

# EL CÓDIGO POSTAL DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES <sup>1</sup>

Roger Durand

*Un nuevo avance gracias a las técnicas de la ingeniería genética*

Cada célula de organismo superior alberga centenares de pequeños orgánulos intracelulares, las mitocondrias. Éstas son las verdaderas fábricas energéticas de las células y sirven para la producción de energía, en una forma utilizable para las reacciones fisicoquímicas del ser vivo, gracias a una organización tan compleja como precisa. Observándolas a través del microscopio electrónico, aparecen como un «paquete» de membranas: la membrana externa delimita el orgánulo mientras que en el interior una membrana interna contiene un medio viscoso, llamado matriz mitocondrial (véase figura). Una mitocondria comprende, por tanto, cuatro «compartimentos biológicos» distintos. Entre las membranas hay insertos complejos conjuntos de proteínas que aseguran distintas etapas del suministro de energía: esta función vital se basa en una organización muy precisa de las mitocondrias (véase «El acoplamiento de las mitocondrias», en Mundo Científico abril 1986). La forma en que las mitocondrias se acoplan a partir de sus componentes ha sido objeto de investigaciones muy activas. La situación se ha vuelto más compleja aún debido a que los genes que codifican el 90% de las proteínas mitocondriales están situados en el ADN de los cromosomas, o sea fuera de las mitocondrias, y a que estas proteínas

están sintetizadas en el citoplasma, por tanto, fuera también de las mitocondrias. ¿Entonces, cómo encuentran estas proteínas el camino exacto que las lleve del citoplasma al punto necesario para su función, ya en la membrana externa, ya en la interna, ya en otras partes de la mitocondria? Aquí reside un problema bien difícil, el que podríamos denominar “código postal” de las proteínas, y que solamente ahora empieza a aclararse, especialmente gracias a las técnicas de la ingeniería genética.

## **No todas las membranas se parecen**

G. Blöbel y B. Dobberstein, a la sazón en el Instituto Rockefeller de Nueva York, demostraron en 1974-1975 que las proteínas que se encuentran en la membrana que rodea las células eran sintetizadas en forma de un precursor de un tamaño algo superior al de la forma madura. El fragmento suplementario de veinte a veinticinco aminoácidos de largo, situados al inicio de la proteína, servía para dirigir la proteína naciente hacia la membrana. Inmediatamente después de haber cumplido esta función de direccionalidad, esta secuencia (llamada secuencia señal) es eliminada de la proteína aun en síntesis. Por tanto, la orden de que la proteína vaya a la membrana se da en el mismo momento en que aquella se produce. Sé podría preguntar si no sucede lo mismo

---

<sup>1</sup> Mundo Científico Vol. 8 No. 77. 190-191 pag

con las proteínas de las membranas mitocondriales. De hecho, desde 1979 quedó claro que los genes mitocondriales codifican proteínas precursoras que contienen una secuencia señal. El precursor es sintetizado totalmente en el citoplasma antes de encontrarse en las mitocondrias: todos los acontecimientos de transferencia y maduración de las proteínas de membrana ocurren después de sus síntesis. La secuencia señal es, en el caso más general, retirada durante la maduración de la proteínas de las mitocondrias.

### **¿Tienen todas las secuencias la misma estructura?**

Pero para empezar ¿cuál es el código de direccionalidad? ¿Cómo detectar las secuencias señal específicas de las mitocondrias? Varias son las estrategias para hacerlo. Por ejemplo, durante los cinco últimos años, varios equipos de investigadores han aislado una treintena de genes nucleares que codifican sendas proteínas mitocondriales; a partir del ADN de estos genes, es fácil predecir el encadenamiento o secuencia en aminoácidos de la proteína precursora. Por otra parte, como la secuencia de estos aminoácidos de la forma madura de estas proteínas ya era conocida por diferencias entre las dos secuencias de aminoácidos, es posible identificar la secuencia señal.

