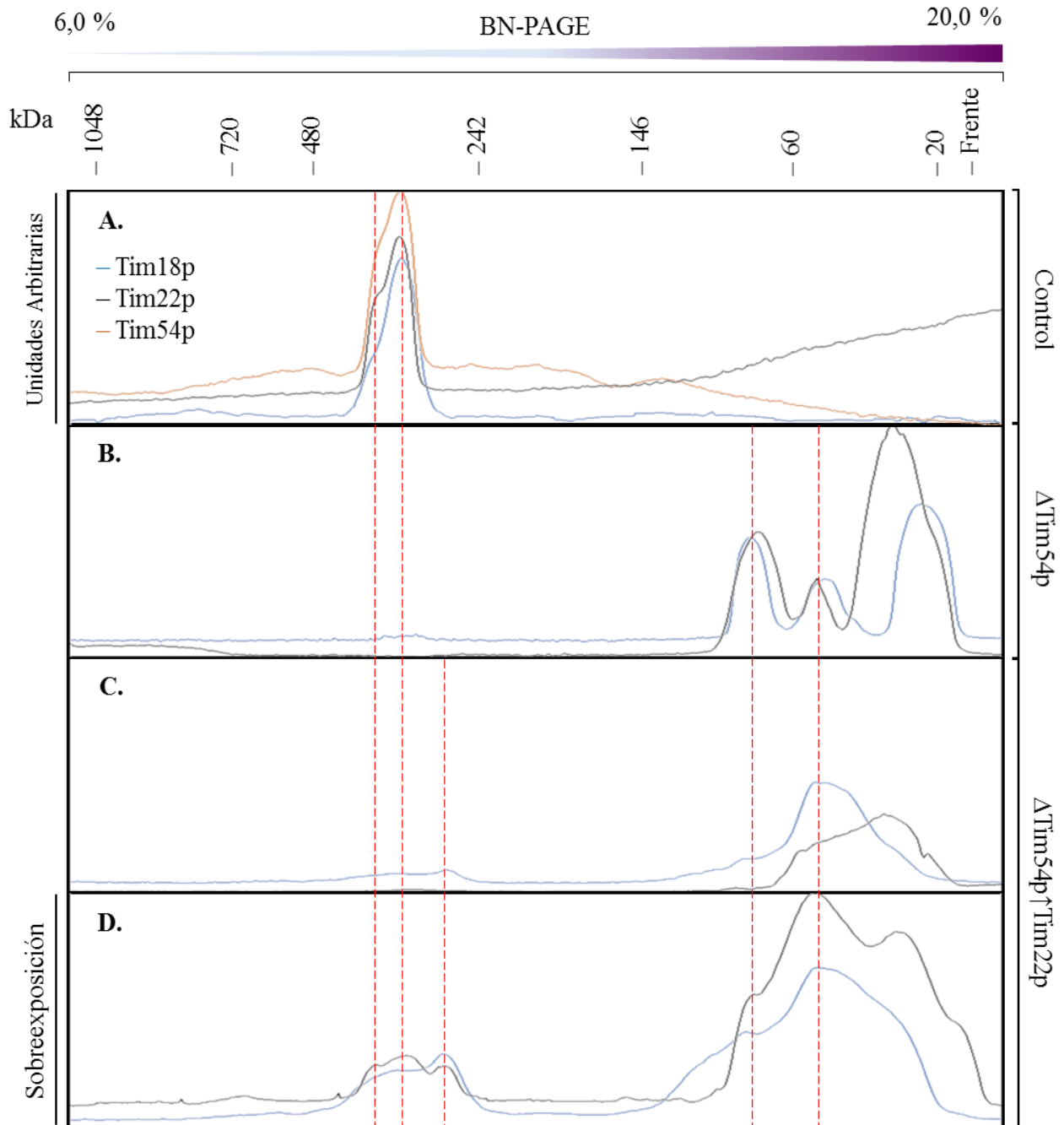


Figura 62. Diagrama de barrido con superposición de los complejos nativos que contienen Tim22p y Tim18p en mitocondrias mutantes en Tim54p

Los datos experimentales obtenidos por electroforesis bidireccional de los lisados mitocondriales de las estirpes: control (A) y deficientes en Tim54p: Δ Tim54p (B), y Δ Tim54p \uparrow Tim22p (C); se han sometido a densitometría de barrido con ayuda del software informático ImageJ 1.33u, NIH, EEUU. Posteriormente estos valores se han superpuesto con el editor de imagen Adobe Photoshop CS5. Las estructuras de Tim22p se han representado por una línea de color negro, las de Tim54p en color naranja, y las de Tim18p en color gris azul. Para hacer más evidentes la presencia de formas moleculares de elevada masa molecular en la estirpe Δ Tim54p \uparrow Tim22p, se ha representado la densitometría de barrido de las señales pertenecientes a Tim22p y Tim18p tras una sobreexposición (D.).

4.5.4. Co-inmunoprecipitación de Tim22p y Tim18p

Una vez establecida la colocalización de las proteínas Tim22p y Tim18p en las mitocondrias deficientes en Tim54p, corresponde discernir si la misma está o no relacionada con una posible interacción física entre ambas proteínas, o si por el contrario es consecuencia de los diferentes estados de ensamblaje de las proteínas por separado. Con este fin, extractos mitocondriales de las estirpes: Δ Tim54p, Δ Tim54p \uparrow Tim22p y Δ Tim18p, así como de la estirpe control (CDD38), se han sometido a co-inmunoprecipitación a través del anticuerpo α Tim22p.

En paralelo, se han realizado una serie de controles y por cada muestra se han analizado también las señales derivadas de: el propio anticuerpo α Tim22p, además de una muestra de mitocondrias intactas de la estirpe control.

En la figura 63.A. se muestra la inmunodetección revelada con α Tim22p de estas co-inmunoprecipitaciones. La electroforesis del anticuerpo α Tim22p, revelado consigo mismo, da el característico patrón de bandas de los anticuerpos, con las dos señales pertenecientes a las cadenas pesada y ligera, anteriormente descritas, a 50 y 25 kDa respectivamente (calle 1). La siguiente calle corresponde a las mitocondrias sin tratar y en ella y como cabe esperar, se identifica la señal perteneciente a Tim22p. Por su parte, las tres señales de 22, 25 y 50 kDa presentes en las calles 3 – 6, se puede deducir que corresponden a la proteína Tim22p y a las respectivas cadenas del propio anticuerpo. De esta forma, se puede corroborar el correcto proceso de co-inmunoprecipitación al que se han sometido estos distintos extractos.

Para dilucidar si en estas mismas condiciones, junto a Tim22p se encuentra también la proteína Tim18p. Se ha revelado el western con el anticuerpo policlonal frente a esta proteína. En las calles 3 y 4 de la figura 63.B. se pone de manifiesto que en mis condiciones de estudio Tim18p se encuentra interaccionando con Tim22p, tanto en presencia (calle 3) como en ausencia (calle 4) de Tim54p. No obstante este mismo resultado no se llega a visualizar en la estirpe Δ Tim54p \uparrow Tim22p (calle 5); probablemente debido al exceso de proteína Tim22p libre presente en las mitocondrias de esta estirpe, que en cualquier caso competiría, con ventaja, con el putativo complejo Tim22p – Tim18p, a la hora de su unión al anticuerpo α Tim22p.

Por último cabe reseñar que, como ya se ha comentado, anteriormente, la naturaleza policlonal del anticuerpo α Tim18p tiene su reflejo en la aparición de un gran número de bandas en la muestra de mitocondrias sin tratar, además de la correspondiente a Tim18p.

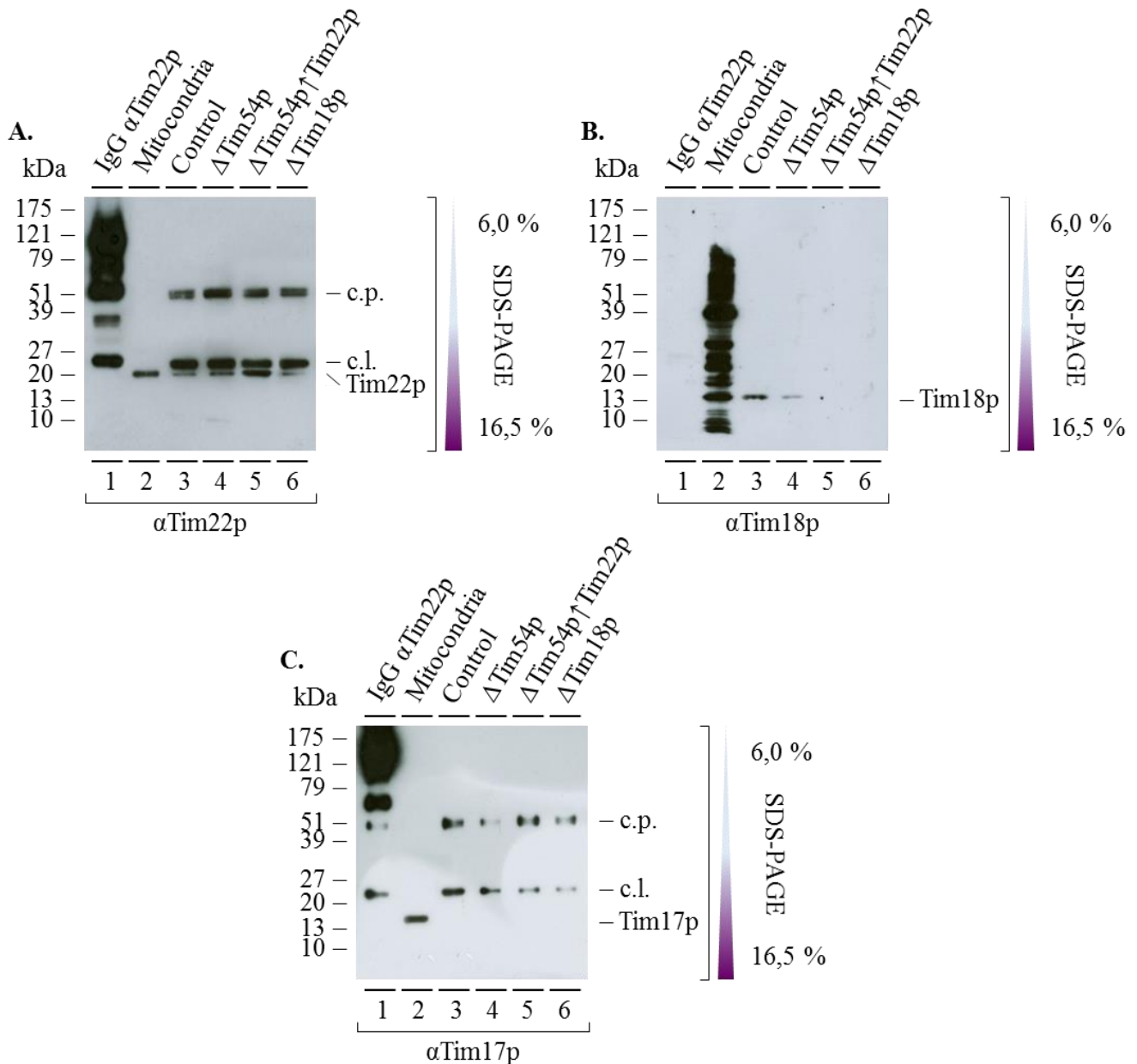


Figura 63. Co-inmuprecipitación de Tim18p junto a Tim22p

Lisados de mitocondrias de las estirpes control (RJ993), Δ Tim54p, Δ Tim54p \uparrow Tim22p y Δ Tim18p obtenidos con un 0,5% de digitonina. Se han co-inmuprecipitado con α Tim22p. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, en un gel de poliacrilamida en gradiente de concentración del 6 al 20%.

A. Inmuprecipitación de Tim22p. **B.** Inmuprecipitación de Tim18p. **C.** Inmuprecipitación de Tim17p como control de la coprecipitación.

Una vez comprobada la existencia de una interacción entre Tim22p y Tim18p, que nunca antes ha sido descrita y que solo se pone de manifiesto en ausencia de Tim54p, se ha considerado oportuno comprobar el grado de especificidad de la misma. Por eso los resultados de las co-inmunoprecipitaciones anteriores se han revelado también con α Tim17p (subunidad estructural tanto de la translocasa TIM23 y en particular del canal de la misma (Martinez-Caballero, Grigoriev et al. 2007).

En la figura 63.C. se muestran los resultados de esta determinación. Las dos primeras calles correspondientes a los dos controles para la co-inmunoprecipitación, presentan un patrón similar al de la inmunodetección revelada con α Tim22p (Figura 63.A.). En consecuencia, en la calle 1 se observan las bandas de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, así como otras de masa molecular superior a 50 kDa. Por otra parte y como cabe esperar, en la calle 2 de mitocondrias sin tratar, solo se revela la señal correspondiente a Tim17p. Las calles 3 – 6 pertenecientes a los resultados de las co-inmunoprecipitaciones, permiten deducir que en ningún caso Tim17p co-precipita junto a Tim22p.

4.5.5. Efecto de la eliminación de Tim54p sobre VDAC1

Para finalizar, y una vez demostrado que en mis condiciones de estudio, en ausencia de la proteína Tim54p los otros dos componentes integrales de membrana de la translocasa TIM22 interactúan entre sí, se ha estudiado el efecto que tiene esta delección de Tim54p sobre los oligómeros de VDAC1 en estado nativo.

Para ello, se ha realizado la electroforesis bidimensional de los tres extractos mitocondriales procedentes de las cepas: Δ Tim54p, Δ Tim54p \uparrow Tim22p y de la estirpe control. Los complejos proteicos se han resuelto en una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes y sometido a inmunoblot con los anticuerpos α Tim22p y α VDAC1.

Previamente ya he descrito que VDAC1 presenta hasta cinco formas moleculares en estado nativo (Figura 35). Entre ellas, las dos de mayor tamaño, se encuentran a la misma altura que los complejos que forman la translocasa TIM22. La tercera se encuentra a unos 240 kDa y finalmente, las dos últimas se han observado a la altura de los marcadores de 200 y 120 kDa (Figura 35).

Tras la doble dimensión, en las estirpes control y Δ Tim54p \uparrow Tim22p (Figura 64.A. y B.) el anticuerpo α VDAC1 resuelve una serie de bandas de masas moleculares comprendidas entre 400 y 120 kDa en la BN-PAGE. Estas coinciden en ambos casos con las formas moleculares esperadas para VDAC1. Por su parte, la estirpe Δ Tim54p tan solo presenta una única señal para VDAC1 a una altura de 27 kDa aproximadamente en BN-PAGE.

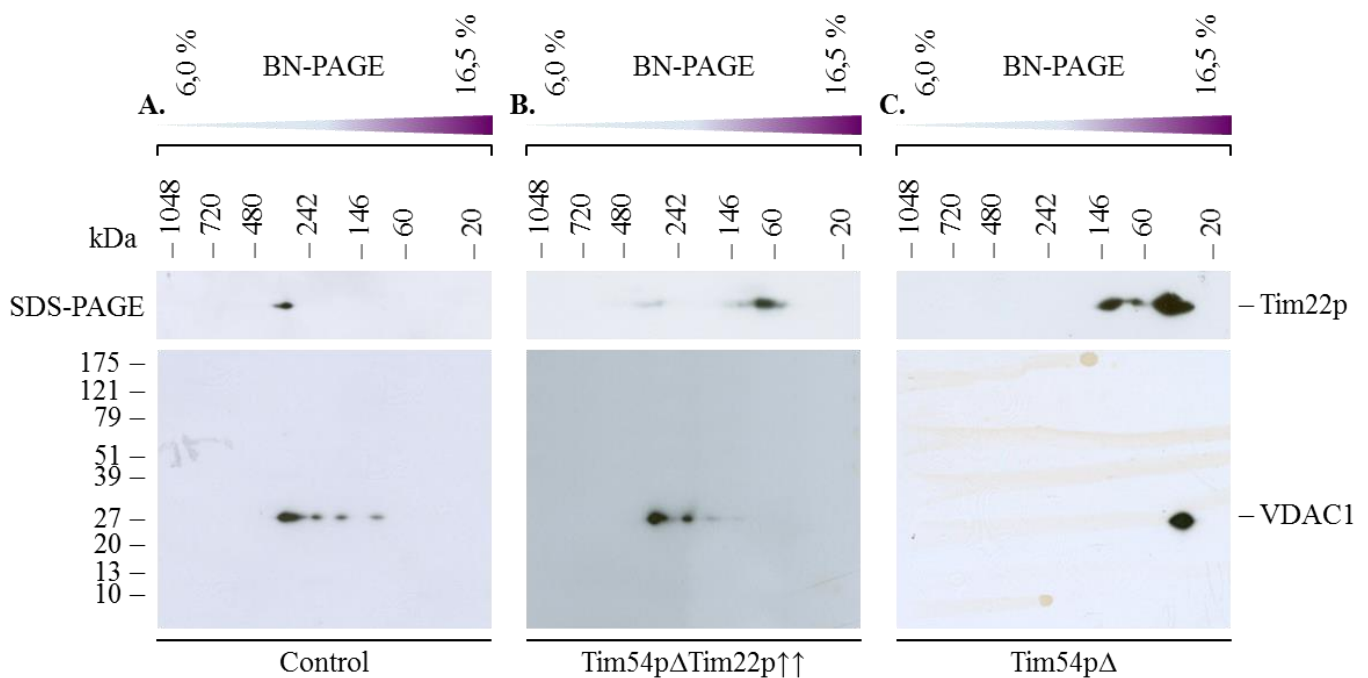


Figura 64. Electroforesis bidireccional de las estructuras nativas de VDAC1 y Tim22p

Lisados de mitocondrias de las estirpes control (A), Δ Tim54p (B) y Δ Tim54p \uparrow Tim22p (C), obtenidos con un 0,5% de digitonina, se han sometido a electroforesis bidireccional BN-PAGE/SDS-PAGE, y se han inmunodetectado simultáneamente las proteínas Tim22p y VDAC en estas condiciones.

Estos datos se han querido corroborar mediante densitometría de barrido. Así, en la figura 65.A. se ha observado cómo en la franja de masas moleculares comprendidos entre 400 y 300 kDa, en la estirpe control las dos bandas de elevada masa molecular que previamente se han identificado para VDAC1 se colocan con las de Tim22p. Tendencia que ya se ha descrito en el apartado 4.3.2. Estudios de electroforesis bidireccional e inmunodetección.

El área densitométrica que se ha obtenido para la proteína VDAC1 en el inmunoblot del extracto de Δ Tim54p \uparrow Tim22p presenta un perfil similar al de la estirpe control. Si bien, la altura de los picos es menor en este caso (Figura 65.B.). Se aprecia una correlación entre las señales de mayor masa molecular de VDAC1 y las de Tim22p que se han detectado en el rango de masas moleculares comprendidos entre los 400 y 300 kDa.

La figura 65.C. muestra los resultados de la densitometría de barrido de los westerns para α VDAC1 y α Tim22p en la estirpe Δ Tim54p. Estos ponen de manifiesto que no existe ninguna correlación entre ambas proteínas en esta estirpe. Tim22p presenta tres picos comprendidos entre las masas moleculares de 120 y 20 kDa. Por su parte, VDAC1, tan solo presenta una única señal a una altura próxima a los 20 kDa.

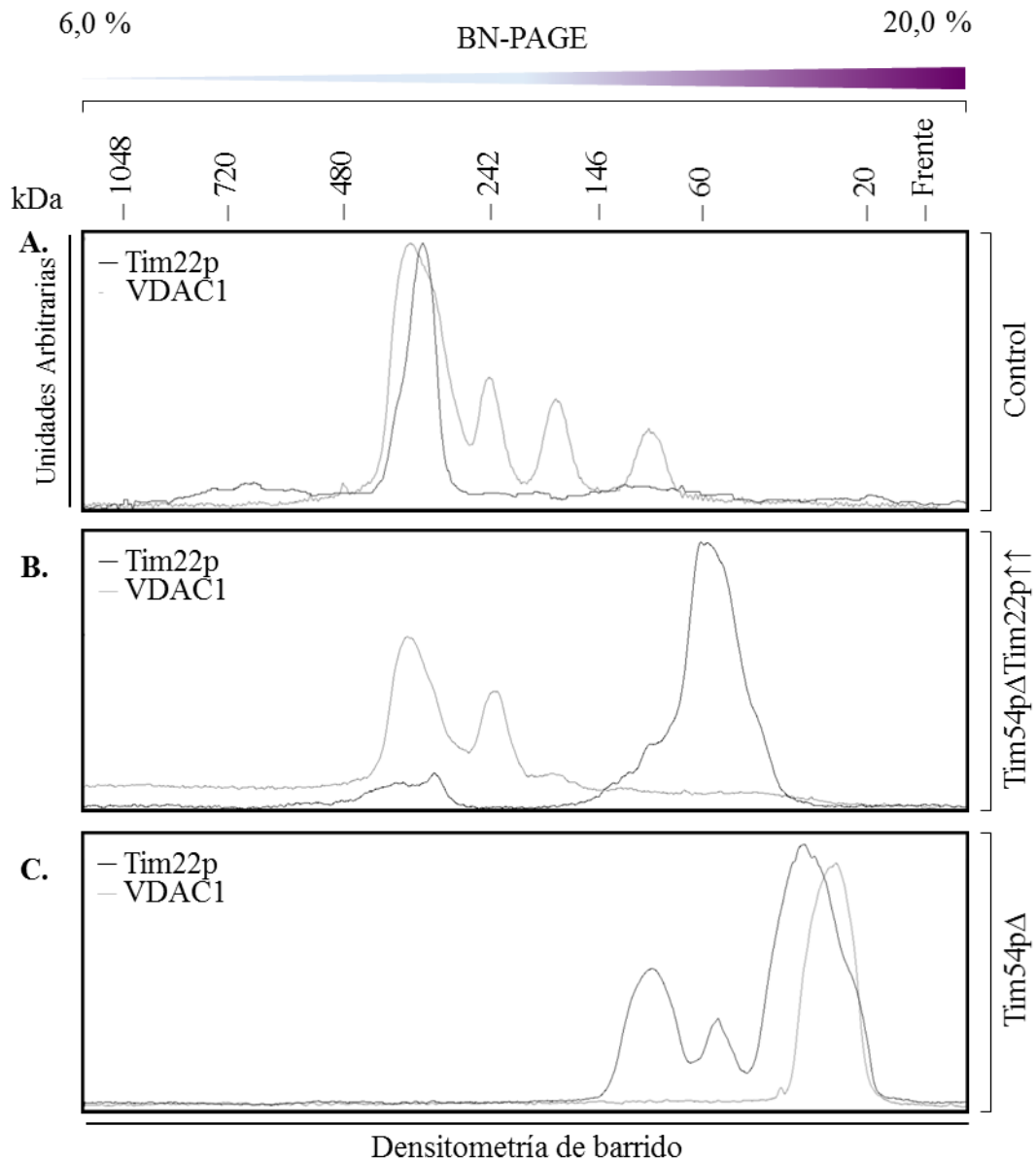


Figura 65. Densitometría de barrido con superposición de las estructuras nativas de VDAC1 y Tim22p

Los datos experimentales que se han obtenido mediante electroforesis bidireccional de la estirpe control para los anticuerpos frente a VDAC1 y Tim22p se han sometido a análisis de densitometría de barrido con ayuda del software informático ImageJ 1.33u, NIH, EEUU. Posteriormente estos valores se han superpuesto con el editor de imagen Adobe Photoshop CS5. Las estructuras en las que se encuentra presente Tim22p se han representado por una línea de color negro, mientras que en las que se encuentra presente VDAC1 se han representado mediante una línea de color gris. **A.** Estirpe control. **B.** Tim54pΔTim22p↑, y **C.** Tim54pΔ.

DISCUSIÓN

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para la viabilidad de las células eucariotas, no sólo por su crucial importancia en la bioenergética de la célula, sino también por el papel que desempeñan en numerosos procesos críticos, tales como el metabolismo de aminoácidos y lípidos, la biogénesis del grupo hemo y de los centros sulfoférricos (Fe-S) presentes en gran variedad de metaloproteínas de capital importancia en procesos redox mitocondriales, la homeostasis del Ca^{2+} , o su decisiva participación en los procesos de apoptosis y autofagia (Wallace and Fan 2009, Schmidt, Pfanner et al. 2010).

A diferencia de otras estructuras celulares las mitocondrias son orgánulos semiautónomos, que no pueden obtenerse *de novo*. Por eso para el crecimiento y la división de las mitocondrias preexistentes es necesaria la incorporación de sus constituyentes, tales como proteínas y lípidos. Si nos centramos en las proteínas, de las aproximadamente 1000 – 1500 distintas que se encuentran distribuidas en sus diferentes compartimentos (Sickmann, Reinders et al. 2003, Reinders, Zahedi et al. 2006), tan sólo un 1% de ellas pueden ser sintetizadas en la matriz mitocondrial, gracias al pequeño genoma que contiene este orgánulo. Por esto, la gran mayoría de las proteínas mitocondriales se traducen en los ribosomas del citoplasma, desde donde son importadas a la mitocondria. Con todo, los sistemas transportadores son cruciales para la viabilidad mitocondrial, especialmente las denominadas translocasas, encargadas del transporte e inserción de proteínas en cada uno de los cuatro compartimentos definidos por las dos membranas de las mitocondrias. Estas translocasas se han venido estudiando durante las últimas tres décadas, pero hasta que no se ha analizado sus relaciones estructura-función, en levaduras, no se ha logrado un avance significativo en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en las diferentes rutas y procesos de transporte de proteínas y de las interrelaciones entre las diferentes translocasas.

Hasta la fecha se han descrito cinco complejos transportadores de proteínas en la mitocondria, dos de los cuales se sitúan en la membrana interna. Una característica común a todos ellos es la presencia de grandes canales. Desde hace tiempo, nuestro grupo de investigación ha venido estudiando la composición y el funcionamiento de los canales de las translocasas, no sólo de aquellas en las que su misión es que la proteína atraviese completamente la membrana (Kinnally, Campo et al. 1989, Kinnally, Lohret et al. 1996, Kinnally, Muro et al. 2000, Muro, Grigoriev et al. 2003, Grigoriev, Muro et al. 2004,

Martinez-Caballero, Grigoriev et al. 2007, Martinez-Caballero, Peixoto et al. 2007, Peixoto, Graña et al. 2007), sino también de aquellas otras en las que la presencia de canales no parece tan obvia. Tal es el caso de la translocasa TIM22, cuya única función establecida hasta el momento es la inserción de proteínas en la membrana interna; a pesar de lo cual se ha demostrado que posee un canal con características y propiedades similares a las del resto de las translocasas (Peixoto, Graña et al. 2007).

El reto que me planteo en este trabajo, pasa por establecer las relaciones estructura – función de los diferentes componentes de TIM22 y en particular de su canal, mediante la disección molecular de esta translocasa, así como estudiar las posibles interrelaciones con otras proteínas y maquinarias mitocondriales.

Son todavía muchas las incógnitas que rodean a aspectos tales como la composición o el mecanismo molecular de funcionamiento de TIM22, y en especial todo lo referente a su canal. Cuestiones como la dinámica que articula a esta insertasa de proteínas, como algunos grupos prefieren denominarla, y su posible regulación, son temas aún pendientes de estudio. Y cuestiones como quiénes son los componentes estructurales del canal de este complejo y cuál es su biogénesis, o si forma parte además de estructuras o maquinarias supramoleculares, con otras posibles funciones que trascienden a las de la mera inserción de proteínas, son algunos de los objetivos más importantes en los que he trabajando. La respuesta a estas preguntas pasa por establecer las relaciones estructura – función entre los distintos componentes de TIM22; estudio que en esta tesis he decidido abordar mediante su disección molecular controlada. Esta aproximación me conduce a determinar las alteraciones estructurales sobre la biogénesis de la translocasa, al tiempo que los estudios electrofisiológicos de los que se dispone, me garantizan la repercusión funcional derivada de las mismas.

1. De la caracterización de las líneas celulares

El alto grado de conservación que existe entre las translocasas mitocondriales de las distintas especies (Kozjak, Wiedemann et al. 2003, Paschen, Waizenegger et al. 2003, Wiedemann, Kozjak et al. 2003, Gentle, Gabriel et al. 2004, Ishikawa, Yamamoto et al. 2004, Milenkovic, Kozjak et al. 2004, Waizenegger, Habib et al. 2004, Dolezal, Likic et al. 2006, Walther, Papic et al. 2009), hace que *Saccharomyces* siga siendo un sistema modelo altamente valioso para estudiar su biogénesis, por varias razones, entre ellas: la posibilidad que ofrece para alternar entre un metabolismo aeróbico y anaeróbico, lo que permite a estas células ser viables en situaciones en las que el funcionamiento de la cadena respiratoria pudiera estar comprometida; el relativamente fácil aislamiento y purificación de las mitocondrias de levaduras; el hecho de que puedan ser funcionales incluso después de un tiempo prolongado de congelación; así como la posibilidad de separación y subfragmentación de sus dos membranas. Tampoco hay que olvidar la ventaja económica que el mantenimiento y cultivo de células de levaduras representa frente a otros posibles modelos celulares. Pero quizás, la ventaja más significativa de este sistema es su enorme versatilidad genética, lo que hace factible eliminar uno o más componentes de las translocasas mitocondriales sin llegar a comprometer irreversiblemente la viabilidad celular, permitiendo así abordar estudios de disección molecular y en consecuencia de relación estructura – función.

No obstante, esta versatilidad inherente a los sistemas de levaduras, conlleva adaptaciones en la expresión de proteínas, inducidas tanto por las condiciones de crecimiento como por las modificaciones génicas llevadas a cabo. Por eso una caracterización celular rigurosa resulta esencial y previa para cualquier estudio de este tipo, y por ello he comenzado realizando una caracterización fenotípica y bioquímica, centrada esta última en la composición proteica de las translocasas mitocondriales, de todas y cada una de las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Para determinar el posible efecto que tiene la eliminación de proteínas esenciales de las translocasas, en concreto Tim22p o los componentes integrales de TIM23 (Tim23p, Tim17p y Tim50p) (Geissler, Krimmer et al. 2000, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Geissler, Chacinska et al. 2002), la supresión de su expresión se ha conseguido mediante la inserción de un promotor *Gal10* delante del gen que las codifica, por lo que su presencia en las membranas queda vinculada a la de la galactosa en el medio de crecimiento. Por el

contrario, la ausencia del nutriente en este medio va acompañada por una paulatina disminución de la proteína en cuestión, concomitante con su particular tiempo de recambio. Esto me ha permitido modular las condiciones de crecimiento de las sucesivas estirpes celulares, hasta conseguir la eliminación de al menos un 95% de la proteína de interés (Figuras 16, 18 – 20) sin comprometer la viabilidad celular (Figura 9). En el caso de proteínas que en sentido estricto no se consideran esenciales, como Tim18p y Tim54p, se ha optado por otro sistema, basado en la delección de la mayor parte del gen que codifica a la proteína y su sustitución por un gen marcador (Kerscher, Sepuri et al. 2000). El resultado en estos casos ha sido la completa eliminación de la proteína de interés (Figuras 16 – 18 y 59).

La caracterización de las líneas celulares ha permitido corroborar el carácter esencial descrito para las proteínas Tim22p, Tim23p, Tim17p, Tim50p, al igual que para Tom40p (Geissler, Krimmer et al. 2000, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Milisav, Moro et al. 2001, Geissler, Chacinska et al. 2002) (Figuras 9 – 10) y también matizar el carácter esencial de algunas otras, como es el caso de Tim54p, componente considerado esencial para el ensamblaje de TIM22 y en consecuencia y a priori, para la viabilidad celular (Kerscher, Sepuri et al. 2000), pero cuya ausencia puede remediarse manteniendo el crecimiento a una temperatura no superior a los 24 °C (Figura 9). También es posible recuperar el nivel de proliferación normal de estas células si concomitante a la delección de Tim54p se induce una sobre expresión de la proteína Tim22p (Figuras 9 y 12) (Kerscher, Holder et al. 1997).

El crecimiento de los organismos unicelulares es sabido que pasa por tres fases bien definidas: una inicial de latencia en la que las células se preparan para la división, seguida por una fase exponencial de división activa y finalmente una fase estacionaria, previa a la muerte. Y es precisamente durante la fase exponencial cuando la abundancia de mitocondrias y su funcionalidad son óptimas. Por eso, con el fin de obtener un mayor rendimiento en el aislamiento de mitocondrias, previamente se ha seguido en el tiempo el crecimiento de todas las líneas de *Saccharomyces cerevisiae*, a fin de determinar los parámetros singulares de la función de crecimiento para cada estirpe. Como cabe esperar, en todos los casos se ha observado que las condiciones de crecimiento restrictivas, tendentes a condicionar la expresión de cualquiera de las proteínas esenciales, lleva consigo una disminución en la tasa global de crecimiento celular, que por otra parte es similar a la obtenida para las líneas que contienen la delección de un componente no

esencial (Figuras 12 – 15). Cabe resaltar la singular dificultad de replicación que con respecto a su estirpe isogénica presentan las células Δ Tim18, que constitutivamente son deficientes en este componente (Figuras 9 – 12), lo que apunta a un destacado papel de esta proteína dentro de la translocasa, que hoy por hoy sigue sin estar plenamente identificado (Kerschler, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000, Wagner, Gebert et al. 2008).

Por otra parte la constatación de que tras el crecimiento celular el componente o los componentes mitocondriales que se pretendían mutar están verdaderamente alterados, se ha realizado mediante análisis de Western blot. Para ello es necesaria la determinación previa del tiempo de recambio de las proteínas de interés, a fin de establecer el intervalo en el que las células han de cultivarse en ausencia del inductor del promotor, hasta lograr la desaparición de las mismas. Los resultados reflejados en las figuras 16 – 22 permiten concluir que en la mayoría de los casos, 24 horas en condiciones de crecimiento restrictivas, son suficientes para conseguir la eliminación de más del 90% de la proteína deseada. No obstante este tiempo se ha comprobado ser significativamente superior en algunas líneas celulares como las mutantes en Tim50p y Tom40p respectivamente (datos no mostrados).

Teniendo en mente que la eliminación de una proteína ya sea esencial o no, puede no ser independiente del resto de los componentes de las translocasas, se hace preciso analizar y en la medida de lo posible cuantificar, el grado de dependencia o interrelación que las modificaciones genéticas comportan. Este extremo se ha determinado mediante la cuantificación de los resultados de los Westerns (Figuras 16, 19 y 21). Es importante señalar que a menudo, el empleo de esta técnica no permite obtener de manera satisfactoria resultados cuantitativos precisos y objetivos. Generalmente esto se deriva de problemas que sistemáticamente se ignoran, como la saturación de las señales tras el revelado. Por eso, para minimizar este factor se han tomado especiales precauciones: por una parte se han analizado simultáneamente las señales de diferentes concentraciones crecientes de cada proteína, al tiempo que los resultados densitométricos se han ajustado a una línea recta de pendiente positiva, que ha de pasar por el origen de coordenadas y cuyo nivel de confianza es, en todos los casos, superior al 93% (Figuras 17, 21, 45, 48, 50 y 59). Además los experimentos se han repetido con muestras procedentes de varios aislamientos mitocondriales, tantas veces como ha sido necesario, hasta conseguir que las desviaciones estándar de cada señal no superen el 20%.