Pero también es posible identificarla atendiendo a propiedades funcionales: como una secuencia "señal" mitocondrial tiene la función de ordenar a una proteína que vaya hacia una mitocondria y no al núcleo, por ejemplo, si se sitúa mediante ingeniería genética a la cabeza del gen de una proteína normalmente no mitocondrial, la proteína codificada por este gen quimera debería encontrarse en la mitocondria. Técnicamente, el gen quimera preparado así puede transcribirse y traducirse *in vitro* en proteína quimera, cuyo destino en las

mitocondrias se puede seguir. Así, el equipo de G. Schatz <sup>(1)</sup> de Basilea, en 1984, seguido por otros más, <sup>(2,3)</sup> pudieron demostrar que cuando la proteína quimera se añade a una suspensión de mitocondrias aisladas, se fija sobre la membrana externa y después difunde hacia el interior de la mitocondria. Además de la verificación de que la secuencia señal es la que se esperaba, estos experimentos demuestran que es esencial para el reconocimiento de los precursores por la membrana externa de las mitocondrias (sin duda mediante receptores), la etapa preliminar a la migración de la proteína hacia su destino final en la mitocondria.

### **Después del código de la provincia, el de la ciudad.**

Ello equivale a decir que las secuencias señal mitocondriales tienen en común el permitir el reconocimiento de precursores y su entrada en las mitocondrias. Por tanto, se podría pensar que las secuencias señal de las 350 a 100 proteínas mitocondriales distintas deberían parecerse mucho. Lo paradójico es que no es así. Hay muy poco parecido entre las distintas secuencias señal identificadas. Por el contrario, Hurt y A. P. G. M. Van Loon fueron los primeros en observar que estas secuencias presentaban unas propiedades fisicoquímicas muy especiales: todas son muy ricas en aminoácidos cargados negativamente (arginina, lisina) y en grupos hidroxilo capaces de interactuar con el agua (serina, treonina). Esta organización las hace bastante distintas de secuencias señal de las proteínas de membrana, y define, sin duda, las condiciones fisicoquímicas de la interacción entre el precursor y su receptor de la membrana externa de las mitocondrias.

Una vez aclarado este punto nos podemos preguntar qué determina en estas secuencias señal, o en el resto de las proteínas mitocondriales, su dirección hacia un lugar preciso en las mitocondrias. ¿Cuál es la información contenida en secuencia de aminoácidos que hará detener una proteína

en la membrana externa, como es el caso de la proteína llamada 70 000 d o la que va a orientar a la proteína “subunidad IV de citocromo oxidasa” hacia la membrana externa? Los experimentos realizados con proteínas quimeras construidas con una secuencia señal y el enzima bacteriano citoplasmático  $\beta$  galactosidasa de *E. coli* (un enzima muy fácil de detectar mediante varias pruebas)<sup>(4)</sup> permiten llegar a la conclusión de que cualquier información de la direccionalidad intramitocondrial está contenida en la estructura de la secuencia señal. T. Keng, del Massachusetts Institute of Technology enlazó a la  $\beta$  galactosidasa los nueve aminoácidos del extremo de un enzima que se encuentra normalmente en la matriz mitocondrial: pudo encontrarse  $\beta$  galactosidasa en la matriz. Incluso en el caso de proteínas mitocondriales que no llegan a perder la secuencia señal en su maduración se encuentra un código del mismo tipo. La proteína de 70 000 d es un ejemplo de ello, la porción terminal de la proteína muestra unas propiedades fisicoquímicas comparables a la de las secuencias señal de las proteínas precursoras y, de hecho, esta región sirve para el reconocimiento de la proteína por el receptor. Sin embargo, en este caso, el código de direccionalidad es más complejo. Se ha demostrado que se encuentra algo más lejos en la proteína una secuencia de 27 aminoácidos poco solubles en el agua (hidrófobos) y ricos en grupos hidroxilo. Actualmente pensamos, junto con E.C. Hurt, que esta secuencia hidrófoba sirve para anclar a la proteína de 70 000 dalton en la membrana externa siguiendo un código esta vez parecido al de las proteínas de la membrana celular<sup>(5,6,7)</sup> (véase «Las proteínas de membrana», Mundo Científico, diciembre 1987). Si retomamos con E.C. Hurt el conjunto de estos datos,<sup>(8)</sup> estos resultados permiten llegar a la conclusión de que el código de direccionalidad está asegurado por la estructura y la organización de su secuencia señal o al menos de la