A su vez las caracterizaciones de las proteínas de membrana interna se han unificado, al utilizar como control de carga a VDAC1, la proteína más abundante, en torno a un 60%, de la membrana externa. A este respecto, hay que incidir en que la particularidad temática de mi estudio, me ha obligado a descartar otros posibles controles de carga utilizados por otros autores para la caracterización de proteínas mitocondriales; entre ellos: la cantidad de proteína total, los componentes de la cadena respiratoria (codificados o no por el genoma mitocondrial), o las propias translocasas de proteínas. La razón fundamental es fácilmente entendible, si consideramos que casi el 99% de las proteínas mitocondriales son dependientes de uno u otro de los sistemas transportadores que deliberadamente estoy modificando. Además de por su abundancia en la membrana externa y en el conjunto de la mitocondria, donde ocupa el sexto lugar, he decidido utilizar VDAC1 como control, porque su biogénesis se ha descrito que es independiente de las dos translocasas de membrana interna (TIM22 y TIM23) y porque su nivel de expresión no está correlacionado con el tipo de metabolismo (aerobio o anaerobio) de la célula (Dihanich 1990, Krimmer, Rapaport et al. 2001, Flinner, Ellenrieder et al. 2013).

Otro factor de unificación de los resultados ha consistido en comparar los niveles de expresión de las diferentes proteínas respecto a los que presenta una única estirpe celular (S288C), que se ha establecido así como control, a pesar de no ser la estirpe isogénica de la totalidad de las líneas celulares implicadas en este estudio.

Del análisis de los resultados recogidos en las figuras 16 – 18, en primer lugar se deduce que he conseguido llevar a cabo la disección molecular de cada uno de los tres componentes integrales de la translocasa TIM22, obteniendo mitocondrias en las que la presencia de Tim22p, Tim18p o Tim54p es prácticamente inexistente.

En segundo lugar se puede argumentar la existencia de una considerable variabilidad en lo que respecta a la composición proteica particular de esta translocasa (Figuras 16 – 18); ya sea intrínseca, esto es inherente a cada estirpe celular, o inducida como consecuencia de las condiciones de crecimiento impuestas experimentalmente. La indudable ventaja que esto representa, se verá reflejada en la posibilidad que ofrece para establecer de forma mucho más precisa las diversas correlaciones entre estructura y función.

En tercer lugar, al comparar entre si las cepas isogénicas, se advierte que la eliminación de cualquiera de los componentes de la translocasa TIM22 no altera los niveles efectivos de los de su homóloga TIM23 (Figuras 16 – 20). En consecuencia, las alteraciones estructurales inducidas en la primera apenas tienen reflejo en la segunda; lo cual se puede interpretar en la línea de que ambas translocasas conforman entidades distintas.

2. De la caracterización de la translocasa TIM22

El efecto funcional que se deriva de la eliminación de cada uno de los componentes integrales de una translocasa, es una aproximación que resulta muy útil a la hora de establecer las relaciones entre estructura y función de estas complejas maquinarias moleculares. Como ya se ha mencionado, los canales forman una parte imprescindible para el correcto funcionamiento de las mismas, incluso en aquellas translocasas como TIM22, en las que la proteína en tránsito no tiene que atravesar completamente la membrana (Peixoto, Graña et al. 2007). Desde hace tiempo nuestro grupo de investigación cuenta y se ha especializado en la aplicación de técnicas electrofisiológicas como la aproximación más directa que se conoce para el estudio del funcionamiento de los canales mitocondriales y en particular los que están implicados en el transporte de proteínas (Kinnally, Campo et al. 1989, Kinnally, Lohret et al. 1996, Kinnally, Muro et al. 2000, Muro, Grigoriev et al. 2003, Grigoriev, Muro et al. 2004, Martinez-Caballero, Grigoriev et al. 2007, Martinez-Caballero, Peixoto et al. 2007, Peixoto, Graña et al. 2007). Fruto de estos estudios se encuentra el descubrimiento de un canal asociado a TIM22 en mitoplastos intactos. Dentro de este trabajo se han llegado a caracterizar electrofisiológicamente las mismas 9 líneas celulares con mutaciones en TIM22, que también son sujetos de este trabajo. El paso siguiente dentro de estos estudios, consiste en el análisis estructural de esta translocasa, basado en la disección molecular de TIM22. Como paso lógico en la caracterización de las translocasas mitocondriales, se ha decidido estudiar el efecto que sobre la estructura nativa de TIM22 tiene la eliminación de cualquiera de sus tres componentes integrales. Así como poder correlacionar la estructura de esta, con la caracterización electrofisiológica de TIM22 previa llevada a cabo en nuestro grupo de investigación, de la que se puede extraer que Tim22p no es el único componente integrante del canal de este complejo. Pues existe una correlación entre

la frecuencia de apertura del canal y los niveles de expresión de Tim22p y/o Tim18p. Esto lleva a plantearse cuál es el papel que juega la proteína Tim18p en TIM22 y porque Tim54p no afecta a la frecuencia de apertura del canal.

Para poder abordar este objetivo se hace preciso disgregar primero las membranas mitocondriales, ya que el entorno lipídico que rodea a los complejos proteicos de membrana proporciona un ambiente hidrofóbico, estable para las regiones intermembrana de las proteínas, que favorece la interacción entre ellas y estabiliza la estructura de los complejos. En consecuencia, para el aislamiento y análisis de complejos de membrana como las translocasas mitocondriales, se hace indispensable disponer de un agente que permita la extracción y solubilización de estas estructuras hidrofóbicas, del ambiente lipídico en el que se encuentran; minimizando en la medida de lo posible la alteración estructural de las mismas. Únicamente los detergentes no iónicos son apropiados para este fin, debido a su moderado potencial de alteración de la membrana y por su baja capacidad desnaturizante. La digitonina es uno de estos detergentes no iónico considerado como suave, ya que incide sobre la disrupción de las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína, más que sobre las interacciones proteína-proteína, y por tanto apropiado para la solubilización de complejos proteicos nativos. Por otra parte, es el detergente elegido en la mayoría de los trabajos que implican a las membranas mitocondriales. No obstante la elección del detergente no es suficiente y tiene que ir acompañada de un estudio de concentraciones que permita descartar posibles efectos de agregación o disgregación sobrevenidos. El análisis del efecto de la digitonina sobre las tres principales translocasas mitocondriales (Figuras 23.A. y 24) me permiten establecer un rango de concentraciones de digitonina, entre 0,25 y 3,0%, dentro del cual la estabilidad de las mismas no sufre modificaciones significativas. Estos datos amplían el rango de concentraciones preestablecido en la bibliografía, comprendido entre el 0,5 y 2,0% de detergente (Nijtmans, Henderson et al. 2002, Bisetto, Giorgio et al. 2007).

Como control adicional de la estabilidad de las translocasas dentro de mi rango de concentraciones, se han realizado las co-inmunoprecipitaciones de los respectivos componentes de TIM22 y TIM23, con sus anticuerpos específicos (Figuras 25-27 y 29), empleando un 0,5% de digitonina. Esto ha permitido comprobar, como de forma selectiva junto a estas proteínas esenciales de ambas translocasas se co-inmunoprecipitan los componentes de sus respectivos complejos, sin producirse interacciones cruzadas, demostrando la especificidad del proceso.

Estos datos me han llevado a establecer como concentración óptima para este tipo de estudios, bajo mis condiciones experimentales, el 0,5% de digitonina. Lo que me permite reducir al máximo los efectos inherentes al empleo de detergentes, a la vez que logro aislar las respectivas translocasa mitocondriales.

En estas condiciones he demostrado que la translocasa TIM22 se encuentra definida por dos formas moleculares muy próximas entre sí, localizadas a una altura entre 330 y 400 kDa (Figura 28, 35.A., 36, 43.A., 53, 56.A., 61.A y 62.A.). La biogénesis de ambas formas está condicionada por la presencia simultánea de las 3 proteínas integrales de la translocasa: Tim18p, Tim22p y Tim54p (Figuras 28, 43, 60 – 62). Lo que contrasta con los datos bibliográficos, en los que se conviene que la eliminación de Tim18p, proteína considerada por estos autores como accesoria dentro del complejo de aproximadamente 300 kDa, no desacopla por completo a TIM22, sino que produce sólo una disminución de la masa molecular del mismo hasta los 240 kDa (Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000). Por su parte, la sobre expresión constitutiva de Tim22p de la línea celular Δ Tim54p \uparrow Tim22p que permite recuperar la tasa de proliferación normal, está asociada con la aparición de un continuo de bandas entre los 100 y 350 kDa (Figura 28). Este hecho, podría estar asociado a la enorme sobre expresión de Tim22p, que podría encontrarse formando parte de numerosas asociaciones u oligómeros.

Si bien, esta alteración en la translocasa TIM22 producto de la eliminación de cualquiera de sus componentes no afecta a la biogénesis de su homóloga de membrana interna TIM23 o de la translocasa de membrana externa TOM (Figuras 30 y 31). Lo que indica que existe una independencia estructural entre las tres translocasa, que no implica una independencia funcional, ya que se ha descrito la existencia de redes de intercomunicación entre TOM y TIM23, asociadas al transporte de proteínas (Koehler, Merchant et al. 1999, Bauer, Hofmann et al. 2000, Jensen and Johnson 2001, Endo and Kohda 2002, Pfanner and Chacinska 2002), así como circunstancias en las que TIM23 suple las funciones de TIM22 en la inserción de proteínas multitópicas en la membrana interna mitocondrial, como son los casos de Tim23p o Tim17p.

Los datos electrofisiológicos previos, obtenidos del estudio de hasta tres líneas celulares deficientes en Tim54p, las estirpes Δ Tim54p, Δ Tim54p \uparrow Tim22p y \downarrow Tim23p, muestran una reducción en la apertura de la frecuencia del canal de TIM22, proporcional a los niveles de Tim22p y/o Tim18p, a diferencia de lo que sucede en estirpes carentes en cualquiera de estos dos componentes esenciales, en las que se aprecia un efecto más llamativo, con la drástica reducción en la frecuencia de apertura del canal TIM22. Estos resultados, correlacionan la frecuencia de la apertura del canal de la translocasa TIM22 con los niveles de expresión de Tim22p y/o Tim18p, con independencia de Tim54p, lo que parece indicar la existencia de un subcomplejo de TIM22 en el que Tim22p y Tim18p podrían ser componentes integrales, y que estaría asociado a la estructura de su canal. Mis resultados obtenidos mediante BN-PAGE para las líneas mutantes en los componentes del complejo TIM22 (Figura 28 y 60) no permiten corroborar esta hipótesis, puesto que no logro detectar ninguna señal proteica de masa molecular inferior a 120 kDa. Esto, puede ser achacado a las limitaciones técnicas de la BN-PAGE como consecuencia del empleo del reactivo G-250 en este tipo de estudios. Este reactivo al interactuar con el detergente utilizado en la lisis mitocondrial, produce un arrastre en el gel que va desde los 200-150 kDa hasta el final del gel (Figura 23.C). Este arrastre del reactivo G-250 se transfiere a las membranas junto con los complejos proteicos, bloqueando la misma e impidiendo la inmunodetección de cualquier proteína o complejo cuya masa molecular se encuentre por debajo de los 120 kDa aproximadamente.

Esta limitación técnica se ha subsanado, sometiendo los lisados mitocondriales de las distintas líneas celulares a una electroforesis bidireccional. Inicialmente se separan los complejos proteicos mediante BN-PAGE y a continuación se diseccionan mediante electroforesis SDS-PAGE (apartado 2.10.3. de Material y Métodos).

La electroforesis bidireccional a la que se han sometido a las líneas celulares deficientes en Tim54p: Δ Tim54p y Δ Tim54p \uparrow Tim22p, me ha permitido detectar una serie de oligómeros de baja masa molecular, en las que tanto Tim18p como Tim22p se encuentran presentes.

La disección molecular de los complejos presentes en la estirpe Δ Tim54p permite detectar tres formas moleculares, cuyas masas se encuentran comprendidas entre 120 y 20 kDa, en las que Tim18p y Tim22p están presentes. Las bandas de menor masa molecular, tanto para Tim22p como para Tim18p, se puede deducir que son debidas a la

forma libre de ambas proteínas (Figuras 61.B. y 62.B.), cuyas masas moleculares son de 22 y 13 kDa respectivamente. A diferencia de lo que se observa en los oligómeros de mayor masa molecular, de 120 y 60 kDa aproximadamente. Donde se detecta una colocalización exacta de Tim18p y Tim22p (Figura 61.B. y 62.B.).

Que esta colocalización está asociada a la presencia de una interacción entre ambas proteínas, se confirma mediante experimentos de inmunoprecipitación, figura 63, en los que junto a la proteína Tim22p se co-precipita de forma específica a Tim18p.

Por su parte, los estudios de electroforesis bidireccional realizados en la cepa Δ Tim54p \uparrow Tim22p, revelan algo similar a lo detectado en Δ Tim54p, confirmando una colocalización de Tim22p y Tim18p en la franja de masas moleculares comprendidas entre 120 y 60 kDa (Figura 61.C. y 62.C.). Si bien, la sobre expresión de Tim22p que constitutivamente experimenta esta línea celular (Figuras 16 – 18 y 59), y que en electroforesis nativa está asociado a un arrastre de Tim22p entre 350 y 60 kDa (Figuras 28 y 60), se resuelve en una segunda dimensión, en una serie de formas moleculares en las que nuevamente tanto Tim22p como Tim18p se colocalizan, a una altura próxima a la del complejo nativo TIM22 (350 – 250 kDa) (Figuras 61.C. y 62.D.). Posiblemente consecuencia de una pequeña cantidad de complejo TIM22, que es capaz de formarse en ausencia de Tim54p, pero subordinada a una sobre expresión de Tim22p.

Esta sobre expresión de Tim22p, dificulta la detección de interacciones entre Tim22p y Tim18p mediante la técnica de coprecipitación, como consecuencia de la relativamente fácil interacción de la proteína libre con su anticuerpo específico.

Como ya se ha comentado, VDAC1 se ha empleado como control de carga en todos los estudios realizados a lo largo de esta tesis. La biogénesis y los procesos de oligomerización de VDAC, correlacionados con el proceso de apoptosis, mediante la formación de grandes poros a través de los cuales se facilitaría la salida del citocromo c de la mitocondria (Zalk, Israelson et al. 2005), se llevan estudiando desde la década de los 80. Los primeros estudios realizados en mitocondrias procedentes de hígado de rata (Lindén and Gellerfors 1983), de levadura (Krause, Hay et al. 1986) o humanas (Keinan, Tyomkin et al. 2010), como los más actuales (Betaneli, Petrov et al. 2012, Noskov, Rostovtseva et al. 2013), han correlacionado a VDAC con la formación de dímeros,

trímeros, tetrámeros, hexámeros y oligómeros, cuyas masas moleculares oscilan entre los 60 y 400 kDa (Krimmer, Rapaport et al. 2001).

A tenor de estas estructuras moleculares de VDAC y teniendo en cuenta los ya citados posibles efectos que el detergente puede ocasionar sobre los complejos proteicos, se ha analizado el efecto que ejerce la digitonina sobre los oligómeros nativos de VDAC1. Así, mis resultados (Figura 33) muestran cómo el tratamiento de las mitocondrias con concentraciones de digitonina superiores al 2% dan una progresiva disminución en la intensidad de las señales obtenidas, llegando a desaparecer la señal de menor masa molecular, así como un progresivo desplazamiento hacia masas moleculares más elevadas de las señales de VDAC1, efecto similar al sufrido por las translocasas mitocondriales, con el incremento de la concentración de detergente utilizado en la solubilización de las membranas (Figuras 23, 24 y 34). Se observa una estabilidad de los oligómeros constitutivos de VDAC1 en el rango de concentraciones comprendido entre el 0,5 al 2 % de digitonina.

Una vez confirmado que bajo mis condiciones experimentales, las estructuras moleculares de VDAC1 no se ven alteradas, se ha analizado el efecto que tiene la eliminación de las dos isoformas de VDAC, presentes en levaduras (BlachlyDyson, Song et al. 1997), sobre la biogénesis de TIM22. En la figura 43 se muestra como la integridad de la translocasa TIM22 no se ve alterada por la modificación en la expresión de una, otra o ambas isoformas de VDAC descritas en la bibliografía (BlachlyDyson, Song et al. 1997). Esto indica una autonomía de la biogénesis de TIM22 con respecto a las isoformas de VDAC. Lo avala la utilización de VDAC1 como control de carga para los estudios de estructura – función de las translocasas de membrana interna mitocondrial.

En resumen, se ha caracterizado bioquímicamente la translocasa TIM22, mediante diferentes aproximaciones, tales como: la co-inmunoprecipitación, la electroforesis nativa y bidimensional, de lisados de mitocondrias de levadura. Se han utilizado un total de 9 líneas celulares de *Saccharomyces*, con el objetivo de determinar la aportación de cada uno de los componentes de esta translocasa en la biogénesis del complejo TIM22, así como comprobar el efecto que tiene sobre la misma la eliminación del componente principal de su translocasa homologa TIM23. Se ha descrito que la biogénesis de la

translocasa TIM22 se encuentra condicionada a la presencia simultánea de los tres componentes integrales de membrana de esta: Tim18p, Tim22p y Tim54p (Figuras 28.A y 43.A.). Así mismo, se ha determinado la existencia de al menos dos complejos de pequeño tamaño formados por la unión de Tim22p-Tim18p, en ausencia de Tim54p, en la línea celular Δ Tim54p (Figuras 61.B y 62.B.). Se ha analizado también una estirpe celular que además de carecer de Tim54p sobreexpresa Tim22p (Figuras 16 – 18 y 59). En este caso, además de las anteriormente mencionadas interacciones entre Tim22p y Tim18p de baja masa molecular (en ausencia de Tim54p), se ha detectado una pequeña cantidad de complejo TIM22 (Figuras 61.C y 62.C. y D.). Se ha determinado también una independencia estructural entre las dos grandes translocasa de membrana interna mitocondrial, TIM22 y TIM23 (Figuras 19, 20, y 30), así como un independencia entre la biogénesis de la translocasa TIM22 y la presencia en la membrana externa de cualquiera de las dos isoformas de VDAC descritas en levadura (Figura 43).

3. De la interacción de VDAC y TIM22

La electroforesis nativa para las líneas celulares mutantes en la translocasa TIM22 y la proteína Tim23p, ha demostrado la esencialidad de los tres componentes integrantes de membrana del complejo para la biogénesis del mismo (Figuras 28 y 60). En las líneas deficientes en Tim18p, Tim22p o Tim54p, en las que el complejo se encuentra desensamblado, no se ha logrado detectar ninguna de las proteínas componentes de TIM22 de forma individual en la zona de baja masa molecular. Esto, unido al intento de determinar y hacer comparativas la cantidad relativa de complejo TIM22 presente en cada línea celular, me llevó a incluir dentro del mismo análisis de BN-PAGE, el comportamiento y desarrollo de VDAC1, cuya biogénesis, en principio, es independiente de TIM22 (Krimmer, Rapaport et al. 2001).

Estos experimentos revelan una sorprendente correlación entre la biogénesis de la translocasa TIM22 y el desarrollo de VDAC1 en forma nativa, totalmente inesperada (Figura 32). De tal manera que las dos formas moleculares de TIM22 cuyas masas se encuentran comprendidas en torno a los 330 – 400 kDa comigran junto a las dos formas moleculares mayoritarias de VDAC1. Hecho que se corrobora mediante estudios de electroforesis bidireccional (Figuras 35 y 36), donde de las 5 formas moleculares claramente distinguibles de VDAC1, las dos de mayor masa molecular migran junto a TIM22, en la citada franja de masas moleculares. No obstante, se aprecia una asimetría en la preponderancia en las bandas pertenecientes a ambas proteínas, presentando una intensidad opuesta de las señales de VDAC1 y Tim22p.

Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Figuras 38 y 39) se ha puesto de manifiesto la existencia de una novedosa interacción entre VDAC1 y el complejo TIM22. Esta interacción, es dependiente de la presencia simultánea de las 3 proteínas integrales de membrana de TIM22, de tal forma que la eliminación de cualquiera de los tres componentes de esta translocasa desestabiliza esta unión. Este hecho podría indicar que esta novedosa interacción entre estos dos componentes de diferentes membranas mitocondriales precisa de la completa biogénesis TIM22 para que se constituya, no estableciéndose de forma aislada con ninguno de sus componentes por separado.

Los experimentos de coprecipitación con α Tim23p (Figura 50) en los que junto a esta proteína no se logra arrastrar ni a Tim22p ni VDAC1, manifiestan la especificidad

de la interacción entre VDAC1 y TIM22, descartando que se pueda producir como consecuencia del empleo de detergentes con TIM23. Por otro lado, las inmunoprecipitaciones realizadas con α Tim22p y α VDAC1, figura 50, demuestran la reciprocidad de la interacción entre ambas, a la vez que se refuerza la independencia estructural de TIM23 con respecto a los otros dos componentes mitocondriales.

La siguiente cuestión que surge es ¿Cuál de las dos isoformas de VDAC es la responsable de la interacción? O si, ¿son necesarias ambas isoformas para que se establezca la interacción entre VDAC1 y TIM22?.

Como consecuencia de las limitaciones que se han tenido para la obtención de un anticuerpo que capaz de detectar la isoforma de VDAC2, estas cuestiones tan solo se han podido contestar parcialmente.

Experimentos de coprecipitación de VDAC1 y Tim22p a través de sus anticuerpos específicos (Figura 44) han revelado que VDAC1 es suficiente para establecer la interacción con TIM22, produciéndose esta en presencia o ausencia de VDAC2 en la membrana externa mitocondrial (Figura 43). Por otro lado, la falta de disponibilidad de un anticuerpo que reconozca a VDAC2, no me ha permitido comprobar el papel de esta segunda isoforma de VDAC en dicha interacción. Este hándicap hace que tan solo se pueda plantear la hipótesis del papel que pueden jugar estas isoformas en la interacción. La primera de estas hipótesis atribuiría de forma exclusiva a VDAC1 el papel de interaccionar con TIM22. La segunda, y más probable, debido a la gran similitud que existe entre ambas isoformas de VDAC (BlachlyDyson, Song et al. 1997), es que sean ambas isoformas las que pudieran establecer esta interacción con TIM22, supliéndose la una a la otra, en caso de defecto de alguna de ellas.

La agregación de proteínas es un problema inherente al empleo de detergentes. Así, la solubilización de membranas mitocondriales con digitonina puede originar la agregación proteica, siendo especialmente acusada en el caso de proteínas mayoritarias, como es el caso de VDAC en las mitocondrias. Este problema condiciona el establecimiento de interacciones entre VDAC y cualquier otro componente mitocondrial, a realizar numerosos estudios de especificidad.

De tal forma, que he decidió comprobar si VDAC1 y el complejo TIM22 por separado son capaces de interactuar como consecuencia del empleo de detergentes. Para ello, se mezclaron mitocondrias desprovistas de VDAC1, pero que mantienen el complejo TIM22 intacto (estirpe Δ Por1), con mitocondrias que carecen de esta translocasa, presentando una cantidad normal de VDAC1 (\downarrow Tim22p). Y posteriormente, se sometió la mezcla al mismo tratamiento con digitonina, que se ha seguido para todas las líneas celulares por separado. La figura 47 muestra cómo la coprecipitación del lisado de esta mezcla con los anticuerpos frente a VDAC1 y Tim22p, descarta la posibilidad de que la interacción descrita entre VDAC y TIM22, en mitocondrias que de forma constitutiva contienen a ambos componentes (Figura 38 – 41 y 47, calle 1), sea consecuencia del tratamiento con detergentes. Ni tan siquiera, un aumento de la concentración de VDAC1, hasta en un 1000% (Figura 48), es suficiente para lograr, bajo mis condiciones de trabajo, producir la agregación de esta proteína con TIM22 (Figura 49).

Finalmente se planteó la cuestión de ¿Dónde se produce la interacción entre VDAC1 y TIM22?

Los sitios de contacto mitocondriales son zonas en las que la membrana externa e interna se aproximan tanto que llegan a yuxtaponerse. En estas se encuentra presente VDAC (Vyssokikh and Brdiczka 2003), lo que las convierte en un más que probable punto en el que encontrar la interacción entre VDAC1 y TIM22. Para resolver si verdaderamente son los sitios de contacto los lugares en los que se establece dicha interacción, se ha decidido introducir en este estudio, una muestra de mitocodrias desprovista de la mayor parte de la membrana externa, los denominados mitoplastos. Estos, presentan un nivel residual de VDAC1 (Figura 50), que se podría deducir que esta asociado a la interacción entre VDAC1 y TIM22.

Experimentos de BN-PAGE con mitocondrias y mitoplastos, han revelado que a igual cantidad de complejo TIM22, el nivel de expresión de los oligómeros de VDAC1 en la membrana de mitoplasto experimenta una reducción proporcional al nivel de VDAC1 en condiciones desnaturizantes, con respecto al nivel de los mismos en extractos mitocondriales. Estos resultados en su conjunto indican que la interacción de

VDAC1 con TIM22 se mantiene, en tanto en cuanto una cantidad de VDAC1 se preserva tras la eliminación de la membrana externa, probablemente en los sitios de contacto. No obstante estos experimentos parecen indicar también, que la interacción entre ambos complejos no se circunscribe únicamente a estos sitios, pues ninguna de las señales de VDAC1 mantiene una intensidad similar en mitocondrias y en mitoplastos; a pesar de que la cantidad de TIM22 es la misma en ambas preparaciones. No obstante sería preciso acometer el aislamiento específico de los sitios de contacto para poder confirmar este extremo.

En definitiva, existe una interacción de la translocasa TIM22 con el canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC1, que es independiente de la translocasa TIM23 (Figuras 37, 38, 41, 54.A. y B.). El establecimiento de esta interacción y la oligomerización de VDAC1 están condicionados a la presencia simultánea de los 3 componentes integrales de membrana de la translocasa TIM22: Tim18p, Tim22p y Tim54p. Esta interacción no se ha logrado establecer de forma artificial como consecuencia del empleo de detergente, demostrando la especificidad de la interacción y eliminando las posibles dudas de que su detección estuviera asociada a un artefacto producto del empleo de detergentes.

3.1. De la interacción de TIM22 con otros componentes mitocondriales

Todas las proteínas cuyo destino final se sitúa en alguno de los diferentes compartimentos mitocondriales utilizan a TOM para su paso a través de la membrana externa. Una vez en el espacio intermembrana, las proteínas con presecuencias dirigidas a la matriz, requieren el funcionamiento de la translocasa TIM23, mientras que la inserción de las proteínas multitópicas en la membrana interna depende de TIM22. Hasta el momento, la hipótesis en la que se basa el mecanismo de inserción de proteínas multitópicas en la membrana interna mitocondrial, descarta la cesión directa de las proteínas desde el complejo TOM en la membrana externa a TIM22 en la interna, y a pesar de los numerosos esfuerzos realizados por diferentes autores (Dudek, Rehling et al. 2013), no se ha logrado detectar una interacción entre ambos componentes mitocondriales. Por lo que surge la duda de si bajo mis condiciones experimentales es

posible detectar la existencia de esta interacción, entre las translocasas TOM de membrana externa y TIM22 de membrana interna.

Como paso previa, he querido comprobar el grado de correlación entre las señales de TOM y TIM22 en estado nativo. Para ello he sometido a electroforesis bidireccional lisados mitocondriales de la estirpe control. Previamente ya se ha descrito que TIM22 forma dos complejos de masa molecular comprendida entre 330 y 400 kDa (Figura 56.A.). Mientras que TOM se resuelve en una banda alargada, que se extiende entre los 480-300 kDa (Dekker, Ryan et al. 1998, Hill, Model et al. 1998, Künkele, Juin et al. 1998, Ahting, Thun et al. 1999, van Wilpe, Ryan et al. 1999, Vögtle, Schmidt et al. 2010), y una segunda señal centrada alrededor de los 150 kDa (Figura 56.B.). Exposiciones prolongadas del inmunoblotting revelan la presencia de otras dos señales de menor preponderancia; la mayor migra a una altura cercana a los 550 kDa, mientras que por su parte, la segunda banda se encuentra comprendida entre las dos señales mayoritarias, aproximadamente a 250 kDa. Estos datos establecen una comigración entre ambas translocasas mitocondriales en torno a los 300 – 400 kDa. Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación, figura 58, se demuestra que la comigración de estas, está relacionada con su interacción. De tal forma, que junto a Tim22p se arrastra a Tom40p y Tom20p, similar a lo que se obtiene en con los anticuerpos α Tim23p y α VDAC1. Esto último concuerda con los datos bibliográficos en los que ya se había relacionado a TOM con TIM23 y VDAC1 (Koehler, Merchant et al. 1999, Bauer, Hofmann et al. 2000, Jensen and Johnson 2001, Endo and Kohda 2002, Pfanner and Chacinska 2002).

Otro de los candidatos principales a interactuar con TIM22 es la proteína Tim10p. El núcleo TIM22 embebido en la membrana interna se compone de Tim22p, Tim18p y Tim54p (Sirrenberg, Bauer et al. 1996, Kerscher, Holder et al. 1997, Kerscher, Sepuri et al. 2000, Koehler, Murphy et al. 2000, Kovermann, Truscott et al. 2002, Rehling, Model et al. 2003, Gebert, Gebert et al. 2011). Este complejo está asociado a la proteína Tim12p, que media en la posterior inmovilización del intermediario desde el IMS a TIM22, escoltado por las chaperonas del espacio intermembrana, el complejo Tim9p-Tim10p, el cual suele estar unido de forma permanente a TIM22 (Sirrenberg, Endres et al. 1998, Gebert, Chacinska et al. 2008).

Mis resultados de coprecipitación de Tim10p (Figura 55), muestran una asociación de esta proteína con la translocasa TIM22 y TIM23. Esta asociación probablemente este correlacionada con el transporte de proteínas desde el complejo TOM a las translocasas de membrana interna.

Finalmente, se ha estudiado el intercambiador de nucleótidos, ANT, proteína que recientes investigaciones han relacionado con TIM23 y VDAC (Hunter and Haworth 1979, McEnery 1992, Zoratti and Szabò 1995, Beutner, Ruck et al. 1996, Beutner, Rück et al. 1998, Crompton, Virji et al. 1998, Marzo, Brenner et al. 1998, van der Laan, Wiedemann et al. 2006, Dienhart and Stuart 2008, Klingenberg 2008). ANT se encuentra formando parte de varios complejos multiproteicos, entre los que destacan por su relación con VDAC y con las translocasas de proteínas mitocondriales, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) (McEnery 1992, Beutner, Ruck et al. 1996, Beutner, Rück et al. 1998, Crompton, Virji et al. 1998, Marzo, Brenner et al. 1998) y el supercomplejo citocromo *bc*₁ – COX – TIM23 (van der Laan, Wiedemann et al. 2006, Mick, Wagner et al. 2007, Wiedemann, van der Laan et al. 2007, Dienhart and Stuart 2008).

La primera estrategia seguida para analizar la posible relación estructural entre ANT y la translocasa TIM22, ha consistido en el análisis electroforético de ANT en condiciones nativas (Figura 53). Bajo estas condiciones ANT se encuentra integrado por dos complejos, definidos por la presencia de dos bandas de masas moleculares aproximada de 200 y 120 kDa. De estas bandas, la de mayor masa molecular comigra junto con la señal de la misma masa de VDAC1, descrita en apartados anteriores (Figuras 34 – 36, 51 – 53). Por el contrario, las estructuras nativas de ANT y TIM22 están muy alejadas, lo que podría indicar que no existe ningún supercomplejo integrado por ANT y TIM22.

Este extremo se confirma en la figura 54, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. En los que utilizando un 0,5% de digitonina en la extracción proteica, VDAC1 y el intercambiador de nucleótidos ADP/ATP, establecen una interacción que no se detecta con ninguna de las dos translocasas presentes en la membrana interna mitocondrial, TIM22 y TIM23. Estos resultados contrastan con los descritos en la bibliografía, en los que se demuestra la existencia de un supercomplejo integrado por citocromo *bc*₁ – COX – TIM23. Probablemente esté asociado al porcentaje

de digitonina empleado en los experimentos. Estos autores, bajo condiciones de un 0,75% de detergente, próximas aunque superiores a mi concentración de trabajo, no logran detectar este supercomplejo, manifestándose tan sólo con concentraciones de digitonina del 1,5% (Saddar, Dienhart et al. 2008), concentración 3 veces superior a la empleada en mis experimentos. Este hecho se puede justificar como consecuencia de que el aislamiento de complejos o supercomplejos de membrana, puede requerir diferentes proporciones lípido/detergente para poder ser extraídos.

En resumen, la caracterización bioquímica llevada a cabo, me ha permitido detectar la existencia de numerosas interacciones entre la translocasa TIM22 y otros componentes mitocondriales, tales como TOM y Tim10p. De forma similar, se ha demostrado que determinadas interacciones entre componentes mitocondriales se pueden ver comprometidas por las condiciones experimentales. Así, el aislamiento de complejos o supercomplejos de membrana puede requerir diferentes proporciones lípido/detergente para poder ser extraídos.

4. De las funciones de la interacción de VDAC1 con TIM22

Una vez detectada la novedosa interacción entre el canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC, y la translocasa de membrana interna mitocondrial TIM22, asalta la duda de ¿cuál es la finalidad de esta interacción?.

A la vista de los resultados obtenidos se pueden establecer al menos cuatro hipótesis que pueden dar respuesta a esta cuestión. Así, esta interacción puede estar relacionada con: la biogénesis de VDAC, la oligomerización de VDAC en la membrana externa mitocondrial, el transporte de proteínas y finalmente, el transporte de ácidos nucleicos hasta la matriz mitocondrial.

4.1. De la biogénesis de VDAC1

Actualmente, el proceso de biogénesis de proteínas con estructura β -barril de la membrana externa mitocondrial, como son VDAC (Kozjak-Pavlovic, Ross et al. 2007), Tom40p, y Sam50, está muy bien caracterizado. Este, proceso implica la transferencia de las proteínas desde la translocasa TOM al complejo SAM, ambos componentes de la membrana externa celular, en un proceso mediado por las chaperonas del espacio intermembrana Tims (Wiedemann, Truscott et al. 2004). Si bien, durante la biogénesis de VDAC no se ha descrito ninguna etapa en la que participe TIM22.

En este caso, mi hipótesis estaría relacionada con una interacción de las proteínas periféricas Tim9p y Tim10p, que guían la presecuencia proteica de VDAC desde TOM hasta SAM, con la translocasa TIM22; de forma que se produciría transitoriamente una interacción estable entre los complejos transportadores de proteínas TOM y SAM de membrana externa, y TIM22 de membrana interna.

Si se tiene en cuenta, que las líneas celulares Δ Tim18p o Δ Tim54p, deficientes de forma constitutiva en TIM22 (Figuras 28.B y 60), presentan niveles de VDAC1 similares a los de la línea celular tomada como control (Figuras 16 – 18 y 59.A.), esta hipótesis pierde fuerza, aunque no hay que descartarla completamente.

4.2. Oligomerización de VDAC

VDAC es uno de los componentes mayoritarios de la membrana externa celular, y como ya se ha mencionado, desde hace más de tres décadas se llevan estudiando sus procesos de oligomerización (Lindén and Gellerfors 1983, Krause, Hay et al. 1986, Zalk, Israelson et al. 2005, Keinan, Tyomkin et al. 2010, Betaneli, Petrov et al. 2012, Noskov, Rostovtseva et al. 2013). Principalmente, estos estudios se han enfocado a buscar la función que tienen estos grandes poros de membrana, y su relación con procesos como la salida del citocromo c de la mitocondria durante el proceso de apoptosis (Zalk, Israelson et al. 2005). Los mecanismos a través de los cuales estas moléculas de VDAC oligomerizan en forma de homo o heterooligómeros, sigue siendo desconocido.

Mis resultados indican una dependencia del proceso de oligomerización de VDAC a la presencia de la translocasa TIM22 en la membrana interna. Por tanto, la hipótesis que me planteo consistiría en que es la translocasa TIM22 la encargada de facilitar la

oligomerización de VDAC. Este proceso se podría producir en los sitios de contacto, y donde se han detectado tanto VDAC como TIM22 (Shi, Chen et al. 2003, Geula, Naveed et al. 2012, Horvath, Rampelt et al. 2015).

Estos oligómeros una vez establecidos podrían tener dos destinos diferentes, uno de ellos, sería su liberación en la membrana externa donde participarían en diferentes procesos celulares y mitocondriales, y una segunda posibilidad, sería que estos oligómeros permanecieran unidos a la translocasa TIM22, formando un heterooligómero de elevada masa molecular, y cuya función es desconocida por el momento.

Esta hipótesis se ve apoyada por los experimentos de electroforesis nativa, en los que se detecta una correlación entre la biogénesis de TIM22 y la oligomerización de VDAC1 (Figuras 28 y 32). Las líneas celulares \uparrow Tim18p y \uparrow Tim22p (también \downarrow Tim23p), en las que se expresan simultáneamente Tim18p, Tim22p y Tim54p, se mantiene la oligomerización de VDAC1 (Figura 32). Cuando estas células se crecen en ausencia de galactosa, reprimiéndose la expresión de las proteínas Tim18p y Tim22p respectivamente (Figuras 16 – 18), es cuando se produce la desoligomerización de VDAC1 (Figura 32). La desestructuración de las formas moleculares de VDAC, respondería a un proceso de recambio o “turnover” de VDAC1, asociado a la imposibilidad de producirse nuevamente su oligomerización dependiente de TIM22.

En favor de esta hipótesis, se encuentran los análisis realizados en las líneas celulares Δ Tim18p y Δ Tim54p, que de forma constitutiva presentan la delección de uno de los componentes de la translocasa TIM22 (Figura 16 – 18 y 59). En estas cepas, a pesar presentar niveles de VDAC1 similares a los de su estirpe isogénica no se produce la oligómeros de VDAC1, pudiéndose achacar esto, a la deficiencia constitutiva en TIM22 (Figura 32).

Dentro de este apartado de la oligomerización de VDAC, se puede establecer una segunda hipótesis. Que a diferencia de la anterior, asociaría los procesos de oligomerización de VDAC con la biogénesis de la translocasa TIM22, pasando a considerar a VDAC1 como un nuevo componente de esta translocasa.

En esta hipótesis, los oligómeros de VDAC1 detectados en estado nativo (Figura 32), estarían asociados a diferentes etapas del proceso de biogénesis de la translocasa TIM22, constituyendo distintos heterooligómeros pertenecientes al proceso de ensamblaje de TIM22. Esta teoría es más improbable, puesto que existen datos bibliográficos en los que VDAC interactúa con otros componentes mitocondriales, como en el caso del MPTP (McEnery 1992, Beutner, Ruck et al. 1996, Beutner, Rück et al. 1998, Crompton, Virji et al. 1998, Marzo, Brenner et al. 1998), donde VDAC1 oligomeriza formando un supercomplejo en el que están presentes proteínas como ANT, el receptor de benzodiazepina mitocondrial, creatina quinasa o hexoquinasa y ciclofilina D. A pesar de esto, con los datos experimentales actuales, no es posible descartar la posibilidad de que la oligomerización de VDAC1 sea consecuencia del proceso de biogénesis de la translocasa TIM22.

4.3. Del transporte de proteínas

La proteína VDAC está formado por una única cadena polipeptídica de entre 27 a 32 kDa (Peng, Blachlydyson et al. 1992), que adopta una conformación cilíndrica, la cual forma un poro con un diámetro de aproximadamente 3,2 nm en el estado totalmente abierto. Los estudios estructurales determinan que está formada por 16 láminas plegadas β y una α -hélice en la región N-terminal, actuando como sensor de voltaje, posiblemente, regulando el tránsito de iones y metabolitos a través del poro de VDAC (Koppel, Kinnally et al. 1998, Bayrhuber, Meins et al. 2008, Ujwal, Cascio et al. 2008, Hiller and Wagner 2009).

Su estructura es muy similar a la de Tom40p, cuyo poro se encuentra formado por 19 láminas plegadas β , o el de Sam50, formado por 16 de estas láminas, al igual que VDAC1. Esto, unido al origen común de Tom40p y VDAC (Zeth 2010, Bay, Hafez et al. 2012), hace que no se pueda descartar la participación de VDAC en los procesos de transporte y/o inserción de proteínas mitocondriales.

Así pues, mi hipótesis consistiría en una interacción entre la presecuencia de una proteína de membrana interna mitocondrial con VDAC1, por cuyo canal atravesaría la membrana externa mitocondrial hacia el espacio intermembrana, desde donde seguiría el mecanismo de inserción de proteínas en la membrana interna ya descrito, a través del

complejo TIM22 (Sirrenberg, Bauer et al. 1996, Rehling, Model et al. 2003). Si bien, una vez demostrada la existencia de una interacción entre el complejo TOM y TIM22 (Figura 58) esta hipótesis pierde fuerza.

4.4. Del transporte de ácidos nucleicos

Los genes mitocondriales son esenciales para la viabilidad de las células eucariotas. En esta línea de investigación se ha demostrado que tanto las mitocondrias de plantas como las de mamíferos aisladas, son competentes para el importe de DNA lineal a su interior (Koulintchenko, Konstantinov et al. 2003, Weber-Lotfi, Ibrahim et al. 2009). Estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* han otorgado a las dos isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC, la capacidad de importar estas secuencias lineales de DNA al interior de la mitocondria (Weber-Lotfi, Ibrahim et al. 2009). Aunque, se conoce el mecanismo a través del cual, el ADN atraviesa la membrana externa mitocondrial, el canal o la forma por la que esta información genética llega a la matriz mitocondrial, sigue siendo desconocida.

De tal manera, que mi hipótesis relaciona la interacción establecida entre VDAC y TIM22 con el transporte de ácidos nucleicos a la matriz mitocondrial. El paso del ADN o ARN, desde VDAC a TIM22 podría producirse de forma directa, por un proceso similar al se ha descrito para los complejos TOM y TIM23 en el transporte de proteínas (Chacinska, van der Laan et al. 2010).

Hasta la fecha no se ha podido relacionar a ninguna de las translocasas de proteínas mitocondriales con el transporte de ácidos nucleicos, a excepción del receptor Tom70p del complejo TOM, implicado en el reconocimiento del ARNt previo a su translocación a través de VDAC al IMS (Salinas, Duchêne et al. 2006).

La hipótesis más probable, sería correlacionar el transporte de los ácidos nucleicos a través de la membrana interna con TIM23, debido a sus peculiares características, como son: el tamaño de su poro y el motor de importación asociado a esta translocasa. Si bien, hasta la fecha, ningún estudio ha podido confirmar esta hipótesis. Esto, unido a la existencia de un canal asociado a TIM22, de características estructurales similares al de TIM23, que en principio no sería necesario para la inserción de proteínas en la membrana

externa (Peixoto, Graña et al. 2007), y a mi descubrimiento, de una interacción entre la translocasa TIM22 y VDAC. Hacen que finalmente me planteé la hipótesis de que este supercomplejo formado entre VDAC1 y TIM22, este relacionado con el transporte de ácidos nucleicos a la matriz mitocondrial.

A favor de esta hipótesis apuntan los experimentos electrofisiológicos realizados en nuestro laboratorio, en los que se ha detectado una conducta similar a la descrita para la translocasa TIM22 en presencia del péptido P2 (péptido inductor de la apertura del canal), pero en este caso, con concentraciones del orden de 20 pM de una pequeña secuencia de ADN de 2,3 kB. Concentración muy inferior a la necesaria para lograr la apertura del canal de TIM22 en presencia del péptido P2, que es del orden de 5 μ M, lo que podría indicar una mayor sensibilidad del canal de esta translocasa por el ADN con respecto al péptido P2. En la misma dirección, apuntan los experimentos de importación de ADN marcado radioactivamente, llevados a cabo en colaboración con el laboratorio de Dietrich. En ambos casos, existe una correlación entre el transporte de ADN y la presencia simultánea de las 3 proteínas integrales de la translocasa TIM22.

CONCLUSIONES

- I. Los estudios de disección molecular de la translocasa TIM22 me permiten concluir que la biogénesis de este complejo depende de la presencia simultánea de Tim22p, Tim18p y Tim54p, los tres componentes integrales de membrana de este complejo; de manera que la eliminación de cualquiera de estas proteínas desensambla el complejo nativo.
- II. La eliminación de la proteína Tim54p de la membrana mitocondrial, no está asociada a la completa disgregación del complejo TIM22, existiendo dos formas moleculares de pequeño tamaño en las que las proteínas Tim18p y Tim22p interaccionan de forma independiente a Tim54p.
- III. La biogénesis de las translocasas homologas de membrana interna mitocondrial TIM22 y TIM23, es independiente entre sí.
- IV. Este es el primer trabajo en el que se describe la existencia de una interacción entre el canal aniónico dependiente de voltaje VDAC, o porina mitocondrial, de la membrana externa y la translocasa TIM22, encargada de la inserción de proteínas multitópicas en la membrana interna mitocondrial.
- V. La interacción VDAC-TIM22 es específica para la translocasa TIM22 e independiente a TIM23, la translocasa de membrana interna que transporta proteínas hasta la matriz mitocondrial.
- VI. La disección molecular de TIM22 y de las dos isoformas de VDAC presentes en levadura, me permiten concluir que la oligomerización de VDAC en la membrana interna es completamente dependiente de la translocasa TIM22. Por el contrario se descarta la implicación de las isoformas de VDAC en la biogénesis de la translocasa TIM22.
- VII. La interrelación de VDAC y TIM22 está condicionada a la presencia simultánea de ambos componentes en la mitocondria, descartando que la presencia de los componentes por separado en el medio de lisis pueda provocar la interacción de estos.
- VIII. Por primera vez se demuestra la existencia de una asociación entre la translocasa TIM22 de membrana interna y el complejo TOM puerta de entrada común a la mayoría de las proteínas a la mitocondria, en la membrana externa celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo and D. Kohda (2000). "Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20." *Cell* **100**(5): 551-560.
- Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo and D. Kohda (2000). "Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20." *Cell* **100**(5): 551-560.
- Abu-Hamad, S., H. Zaid, A. Israelson, E. Nahon and V. Shoshan-Barmatz (2008). "Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1 - Mapping the site of binding." *Journal of Biological Chemistry* **283**(19): 13482-13490.
- Ahting, U., C. Thun, R. Hegerl, D. Typke, F. E. Nargang, W. Neupert and S. Nussberger (1999). "The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria." *J Cell Biol* **147**(5): 959-968.
- Albrecht, R., P. Rehling, A. Chacinska, J. Brix, S. A. Cadamuro, R. Volkmer, B. Guiard, N. Pfanner and K. Zeth (2006). "The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes." *EMBO Rep* **7**(12): 1233-1238.
- Alder, N. N., R. E. Jensen and A. E. Johnson (2008). "Fluorescence mapping of mitochondrial TIM23 complex reveals a water-facing, substrate-interacting helix surface." *Cell* **134**(3): 439-450.
- Allen, S., V. Balabanidou, D. P. Sideris, T. Lisowsky and K. Tokatlidis (2005). "Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c." *J Mol Biol* **353**(5): 937-944.
- Allouche, M., C. Pertuiset, J. L. Robert, C. Martel, R. Veneziano, C. Henry, O. S. dein, N. Saint, C. Brenner and J. Chopineau (2012). "ANT-VDAC1 interaction is direct and depends on ANT isoform conformation in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **429**(1-2): 12-17.
- Arbel, N. and V. Shoshan-Barmatz (2010). "Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Bcl-2 to Prevent Antiapoptotic Activity." *Journal of Biological Chemistry* **285**(9): 6053-6062.
- Arzoine, L., N. Zilberberg, R. Ben-Romano and V. Shoshan-Barmatz (2009). "Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Hexokinase to Prevent Its Anti-apoptotic Activity." *Journal of Biological Chemistry* **284**(6): 3946-3955.
- Baker, K. P., A. Schaniel, D. Vestweber and G. Schatz (1990). "A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability." *Nature* **348**(6302): 605-609.
- Banci, L., I. Bertini, V. Calderone, C. Cefaro, S. Ciofi-Baffoni, A. Gallo, E. Kallergi, E. Lionaki, C. Pozidis and K. Tokatlidis (2011). "Molecular recognition and substrate mimicry drive the electron-transfer process between MIA40 and ALR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 4811-4816.
- Bauer, M. F., S. Hofmann, W. Neupert and M. Brunner (2000). "Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes." *Trends Cell Biol* **10**(1): 25-31.
- Bauer, M. F., C. Sirrenberg, W. Neupert and M. Brunner (1996). "Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria." *Cell* **87**(1): 33-41.

- Baumann, F., W. Neupert and J. M. Herrmann (2002). "Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix." J Biol Chem **277**(24): 21405-21413.
- Bay, D. C., M. Hafez, M. J. Young and D. A. Court (2012). "Phylogenetic and coevolutionary analysis of the β -barrel protein family comprised of mitochondrial porin (VDAC) and Tom40." Biochim Biophys Acta **1818**(6): 1502-1519.
- Bayrhuber, M., T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter and K. Zeth (2008). "Structure of the human voltage-dependent anion channel." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(40): 15370-15375.
- Becker, T., L. Böttinger and N. Pfanner (2012). "Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network." Trends Biochem Sci **37**(3): 85-91.
- Becker, T., B. Guiard, N. Thornton, N. Zufall, D. A. Stroud, N. Wiedemann and N. Pfanner (2010). "Assembly of the mitochondrial protein import channel: role of Tom5 in two-stage interaction of Tom40 with the SAM complex." Mol Biol Cell **21**(18): 3106-3113.
- Becker, T., S. Pfannschmidt, B. Guiard, D. Stojanovski, D. Milenkovic, S. Kutik, N. Pfanner, C. Meisinger and N. Wiedemann (2008). "Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors." J Biol Chem **283**(1): 120-127.
- Becker, T., L. S. Wenz, N. Thornton, D. Stroud, C. Meisinger, N. Wiedemann and N. Pfanner (2011). "Biogenesis of mitochondria: dual role of Tom7 in modulating assembly of the preprotein translocase of the outer membrane." J Mol Biol **405**(1): 113-124.
- Betaneli, V., E. P. Petrov and P. Schwillle (2012). "The role of lipids in VDAC oligomerization." Biophys J **102**(3): 523-531.
- Beutner, G., A. Rück, B. Riede and D. Brdiczka (1998). "Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases." Biochim Biophys Acta **1368**(1): 7-18.
- Beutner, G., A. Ruck, B. Riede, W. Welte and D. Brdiczka (1996). "Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore." FEBS Lett **396**(2-3): 189-195.
- Beverly, K. N., M. R. Sawaya, E. Schmid and C. M. Koehler (2008). "The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23." J Mol Biol **382**(5): 1144-1156.
- Bien, M., S. Longen, N. Wagener, I. Chwalla, J. M. Herrmann and J. Riemer (2010). "Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione." Mol Cell **37**(4): 516-528.
- Bihlmaier, K., N. Mesecke, N. Terziyska, M. Bien, K. Hell and J. M. Herrmann (2007). "The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain." J Cell Biol **179**(3): 389-395.
- Bisetto, E., V. Giorgio, F. Di Pancrazio, I. Mavelli and G. Lippe (2007). "Characterization of oligomeric forms from mammalian F0F1ATP synthase by BN-PAGE: the role of detergents." Ital J Biochem **56**(4): 254-258.

- Blachly-Dyson, E., J. Song, W. J. Wolfgang, M. Colombini and M. Forte (1997). "Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein." Mol Cell Biol **17**(10): 5727-5738.
- Blachly-Dyson, E., E. B. Zambronicz, W. H. Yu, V. Adams, E. R. McCabe, J. Adelman, M. Colombini and M. Forte (1993). "Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel." J Biol Chem **268**(3): 1835-1841.
- BlachlyDyson, E., J. M. Song, W. J. Wolfgang, M. Colombini and M. Forte (1997). "Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein." Molecular and Cellular Biology **17**(10): 5727-5738.
- Bohnert, M., P. Rehling, B. Guiard, J. M. Herrmann, N. Pfanner and M. van der Laan (2010). "Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport." Curr Biol **20**(13): 1227-1232.
- Bömer, U., M. Meijer, B. Guiard, K. Dietmeier, N. Pfanner and J. Rassow (1997). "The sorting route of cytochrome b2 branches from the general mitochondrial import pathway at the preprotein translocase of the inner membrane." J Biol Chem **272**(48): 30439-30446.
- Bömer, U., N. Pfanner and K. Dietmeier (1996). "Identification of a third yeast mitochondrial Tom protein with tetratrico peptide repeats." FEBS Lett **382**(1-2): 153-158.
- Bradford, M. M. (1976). "RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Brix, J., K. Dietmeier and N. Pfanner (1997). "Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70." J Biol Chem **272**(33): 20730-20735.
- Casadio, R., I. Jacoboni, A. Messina and V. De Pinto (2002). "A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAQ)." Febs Letters **520**(1-3): 1-7.
- Corral-Debrinski, M., C. Blugeon and C. Jacq (2000). "In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria." Mol Cell Biol **20**(21): 7881-7892.
- Crompton, M., S. Virji and J. M. Ward (1998). "Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore." Eur J Biochem **258**(2): 729-735.
- Cruciat, C. M., S. Brunner, F. Baumann, W. Neupert and R. A. Stuart (2000). "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria." J Biol Chem **275**(24): 18093-18098.
- Curran, S. P., D. Leuenberger, W. Oppliger and C. M. Koehler (2002). "The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier." EMBO J **21**(5): 942-953.
- Curran, S. P., D. Leuenberger, E. Schmidt and C. M. Koehler (2002). "The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins." J Cell Biol **158**(6): 1017-1027.

- Chacinska, A., M. Lind, A. E. Frazier, J. Dudek, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H. E. Meyer, K. N. Truscott, B. Guiard, N. Pfanner and P. Rehling (2005). "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17." *Cell* **120**(6): 817-829.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L. K. Sanjuán Szklarz, A. Schulze-Specking, K. N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger and N. Pfanner (2004). "Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins." *EMBO J* **23**(19): 3735-3746.
- Chacinska, A., P. Rehling, B. Guiard, A. E. Frazier, A. Schulze-Specking, N. Pfanner, W. Voos and C. Meisinger (2003). "Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex." *EMBO J* **22**(20): 5370-5381.
- Chacinska, A., M. van der Laan, C. S. Mehnert, B. Guiard, D. U. Mick, D. P. Hutu, K. N. Truscott, N. Wiedemann, C. Meisinger, N. Pfanner and P. Rehling (2010). "Distinct forms of mitochondrial TOM-TIM supercomplexes define signal-dependent states of preprotein sorting." *Mol Cell Biol* **30**(1): 307-318.
- Chan, N. C., V. A. Likić, R. F. Waller, T. D. Mulhern and T. Lithgow (2006). "The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi." *J Mol Biol* **358**(4): 1010-1022.
- Chan, N. C. and T. Lithgow (2008). "The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis." *Mol Biol Cell* **19**(1): 126-136.
- Dabir, D. V., E. P. Leverich, S. K. Kim, F. D. Tsai, M. Hirasawa, D. B. Knaff and C. M. Koehler (2007). "A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1." *EMBO J* **26**(23): 4801-4811.
- Daum, G., P. C. Bohni and G. Schatz (1982). "IMPORT OF PROTEINS INTO MITOCHONDRIA - CYTOCHROME-B2 AND CYTOCHROME-C PEROXIDASE ARE LOCATED IN THE INTERMEMBRANE SPACE OF YEAST MITOCHONDRIA." *Journal of Biological Chemistry* **257**(21): 3028-3033.
- Davis, A. J., N. N. Alder, R. E. Jensen and A. E. Johnson (2007). "The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import." *Mol Biol Cell* **18**(2): 475-486.
- de Brito, O. M. and L. Scorrano (2010). "An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship." *EMBO J* **29**(16): 2715-2723.
- De Pinto, V., F. Tomasello, A. Messina, F. Guarino, R. Benz, D. La Mendola, A. Magri, D. Milardi and G. Pappalardo (2007). "Determination of the conformation of the human VDAC1 N-terminal peptide, a protein moiety essential for the functional properties of the pore." *Chembiochem* **8**(7): 744-756.
- Decker, G. L. and J. W. Greenawalt (1977). "ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF MITOPLASTS AND OUTER MEMBRANES DERIVED FROM FRENCH-PRESSED MITOCHONDRIA." *Journal of Ultrastructure Research* **59**(1): 44-56.
- Dekker, P. J., F. Martin, A. C. Maarse, U. Bömer, H. Müller, B. Guiard, M. Meijer, J. Rassow and N. Pfanner (1997). "The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44." *EMBO J* **16**(17): 5408-5419.

- Dekker, P. J., M. T. Ryan, J. Brix, H. Müller, A. Hönliger and N. Pfanner (1998). "Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex." Mol Cell Biol **18**(11): 6515-6524.
- Dienhart, M. K. and R. A. Stuart (2008). "The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1-COX supercomplex and the TIM23 machinery." Mol Biol Cell **19**(9): 3934-3943.
- Dietmeier, K., A. Hönliger, U. Bömer, P. J. Dekker, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Kübrich and N. Pfanner (1997). "Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore." Nature **388**(6638): 195-200.
- Dihanich, M. (1990). "The biogenesis and function of eukaryotic porins." Experientia **46**(2): 146-153.
- Dolezal, P., V. Likic, J. Tachezy and T. Lithgow (2006). "Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria." Science **313**(5785): 314-318.
- Donzeau, M., K. Káldi, A. Adam, S. Paschen, G. Wanner, B. Guiard, M. F. Bauer, W. Neupert and M. Brunner (2000). "Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes." Cell **101**(4): 401-412.
- Dudek, J., P. Rehling and M. van der Laan (2013). "Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks." Biochim Biophys Acta **1833**(2): 274-285.
- Dukanovic, J., K. S. Dimmer, N. Bonnefoy, K. Krumpel and D. Rapaport (2009). "Genetic and functional interactions between the mitochondrial outer membrane proteins Tom6 and Sam37." Mol Cell Biol **29**(22): 5975-5988.
- Dukanovic, J. and D. Rapaport (2011). "Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane." Biochim Biophys Acta **1808**(3): 971-980.
- Eliyahu, E., L. Pnueli, D. Melamed, T. Scherrer, A. P. Gerber, O. Pines, D. Rapaport and Y. Arava (2010). "Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner." Mol Cell Biol **30**(1): 284-294.
- Elkeles, A., K. M. Devos, D. Graur, M. Zizi and A. Breiman (1995). "Multiple cDNAs of wheat voltage-dependent anion channels (VDAC): isolation, differential expression, mapping and evolution." Plant Mol Biol **29**(1): 109-124.
- Endo, T. and D. Kohda (2002). "Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 3-14.
- Endo, T., H. Yamamoto and M. Esaki (2003). "Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3259-3267.
- Endo, T. and K. Yamano (2010). "Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane." Biochim Biophys Acta **1803**(6): 706-714.
- Endres, M., W. Neupert and M. Brunner (1999). "Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex." EMBO J **18**(12): 3214-3221.
- Esaki, M., T. Kanamori, S. Nishikawa, I. Shin, P. G. Schultz and T. Endo (2003). "Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation." Nat Struct Biol **10**(12): 988-994.

- Flinner, N., L. Ellenrieder, S. B. Stiller, T. Becker, E. Schleiff and O. Mirus (2013). "Mdm10 is an ancient eukaryotic porin co-occurring with the ERMES complex." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3314-3325.
- Forte, M., E. Blachly-Dyson and M. Colombini (1996). Structure and function of the yeast outer mitochondrial membrane channel, VDAC. *Organellar Ion Channels and Transporters*. D. E. Clapham and B. E. Ehrlich. **51**: 145-154.
- Funes, S., F. E. Nargang, W. Neupert and J. M. Herrmann (2004). "The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family." *Mol Biol Cell* **15**(4): 1853-1861.
- Gadir, N., L. Haim-Vilmovsky, J. Kraut-Cohen and J. E. Gerst (2011). "Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *RNA* **17**(8): 1551-1565.
- Gałgańska, H., M. Antoniewicz, M. Budzińska, L. Gałgański and H. Kmita (2010). "VDAC contributes to mRNA levels in *Saccharomyces cerevisiae* cells by the intracellular reduction/oxidation state dependent and independent mechanisms." *J Bioenerg Biomembr* **42**(6): 483-489.
- García-Rodríguez, L. J., A. C. Gay and L. A. Pon (2007). "Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast." *J Cell Biol* **176**(2): 197-207.
- Garcia, M., T. Delaveau, S. Goussard and C. Jacq (2010). "Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA." *EMBO Rep* **11**(4): 285-291.
- Gebert, N., A. Chacinska, K. Wagner, B. Guiard, C. M. Koehler, P. Rehling, N. Pfanner and N. Wiedemann (2008). "Assembly of the three small Tim proteins precedes docking to the mitochondrial carrier translocase." *EMBO Rep* **9**(6): 548-554.
- Gebert, N., M. Gebert, S. Oeljeklaus, K. von der Malsburg, D. A. Stroud, B. Kulawiak, C. Wirth, R. P. Zahedi, P. Dolezal, S. Wiese, O. Simon, A. Schulze-Specking, K. N. Truscott, A. Sickmann, P. Rehling, B. Guiard, C. Hunte, B. Warscheid, M. van der Laan, N. Pfanner and N. Wiedemann (2011). "Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane." *Mol Cell* **44**(5): 811-818.
- Geissler, A., A. Chacinska, K. N. Truscott, N. Wiedemann, K. Brandner, A. Sickmann, H. E. Meyer, C. Meisinger, N. Pfanner and P. Rehling (2002). "The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel." *Cell* **111**(4): 507-518.
- Geissler, A., T. Krimmer, U. Bomer, B. Guiard, J. Rassow and N. Pfanner (2000). "Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence." *Mol Biol Cell* **11**(11): 3977-3991.
- Gentle, I., K. Gabriel, P. Beech, R. Waller and T. Lithgow (2004). "The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria." *J Cell Biol* **164**(1): 19-24.
- George, R., P. Walsh, T. Beddoe and T. Lithgow (2002). "The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo." *FEBS Lett* **516**(1-3): 213-216.
- Geula, S., H. Naveed, J. Liang and V. Shoshan-Barmatz (2012). "Structure-based analysis of VDAC1 protein: defining oligomer contact sites." *J Biol Chem* **287**(3): 2179-2190.

- Gevorkyan-Airapetov, L., K. Zohary, D. Popov-Celeketic, K. Mapa, K. Hell, W. Neupert, A. Azem and D. Mokranjac (2009). "Interaction of Tim23 with Tim50 Is essential for protein translocation by the mitochondrial TIM23 complex." J Biol Chem **284**(8): 4865-4872.
- Glick, B. S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Müller, R. L. Hallberg and G. Schatz (1992). "Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism." Cell **69**(5): 809-822.
- Grigoriev, S. M., C. Muro, L. M. Dejean, M. L. Campo, S. Martinez-Caballero and K. W. Kinnally (2004). "Electrophysiological approaches to the study of protein translocation in mitochondria." Int Rev Cytol **238**: 227-274.
- Grumbt, B., V. Stroobant, N. Terziyska, L. Israel and K. Hell (2007). "Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space." J Biol Chem **282**(52): 37461-37470.
- Ha, H., P. Hajek, D. M. Bedwell and P. D. Burrows (1993). "A mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porins." J Biol Chem **268**(16): 12143-12149.
- Hackenbrock, C. R. (1968). "Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(2): 598-605.
- Harner, M., W. Neupert and M. Deponce (2011). "Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria." EMBO J **30**(16): 3232-3241.
- Hase, T., U. Muller, H. Riezman and G. Schatz (1984). "A 70-KD PROTEIN OF THE YEAST MITOCHONDRIAL OUTER-MEMBRANE IS TARGETED AND ANCHORED VIA ITS EXTREME AMINO TERMINUS." Embo Journal **3**(13): 3157-3164.
- Haworth, R. A. and D. R. Hunter (1980). "ALLOSTERIC INHIBITION OF THE CA²⁺-ACTIVATED HYDROPHILIC CHANNEL OF THE MITOCHONDRIAL INNER MEMBRANE BY NUCLEOTIDES." Journal of Membrane Biology **54**(3): 231-236.
- Heins, L., H. Mentzel, A. Schmid, R. Benz and U. K. Schmitz (1994). "Biochemical, molecular, and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria." J Biol Chem **269**(42): 26402-26410.
- Hell, K., W. Neupert and R. A. Stuart (2001). "Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA." EMBO J **20**(6): 1281-1288.
- Herrmann, J. M. (2003). "Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting." Trends Microbiol **11**(2): 74-79.
- Herrmann, J. M. and N. Bonnefoy (2004). "Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase." J Biol Chem **279**(4): 2507-2512.
- Herrmann, J. M., W. Neupert and R. A. Stuart (1997). "Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p." EMBO J **16**(9): 2217-2226.
- Hill, K., K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner and N. Pfanner (1998). "Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]." Nature **395**(6701): 516-521.

- Hiller, S., R. G. Garces, T. J. Malia, V. Y. Orekhov, M. Colombini and G. Wagner (2008). "Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles." Science **321**(5893): 1206-1210.
- Hiller, S. and G. Wagner (2009). "The role of solution NMR in the structure determinations of VDAC-1 and other membrane proteins." Current Opinion in Structural Biology **19**(4): 396-401.
- Homblé, F., E. M. Krammer and M. Prévost (2012). "Plant VDAC: facts and speculations." Biochim Biophys Acta **1818**(6): 1486-1501.
- Hoppins, S. C. and F. E. Nargang (2004). "The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes." J Biol Chem **279**(13): 12396-12405.
- Horst, M., S. Hilfiker-Rothenfluh, W. Oppliger and G. Schatz (1995). "Dynamic interaction of the protein translocation systems in the inner and outer membranes of yeast mitochondria." EMBO J **14**(10): 2293-2297.
- Horvath, S. E., H. Rampelt, S. Oeljeklaus, B. Warscheid, M. van der Laan and N. Pfanner (2015). "Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria." Protein Sci **24**(3): 277-297.
- Huang, H., X. Hu, C. O. Eno, G. Zhao, C. Li and C. White (2013). "An interaction between Bcl-xL and the voltage-dependent anion channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca²⁺ uptake." J Biol Chem **288**(27): 19870-19881.
- Hulett, J. M., F. Lueder, N. C. Chan, A. J. Perry, P. Wolyneć, V. A. Likić, P. R. Gooley and T. Lithgow (2008). "The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex." J Mol Biol **376**(3): 694-704.
- Hunter, D. R. and R. A. Haworth (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms." Arch Biochem Biophys **195**(2): 453-459.
- Hwang, D. K., S. M. Claypool, D. Leuenberger, H. L. Tienson and C. M. Koehler (2007). "Tim54p connects inner membrane assembly and proteolytic pathways in the mitochondrion." J Cell Biol **178**(7): 1161-1175.
- Ishikawa, D., H. Yamamoto, Y. Tamura, K. Moritoh and T. Endo (2004). "Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly." J Cell Biol **166**(5): 621-627.
- Iwahashi, J., S. Yamazaki, T. Komiya, N. Nomura, S. Nishikawa, T. Endo and K. Mihara (1997). "Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20." J Biol Chem **272**(29): 18467-18472.
- Iwata, K. and M. Nakai (1998). "Interaction between mitochondrial precursor proteins and cytosolic soluble domains of mitochondrial import receptors, Tom20 and Tom70, measured by surface plasmon resonance." Biochem Biophys Res Commun **253**(3): 648-652.
- Jascur, T., D. P. Goldenberg, D. Vestweber and G. Schatz (1992). "Sequential translocation of an artificial precursor protein across the two mitochondrial membranes." J Biol Chem **267**(19): 13636-13641.
- Jensen, R. E. and A. E. Johnson (2001). "Opening the door to mitochondrial protein import." Nat Struct Biol **8**(12): 1008-1010.
- Jia, L., M. Dienhart, M. Schramp, M. McCauley, K. Hell and R. A. Stuart (2003). "Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1." EMBO J **22**(24): 6438-6447.

- Josyula, R., Z. Jin, Z. Fu and B. Sha (2006). "Crystal structure of yeast mitochondrial peripheral membrane protein Tim44p C-terminal domain." J Mol Biol **359**(3): 798-804.
- Kanamori, T., S. Nishikawa, I. Shin, P. G. Schultz and T. Endo (1997). "Probing the environment along the protein import pathways in yeast mitochondria by site-specific photocrosslinking." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 485-490.
- Keinan, N., D. Tyomkin and V. Shoshan-Barmatz (2010). "Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis." Mol Cell Biol **30**(24): 5698-5709.
- Kellems, R. E., V. F. Allison and R. A. Butow (1975). "Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria." J Cell Biol **65**(1): 1-14.
- Kemper, C., S. J. Habib, G. Engl, P. Heckmeyer, K. S. Dimmer and D. Rapaport (2008). "Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components." J Cell Sci **121**(Pt 12): 1990-1998.
- Kerscher, O., J. Holder, M. Srinivasan, R. S. Leung and R. E. Jensen (1997). "The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane." J Cell Biol **139**(7): 1663-1675.
- Kerscher, O., N. B. Sepuri and R. E. Jensen (2000). "Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane." Molecular Biology of the Cell **11**(1): 103-116.
- Kerscher, O., N. B. Sepuri and R. E. Jensen (2000). "Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane." Mol Biol Cell **11**(1): 103-116.
- Kinnally, K. W., M. L. Campo and H. Tedeschi (1989). "Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts." J Bioenerg Biomembr **21**(4): 497-506.
- Kinnally, K. W., T. A. Lohret, M. L. Campo and C. A. Mannella (1996). "Perspectives on the mitochondrial multiple conductance channel." J Bioenerg Biomembr **28**(2): 115-123.
- Kinnally, K. W., C. Muro and M. L. Campo (2000). "MCC and PSC, the putative protein import channels of mitochondria." J Bioenerg Biomembr **32**(1): 47-54.
- Kleene, R., N. Pfanner, W. Neupert and M. Tropschug (1987). "MITOCHONDRIAL PORIN FROM NEUROSPORA-CRASSA - STRUCTURE AND IMPORT INTO MITOCHONDRIA." Biological Chemistry Hoppe-Seyler **368**(10): 1260-1260.
- Klingenberg, M. (2008). "The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier." Biochim Biophys Acta **1778**(10): 1978-2021.
- Koehler, C. M. (2004). "New developments in mitochondrial assembly." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 309-335.
- Koehler, C. M., E. Jarosch, K. Tokatlidis, K. Schmid, R. J. Schweyen and G. Schatz (1998). "Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space." Science **279**(5349): 369-373.
- Koehler, C. M., S. Merchant, W. Oppliger, K. Schmid, E. Jarosch, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz and K. Tokatlidis (1998). "Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins." EMBO J **17**(22): 6477-6486.

- Koehler, C. M., S. Merchant and G. Schatz (1999). "How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space." Trends Biochem Sci **24**(11): 428-432.
- Koehler, C. M., M. P. Murphy, N. A. Bally, D. Leuenberger, W. Oppliger, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz and E. Or (2000). "Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane." Mol Cell Biol **20**(4): 1187-1193.
- Koh, J. Y., P. Hájek and D. M. Bedwell (2001). "Overproduction of PDR3 suppresses mitochondrial import defects associated with a TOM70 null mutation by increasing the expression of TOM72 in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **21**(22): 7576-7586.
- Kohda, D. (2004). "Structural Basis of mitochondrial presequence recognition by the receptor, Tom20." Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan **124**: 17-20.
- Komiya, T., S. Rospert, C. Koehler, R. Looser, G. Schatz and K. Mihara (1998). "Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis." EMBO J **17**(14): 3886-3898.
- Kondo-Okamoto, N., J. M. Shaw and K. Okamoto (2008). "Tetratricopeptide repeat proteins Tom70 and Tom71 mediate yeast mitochondrial morphogenesis." EMBO Rep **9**(1): 63-69.
- Koppel, D. A., K. W. Kinnally, P. Masters, M. Forte, E. Blachly-Dyson and C. A. Mannella (1998). "Bacterial expression and characterization of the mitochondrial outer membrane channel - Effects of N-terminal modifications." Journal of Biological Chemistry **273**(22): 13794-13800.
- Kornmann, B., C. Osman and P. Walter (2011). "The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(34): 14151-14156.
- Kornmann, B. and P. Walter (2010). "ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology." J Cell Sci **123**(Pt 9): 1389-1393.
- Koulintchenko, M., Y. Konstantinov and A. Dietrich (2003). "Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex." EMBO J **22**(6): 1245-1254.
- Koulintchenko, M., R. J. Temperley, P. A. Mason, A. Dietrich and R. N. Lightowers (2006). "Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression." Hum Mol Genet **15**(1): 143-154.
- Kovermann, P., K. N. Truscott, B. Guiard, P. Rehling, N. B. Sepuri, H. Müller, R. E. Jensen, R. Wagner and N. Pfanner (2002). "Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel." Mol Cell **9**(2): 363-373.
- Kozjak-Pavlovic, V., K. Ross, N. Benlasfer, S. Kimmig, A. Karlas and T. Rudel (2007). "Conserved roles of Sam50 and metaxins in VDAC biogenesis." EMBO Rep **8**(6): 576-582.
- Kozjak-Pavlovic, V., K. Ross, N. Benlasfer, S. Kimmig, A. Karlas and T. Rudel (2007). "Conserved roles of Sam50 and metaxins in VDAC biogenesis." Embo Reports **8**(6): 576-582.
- Kozjak, V., N. Wiedemann, D. Milenkovic, C. Lohaus, H. E. Meyer, B. Guiard, C. Meisinger and N. Pfanner (2003). "An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem **278**(49): 48520-48523.
- Krause, J., R. Hay, C. Kowolik and D. Brdiczka (1986). "Cross-linking analysis of yeast mitochondrial outer membrane." Biochim Biophys Acta **860**(3): 690-698.

- Krimmer, T., D. Rapaport, M. T. Ryan, C. Meisinger, C. K. Kassenbrock, E. Blachly-Dyson, M. Forte, M. G. Douglas, W. Neupert, F. E. Nargang and N. Pfanner (2001). "Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex." *J Cell Biol* **152**(2): 289-300.
- Krüger, V., M. Deckers, M. Hildenbeutel, M. van der Laan, M. Hellmers, C. Dreker, M. Preuss, J. M. Herrmann, P. Rehling, R. Wagner and M. Meinecke (2012). "The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers." *J Biol Chem* **287**(40): 33314-33326.
- Kuhn, A., R. Stuart, R. Henry and R. E. Dalbey (2003). "The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion?" *Trends Cell Biol* **13**(10): 510-516.
- Künkele, K. P., S. Heins, M. Dembowski, F. E. Nargang, R. Benz, M. Thieffry, J. Walz, R. Lill, S. Nussberger and W. Neupert (1998). "The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria." *Cell* **93**(6): 1009-1019.
- Künkele, K. P., P. Juin, C. Pompa, F. E. Nargang, J. P. Henry, W. Neupert, R. Lill and M. Thieffry (1998). "The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore." *J Biol Chem* **273**(47): 31032-31039.
- Kutik, S., D. Stojanovski, L. Becker, T. Becker, M. Meinecke, V. Krüger, C. Prinz, C. Meisinger, B. Guiard, R. Wagner, N. Pfanner and N. Wiedemann (2008). "Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins." *Cell* **132**(6): 1011-1024.
- Laemmli, U. K. (1970). "CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4." *Nature* **227**(5259): 680-&.
- Lee, C. M., J. Sedman, W. Neupert and R. A. Stuart (1999). "The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal." *J Biol Chem* **274**(30): 20937-20942.
- Lemire, B. D. and K. S. Oyedotun (2002). "The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase." *Biochim Biophys Acta* **1553**(1-2): 102-116.
- Li, J., X. Qian, J. Hu and B. Sha (2009). "Molecular chaperone Hsp70/Hsp90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading." *J Biol Chem* **284**(35): 23852-23859.
- Linden, M. and P. Gellerfors (1983). "HYDRODYNAMIC PROPERTIES OF PORIN ISOLATED FROM OUTER MEMBRANES OF RAT-LIVER MITOCHONDRIA." *Biochimica Et Biophysica Acta* **736**(1): 125-129.
- Lindén, M. and P. Gellerfors (1983). "Hydrodynamic properties of porin isolated from outer membranes of rat liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **736**(1): 125-129.
- Luciano, P., S. Vial, M. A. Vergnolle, S. D. Dyal, D. R. Robinson and K. Tokatlidis (2001). "Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex." *EMBO J* **20**(15): 4099-4106.
- Luk, E., M. Yang, L. T. Jensen, Y. Bourbonnais and V. C. Culotta (2005). "Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **280**(24): 22715-22720.
- MacKenzie, J. A. and R. M. Payne (2004). "Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane." *J Biol Chem* **279**(11): 9803-9810.

- Madesh, M. and G. Hajnoczky (2001). "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release." Journal of Cell Biology **155**(6): 1003-1015.
- Malia, T. J. and G. Wagner (2007). "NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-x(L)." Biochemistry **46**(2): 514-525.
- Mannella, C. A. (1997). "On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **29**(6): 525-531.
- Margeot, A., C. Blugeon, J. Sylvestre, S. Vialette, C. Jacq and M. Corral-Debrinski (2002). "In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function." EMBO J **21**(24): 6893-6904.
- Margeot, A., M. Garcia, W. Wang, E. Tetaud, J. P. di Rago and C. Jacq (2005). "Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly?" Gene **354**: 64-71.
- Marom, M., D. Dayan, K. Demishtein-Zohary, D. Mokranjac, W. Neupert and A. Azem (2011). "Direct interaction of mitochondrial targeting presequences with purified components of the TIM23 protein complex." J Biol Chem **286**(51): 43809-43815.
- Martin, J., K. Mahlke and N. Pfanner (1991). "Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences." J Biol Chem **266**(27): 18051-18057.
- Martinez-Caballero, S., S. M. Grigoriev, J. M. Herrmann, M. L. Campo and K. W. Kinnally (2007). "Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23." J Biol Chem **282**(6): 3584-3593.
- Martinez-Caballero, S., P. M. Peixoto, K. W. Kinnally and M. L. Campo (2007). "A fluorescence assay for peptide translocation into mitochondria." Anal Biochem **362**(1): 76-82.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, S. A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Rémy, Z. H. Xie, J. C. Reed and G. Kroemer (1998). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." J Exp Med **187**(8): 1261-1271.
- Matsudaira, P. (1987). "Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes." J Biol Chem **262**(21): 10035-10038.
- McEneaney, M. W. (1992). "The mitochondrial benzodiazepine receptor: evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC)." J Bioenerg Biomembr **24**(1): 63-69.
- Meier, S., W. Neupert and J. M. Herrmann (2005). "Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria." J Biol Chem **280**(9): 7777-7785.
- Meinecke, M., R. Wagner, P. Kovermann, B. Guiard, D. U. Mick, D. P. Hutu, W. Voos, K. N. Truscott, A. Chacinska, N. Pfanner and P. Rehling (2006). "Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane." Science **312**(5779): 1523-1526.
- Meisinger, C., N. Wiedemann, M. Rissler, A. Strub, D. Milenkovic, B. Schönfisch, H. Müller, V. Kozjak and N. Pfanner (2006). "Mitochondrial protein sorting: differentiation of beta-barrel assembly by Tom7-mediated segregation of Mdm10." J Biol Chem **281**(32): 22819-22826.

- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell and J. M. Herrmann (2005). "A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import." Cell **121**(7): 1059-1069.
- Mick, D. U., K. Wagner, M. van der Laan, A. E. Frazier, I. Perschil, M. Pawlas, H. E. Meyer, B. Warscheid and P. Rehling (2007). "Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly." EMBO J **26**(20): 4347-4358.
- Mihara, K. and R. Sato (1985). "MOLECULAR-CLONING AND SEQUENCING OF CDNA FOR YEAST PORIN, AN OUTER MITOCHONDRIAL-MEMBRANE PROTEIN - A SEARCH FOR TARGETING SIGNAL IN THE PRIMARY STRUCTURE." Embo Journal **4**(3): 769-774.
- Milenkovic, D., K. Gabriel, B. Guiard, A. Schulze-Specking, N. Pfanner and A. Chacinska (2007). "Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40." J Biol Chem **282**(31): 22472-22480.
- Milenkovic, D., V. Kozjak, N. Wiedemann, C. Lohaus, H. E. Meyer, B. Guiard, N. Pfanner and C. Meisinger (2004). "Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability." J Biol Chem **279**(21): 22781-22785.
- Milenkovic, D., T. Ramming, J. M. Müller, L. S. Wenz, N. Gebert, A. Schulze-Specking, D. Stojanovski, S. Rospert and A. Chacinska (2009). "Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria." Mol Biol Cell **20**(10): 2530-2539.
- Mileshina, D., M. Koulintchenko, Y. Konstantinov and A. Dietrich (2011). "Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration." Nucleic Acids Res **39**(17): e115.
- Milisav, I., F. Moro, W. Neupert and M. Brunner (2001). "Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria." Journal of Biological Chemistry **276**(28): 25856-25861.
- Milisav, I., F. Moro, W. Neupert and M. Brunner (2001). "Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria." J Biol Chem **276**(28): 25856-25861.
- Mills, R. D., J. Trewhella, T. W. Qiu, T. Welte, T. M. Ryan, T. Hanley, R. B. Knott, T. Lithgow and T. D. Mulhern (2009). "Domain organization of the monomeric form of the Tom70 mitochondrial import receptor." J Mol Biol **388**(5): 1043-1058.
- Moczko, M., U. Bömer, M. Kübrich, N. Zufall, A. Hönliger and N. Pfanner (1997). "The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences." Mol Cell Biol **17**(11): 6574-6584.
- Model, K., C. Meisinger and W. Kühlbrandt (2008). "Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase." J Mol Biol **383**(5): 1049-1057.
- Model, K., C. Meisinger, T. Prinz, N. Wiedemann, K. N. Truscott, N. Pfanner and M. T. Ryan (2001). "Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane." Nat Struct Biol **8**(4): 361-370.
- Mokranjac, D., S. A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S. C. Hoppins, F. E. Nargang, W. Neupert and K. Hell (2003). "Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria." EMBO J **22**(4): 816-825.
- Mokranjac, D., D. Popov-Celeketić, K. Hell and W. Neupert (2005). "Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites." J Biol Chem **280**(25): 23437-23440.

- Mokranjac, D., M. Sichtung, D. Popov-Celeketić, K. Mapa, L. Gevorkyan-Airapetov, K. Zohary, K. Hell, A. Azem and W. Neupert (2009). "Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria." Mol Biol Cell **20**(5): 1400-1407.
- Mossmann, D., C. Meisinger and F. N. Vögtle (2012). "Processing of mitochondrial presequences." Biochim Biophys Acta **1819**(9-10): 1098-1106.
- Müller, J. M., D. Milenkovic, B. Guiard, N. Pfanner and A. Chacinska (2008). "Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space." Mol Biol Cell **19**(1): 226-236.
- Muro, C., S. M. Grigoriev, D. Pietkiewicz, K. W. Kinnally and M. L. Campo (2003). "Comparison of the TIM and TOM channel activities of the mitochondrial protein import complexes." Biophys J **84**(5): 2981-2989.
- Naoé, M., Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto and T. Endo (2004). "Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space." J Biol Chem **279**(46): 47815-47821.
- Neupert, W. and M. Brunner (2002). "The protein import motor of mitochondria." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 555-565.
- Niazi, A. K., D. Milesina, A. Cosset, R. Val, F. Weber-Lotfi and A. Dietrich (2013). "Targeting nucleic acids into mitochondria: progress and prospects." Mitochondrion **13**(5): 548-558.
- Nijtmans, L. G., N. S. Henderson and I. J. Holt (2002). "Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes." Methods **26**(4): 327-334.
- Noskov, S. Y., T. K. Rostovtseva and S. M. Bezrukov (2013). "ATP transport through VDAC and the VDAC-tubulin complex probed by equilibrium and nonequilibrium MD simulations." Biochemistry **52**(51): 9246-9256.
- Ott, M. and J. M. Herrmann (2010). "Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins." Biochim Biophys Acta **1803**(6): 767-775.
- Oyedotun, K. S. and B. D. Lemire (2004). "The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies." J Biol Chem **279**(10): 9424-9431.
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, B. Chang, S. A. Sheth, S. B. Vafai, S. E. Ong, G. A. Walford, C. Sugiana, A. Boneh, W. K. Chen, D. E. Hill, M. Vidal, J. G. Evans, D. R. Thorburn, S. A. Carr and V. K. Mootha (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." Cell **134**(1): 112-123.
- Paschen, S. A., U. Rothbauer, K. Káldi, M. F. Bauer, W. Neupert and M. Brunner (2000). "The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria." EMBO J **19**(23): 6392-6400.
- Paschen, S. A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport and W. Neupert (2003). "Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins." Nature **426**(6968): 862-866.
- Peixoto, P. M., F. Graña, T. J. Roy, C. D. Dunn, M. Flores, R. E. Jensen and M. L. Campo (2007). "Awaking TIM22, a dynamic ligand-gated channel for protein insertion in the mitochondrial inner membrane." J Biol Chem **282**(26): 18694-18701.

- Peng, S. Z., E. Blachlydyson, M. Colombini and M. Forte (1992). "DETERMINATION OF THE NUMBER OF POLYPEPTIDE SUBUNITS IN A FUNCTIONAL VDAC CHANNEL FROM SACCHAROMYCES-CEREVISIAE." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **24**(1): 27-31.
- Pfaller, R., R. Kleene and W. Neupert (1990). "Biogenesis of mitochondrial porin: the import pathway." Experientia **46**(2): 153-161.
- Pfanner, N. and A. Chacinska (2002). "The mitochondrial import machinery: preprotein-conducting channels with binding sites for presequences." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 15-24.
- Pfeiffer, K., V. Gohil, R. A. Stuart, C. Hunte, U. Brandt, M. L. Greenberg and H. Schagger (2003). "Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes." J Biol Chem **278**(52): 52873-52880.
- Popov-Celeketić, J., T. Waizenegger and D. Rapaport (2008). "Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane." J Mol Biol **376**(3): 671-680.
- Pusnik, M., F. Charrière, P. Mäser, R. F. Waller, M. J. Dagley, T. Lithgow and A. Schneider (2009). "The single mitochondrial porin of *Trypanosoma brucei* is the main metabolite transporter in the outer mitochondrial membrane." Mol Biol Evol **26**(3): 671-680.
- Qian, X., M. Gebert, J. Höpker, M. Yan, J. Li, N. Wiedemann, M. van der Laan, N. Pfanner and B. Sha (2011). "Structural basis for the function of Tim50 in the mitochondrial presequence translocase." J Mol Biol **411**(3): 513-519.
- Rassow, J., B. Guiard, U. Wienhues, V. Herzog, F. U. Hartl and W. Neupert (1989). "Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1421-1428.
- Rassow, J., F. U. Hartl, B. Guiard, N. Pfanner and W. Neupert (1990). "Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state." FEBS Lett **275**(1-2): 190-194.
- Rehling, P., K. Brandner and N. Pfanner (2004). "Mitochondrial import and the twin-pore translocase." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(7): 519-530.
- Rehling, P., K. Model, K. Brandner, P. Kovermann, A. Sickmann, H. E. Meyer, W. Kuhlbrandt, R. Wagner, K. N. Truscott and N. Pfanner (2003). "Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase." Science **299**(5613): 1747-1751.
- Rehling, P., K. Model, K. Brandner, P. Kovermann, A. Sickmann, H. E. Meyer, W. Kuhlbrandt, R. Wagner, K. N. Truscott and N. Pfanner (2003). "Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase." Science **299**(5613): 1747-1751.
- Reinders, J., R. P. Zahedi, N. Pfanner, C. Meisinger and A. Sickmann (2006). "Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics." J Proteome Res **5**(7): 1543-1554.
- Roise, D. and G. Schatz (1988). "MITOCHONDRIAL PRESEQUENCES." Journal of Biological Chemistry **263**(10): 4509-4511.
- Rojo, E. E., R. A. Stuart and W. Neupert (1995). "Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP." EMBO J **14**(14): 3445-3451.
- Rubio, M. A. and A. K. Hopper (2011). "Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(6): 802-817.

- Rubio, M. A., J. J. Rinehart, B. Krett, S. Duvezin-Caubet, A. S. Reichert, D. Söll and J. D. Alfonzo (2008). "Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9186-9191.
- Saddar, S., M. K. Dienhart and R. A. Stuart (2008). "The F1F0-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome bc1-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery." J Biol Chem **283**(11): 6677-6686.
- Saint-Georges, Y., M. Garcia, T. Delaveau, L. Jourden, S. Le Crom, S. Lemoine, V. Tanty, F. Devaux and C. Jacq (2008). "Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization." PLoS One **3**(6): e2293.
- Saitoh, T., M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo and D. Kohda (2007). "Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states." EMBO J **26**(22): 4777-4787.
- Salinas, T., A. M. Duchêne, L. Delage, S. Nilsson, E. Glaser, M. Zaepfel and L. Maréchal-Drouard (2006). "The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18362-18367.
- Salinas, T., A. M. Duchêne and L. Maréchal-Drouard (2008). "Recent advances in tRNA mitochondrial import." Trends Biochem Sci **33**(7): 320-329.
- Sampson, M. J., R. S. Lovell and W. J. Craigen (1996). "Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms." Genomics **33**(2): 283-288.
- Schägger, H. and K. Pfeiffer (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." EMBO J **19**(8): 1777-1783.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-231.
- Schein, S. J., M. Colombini and A. Finkelstein (1976). "RECONSTITUTION IN PLANAR LIPID BILAYERS OF A VOLTAGE-DEPENDENT ANION-SELECTIVE CHANNEL OBTAINED FROM PARAMECIUM MITOCHONDRIA." Journal of Membrane Biology **30**(2): 99-120.
- Schleiff, E., J. R. Silvius and G. C. Shore (1999). "Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20." J Cell Biol **145**(5): 973-978.
- Schleyer, M. and W. Neupert (1985). "Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes." Cell **43**(1): 339-350.
- Schlossmann, J., K. Dietmeier, N. Pfanner and W. Neupert (1994). "Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72." J Biol Chem **269**(16): 11893-11901.
- Schmidt, O., N. Pfanner and C. Meisinger (2010). "Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 655-667.
- Schülke, N., N. B. Sepuri, D. M. Gordon, S. Saxena, A. Dancis and D. Pain (1999). "A multisubunit complex of outer and inner mitochondrial membrane protein translocases stabilized in vivo by translocation intermediates." J Biol Chem **274**(32): 22847-22854.
- Schülke, N., N. B. Sepuri and D. Pain (1997). "In vivo zippering of inner and outer mitochondrial membranes by a stable translocation intermediate." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7314-7319.

- Schulz, C., O. Lytovchenko, J. Melin, A. Chacinska, B. Guiard, P. Neumann, R. Ficner, O. Jahn, B. Schmidt and P. Rehling (2011). "Tim50's presequence receptor domain is essential for signal driven transport across the TIM23 complex." *J Cell Biol* **195**(4): 643-656.
- Schwaiger, M., V. Herzog and W. Neupert (1987). "Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins." *J Cell Biol* **105**(1): 235-246.
- Setoguchi, K., H. Otera and K. Mihara (2006). "Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins." *EMBO J* **25**(24): 5635-5647.
- Sherman, E. L., R. D. Taylor, N. E. Go and F. E. Nargang (2006). "Effect of mutations in Tom40 on stability of the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM) complex, assembly of Tom40, and import of mitochondrial preproteins." *J Biol Chem* **281**(32): 22554-22565.
- Shi, Y., J. Chen, C. Weng, R. Chen, Y. Zheng, Q. Chen and H. Tang (2003). "Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(4): 989-996.
- Shiota, T., H. Mabuchi, S. Tanaka-Yamano, K. Yamano and T. Endo (2011). "In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(37): 15179-15183.
- Shukolyukov, S. A. (2009). "Aggregation of frog rhodopsin to oligomers and their dissociation to monomer: application of BN- and SDS-PAGE." *Biochemistry (Mosc)* **74**(6): 599-604.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H. E. Meyer, B. Schönfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner and C. Meisinger (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13207-13212.
- Sideris, D. P., N. Petrakis, N. Katrakili, D. Mikropoulou, A. Gallo, S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, I. Bertini and K. Tokatlidis (2009). "A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding." *J Cell Biol* **187**(7): 1007-1022.
- Sirrenberg, C., M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert and M. Brunner (1996). "Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22." *Nature* **384**(6609): 582-585.
- Sirrenberg, C., M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert and M. Brunner (1996). "Import of carrier proteins into the mitochondrial Inner membrane mediated by Tim22." *Nature* **384**(6609): 582-585.
- Sirrenberg, C., M. Endres, K. Becker, M. F. Bauer, E. Walther, W. Neupert and M. Brunner (1997). "Functional cooperation and stoichiometry of protein translocases of the outer and inner membranes of mitochondria." *J Biol Chem* **272**(47): 29963-29966.
- Sirrenberg, C., M. Endres, H. Fölsch, R. A. Stuart, W. Neupert and M. Brunner (1998). "Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5." *Nature* **391**(6670): 912-915.
- Stojanovski, D., B. Guiard, V. Kozjak-Pavlovic, N. Pfanner and C. Meisinger (2007). "Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins." *J Cell Biol* **179**(5): 881-893.
- Stojanovski, D., D. Milenkovic, J. M. Müller, K. Gabriel, A. Schulze-Specking, M. J. Baker, M. T. Ryan, B. Guiard, N. Pfanner and A. Chacinska (2008). "Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase." *J Cell Biol* **183**(2): 195-202.

- Stroud, D. A., T. Becker, J. Qiu, D. Stojanovski, S. Pfannschmidt, C. Wirth, C. Hunte, B. Guiard, C. Meisinger, N. Pfanner and N. Wiedemann (2011). "Biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex." *Mol Biol Cell* **22**(16): 2823-2833.
- Stuart, R. (2002). "Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxal complex." *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 79-87.
- Stuart, R. A. (2008). "Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* **40**(5): 411-417.
- Stubbs, G. W., H. G. Smith and B. J. Litman (1976). "Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin. A comparison with several commonly used detergents." *Biochim Biophys Acta* **426**(1): 46-56.
- Sun, F., X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam and Z. Rao (2005). "Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II." *Cell* **121**(7): 1043-1057.
- Szabò, I., G. Bãthori, F. Tombola, A. Coppola, I. Schmehl, M. Brini, A. Ghazi, V. De Pinto and M. Zoratti (1998). "Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin." *FASEB J* **12**(6): 495-502.
- Szabo, I., V. Depinto and M. Zoratti (1993). "THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE MAY COMPRISE VDAC MOLECULES .2. THE ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF VDAC ARE COMPATIBLE WITH THOSE OF THE MITOCHONDRIAL MEGACHANNEL." *Febs Letters* **330**(2): 206-210.
- Szyrach, G., M. Ott, N. Bonnefoy, W. Neupert and J. M. Herrmann (2003). "Ribosome binding to the Oxal complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria." *EMBO J* **22**(24): 6448-6457.
- Tamura, Y., Y. Harada, T. Shiota, K. Yamano, K. Watanabe, M. Yokota, H. Yamamoto, H. Sesaki and T. Endo (2009). "Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import." *J Cell Biol* **184**(1): 129-141.
- Tarassov, I., N. Entelis and R. P. Martin (1995). "An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA." *J Mol Biol* **245**(4): 315-323.
- Taylor, A. B., B. S. Smith, S. Kitada, K. Kojima, H. Miyaura, Z. Otwinowski, A. Ito and J. Deisenhofer (2001). "Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences." *Structure* **9**(7): 615-625.
- Taylor, R. D., B. J. McHale and F. E. Nargang (2003). "Characterization of *Neurospora crassa* Tom40-deficient mutants and effect of specific mutations on Tom40 assembly." *J Biol Chem* **278**(2): 765-775.
- Teste, M. A., M. Duquenne, J. M. François and J. L. Parrou (2009). "Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*." *BMC Mol Biol* **10**: 99.
- Thornton, N., D. A. Stroud, D. Milenkovic, B. Guiard, N. Pfanner and T. Becker (2010). "Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of alpha-helical outer membrane proteins." *J Mol Biol* **396**(3): 540-549.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM POLYACRYLAMIDE GELS TO NITROCELLULOSE SHEETS - PROCEDURE AND SOME

APPLICATIONS." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.

Truscott, K. N., P. Kovermann, A. Geissler, A. Merlin, M. Meijer, A. J. Driessen, J. Rassow, N. Pfanner and R. Wagner (2001). "A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23." Nat Struct Biol **8**(12): 1074-1082.

Truscott, K. N., N. Wiedemann, P. Rehling, H. Müller, C. Meisinger, N. Pfanner and B. Guiard (2002). "Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex." Mol Cell Biol **22**(22): 7780-7789.

Ujwal, R., D. Cascio, J. P. Colletier, S. Faham, J. Zhang, L. Toro, P. P. Ping and J. Abramson (2008). "The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 angstrom resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(46): 17742-17747.

van der Laan, M., M. Meinecke, J. Dudek, D. P. Hutu, M. Lind, I. Perschil, B. Guiard, R. Wagner, N. Pfanner and P. Rehling (2007). "Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins." Nat Cell Biol **9**(10): 1152-1159.

van der Laan, M., N. Wiedemann, D. U. Mick, B. Guiard, P. Rehling and N. Pfanner (2006). "A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria." Curr Biol **16**(22): 2271-2276.

van Wilpe, S., M. T. Ryan, K. Hill, A. C. Maarse, C. Meisinger, J. Brix, P. J. Dekker, M. Moczko, R. Wagner, M. Meijer, B. Guiard, A. Hönlinger and N. Pfanner (1999). "Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase." Nature **401**(6752): 485-489.

Vasiljev, A., U. Ahting, F. E. Nargang, N. E. Go, S. J. Habib, C. Kozany, V. Panneels, I. Sinning, H. Prokisch, W. Neupert, S. Nussberger and D. Rapaport (2004). "Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes." Mol Biol Cell **15**(3): 1445-1458.

Verrier, F., B. Mignotte, G. N. Jan and C. Brenner (2003). Study of PTPC composition during apoptosis for, identification of viral protein target. Apoptosis: From Signaling Pathways to Therapeutic Tools. M. Diederich. **1010**: 126-142.

Vögtle, F. N., O. Schmidt, A. Chacinska, N. Pfanner and C. Meisinger (2010). "Native techniques for analysis of mitochondrial protein import." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **619**: 425-436.

Vögtle, F. N., S. Wortelkamp, R. P. Zahedi, D. Becker, C. Leidhold, K. Gevaert, J. Kellermann, W. Voos, A. Sickmann, N. Pfanner and C. Meisinger (2009). "Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability." Cell **139**(2): 428-439.

von der Malsburg, K., J. M. Müller, M. Bohnert, S. Oeljeklaus, P. Kwiatkowska, T. Becker, A. Loniewska-Lwowska, S. Wiese, S. Rao, D. Milenkovic, D. P. Hutu, R. M. Zerbes, A. Schulze-Specking, H. E. Meyer, J. C. Martinou, S. Rospert, P. Rehling, C. Meisinger, M. Veenhuis, B. Warscheid, I. J. van der Klei, N. Pfanner, A. Chacinska and M. van der Laan (2011). "Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis." Dev Cell **21**(4): 694-707.

Vyssokikh, M. Y. and D. Brdiczka (2003). "The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis." Acta Biochim Pol **50**(2): 389-404.

- Vyssokikh, M. Y. and D. Brdiczka (2003). "The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis." Acta Biochimica Polonica **50**(2): 389-404.
- Wagner, K., N. Gebert, B. Guiard, K. Brandner, K. N. Truscott, N. Wiedemann, N. Pfanner and P. Rehling (2008). "The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases." Mol Cell Biol **28**(13): 4251-4260.
- Waizenegger, T., S. J. Habib, M. Lech, D. Mokranjac, S. A. Paschen, K. Hell, W. Neupert and D. Rapaport (2004). "Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria." EMBO Rep **5**(7): 704-709.
- Walther, D. M., D. Papic, M. P. Bos, J. Tommassen and D. Rapaport (2009). "Signals in bacterial beta-barrel proteins are functional in eukaryotic cells for targeting to and assembly in mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2531-2536.
- Wallace, D. C. and W. Fan (2009). "The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse." Genes Dev **23**(15): 1714-1736.
- Wang, P. and R. E. Dalbey (2011). "Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts." Biochim Biophys Acta **1808**(3): 866-875.
- Webb, C. T., M. A. Gorman, M. Lazarou, M. T. Ryan and J. M. Gulbis (2006). "Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller." Mol Cell **21**(1): 123-133.
- Weber-Lotfi, F., N. Ibrahim, P. Boesch, A. Cosset, Y. Konstantinov, R. N. Lightowers and A. Dietrich (2009). "Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1787**(5): 320-327.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M. T. Ryan, N. Pfanner and C. Meisinger (2003). "Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane." Nature **424**(6948): 565-571.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schönfisch, S. Rospert, M. T. Ryan, N. Pfanner and C. Meisinger (2003). "Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane." Nature **424**(6948): 565-571.
- Wiedemann, N., N. Pfanner and M. T. Ryan (2001). "The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria." EMBO J **20**(5): 951-960.
- Wiedemann, N., K. N. Truscott, S. Pfannschmidt, B. Guiard, C. Meisinger and N. Pfanner (2004). "Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway." J Biol Chem **279**(18): 18188-18194.
- Wiedemann, N., M. van der Laan, D. P. Hutu, P. Rehling and N. Pfanner (2007). "Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain." J Cell Biol **179**(6): 1115-1122.
- Wienhues, U., K. Becker, M. Schleyer, B. Guiard, M. Tropschug, A. L. Horwich, N. Pfanner and W. Neupert (1991). "Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria in vivo." J Cell Biol **115**(6): 1601-1609.
- Wittig, I., H. P. Braun and H. Schagger (2006). "Blue native PAGE." Nature Protocols **1**(1): 418-428.

- Wu, Y. and B. Sha (2006). "Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p." Nat Struct Mol Biol **13**(7): 589-593.
- Yamamoto, H., M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa and T. Endo (2002). "Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes." Cell **111**(4): 519-528.
- Yamano, K., S. Tanaka-Yamano and T. Endo (2010). "Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40." EMBO Rep **11**(3): 187-193.
- Yogev, O., S. Karniely and O. Pines (2007). "Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo." J Biol Chem **282**(40): 29222-29229.
- Young, J. C., N. J. Hoogenraad and F. U. Hartl (2003). "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70." Cell **112**(1): 41-50.
- Zalk, R., A. Israelson, E. S. Garty, H. Azoulay-Zohar and V. Shoshan-Barmatz (2005). "Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria." Biochem J **386**(Pt 1): 73-83.
- Zara, V., A. Ferramosca, P. Robitaille-Foucher, F. Palmieri and J. C. Young (2009). "Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90." Biochem J **419**(2): 369-375.
- Zeth, K. (2010). "Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 1292-1299.
- Zhang, Y., Y. Xu, Q. Zhao, Z. Ji, H. Deng and S. J. Li (2012). "The structural characteristics of human preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane Tim23: implications for its physiological activities." Protein Expr Purif **82**(2): 255-262.
- Zoratti, M. and I. Szabò (1995). "The mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1241**(2):139-176.