extremidad de la proteína. Ello no excluye la presencia de otras informaciones: sin duda hay otros «códigos» internos<sup>(9,10)</sup> en las secuencias de proteínas mitocondriales, que vendrían a complicar el modelo inicial. Por ejemplo, el grupo de G.Schatz,<sup>(11)</sup> de Basilea, acaba de demostrar que se puede construir una proteína quimera con una proteína citoplasmática (que no se difunde normalmente hacia las mitocondrias) y su propia secuencia terminal rica en arginina, lisina, treonina y serina. La proteína quimera llega a difundirse hacia el interior de las mitocondrias. Normalmente, esta secuencia no tiene visiblemente una función de secuencia señal. Así, proteínas banales pueden contener, encerradas en su estructura tridimensional, secuencias que pueden servir de señal ¿Han servido en el curso de la evolución para la «captura» del producto de genes nucleares, por las mitocondrias?

Ello no nos indica si hay tantos receptores de membrana como proteínas mitocondriales distintas. Una manera de abordar el problema consiste en intentar bloquear la penetración de un precursor con la ayuda de un fragmento de proteína correspondiente a la secuencia señal: el grupo de K.B. Freeman de Hamilton, Canadá, realizó en 1985 estos fragmentos idénticos a las secuencias señal de precursores de proteínas mitocondriales. El del enzima ornitina carbamil transferasa puesto en presencia de mitocondrias aisladas impide la transferencia de otras proteínas precursoras mitocondriales.<sup>(12)</sup> Por tanto, los puntos de la superficie externa probablemente no son específicos de una proteína precursora dada.

La última pregunta a la que podemos intentar dar respuesta es saber si todas estas etapas se efectúan sin aporte de energía o, por el contrario, si éste es necesario para la difusión de las proteínas precursoras hacia su objetivo. Las moléculas cargadas positivamente pueden migrar a través de la membrana interna a lo largo de una diferencia

de potencial eléctrico que existe entre una cara y la otra de esta membrana. Las secuencias señal, cargadas positivamente, probablemente se difunden a través de la membrana interna por un proceso de este género, lo que conlleva de esta manera la difusión de la proteína completa. Pero junto a este efecto ligado a una diferencia de potencial, parece que hace falta un aporte energético de otro tipo: unos resultados obtenidos en 1987<sup>(13)</sup> por el grupo de G. Schatz, en Basilea, demuestran que la energía química utilizable (en forma de ATP) también sería indispensable en el exterior de la mitocondria para la transferencia de la proteína estudiada.

El grupo de L.K. Tamiz, en Basilea, ha estudiado la difusión de una secuencia señal en un sistema simplificado de membrana artificial donde no había potencial eléctrico. Así demostró que estas secuencias se difundían a través de la membrana y que se establecían enlaces electrostáticos entre los grupos positivos de la secuencia señal y las cargas negativas de algunos compuestos de membrana.<sup>(14)</sup>

De esta manera, los códigos que presiden el acoplamiento de las mitocondrias están en vías de perder su misterio: toda la información necesaria para la identificación y la direccionalidad de las proteínas mitocondriales está codificada en su misma estructura, menos en forma de secuencias constantes de aminoácidos para un mismo final de la proteína que en forma de bloques distintos pero que tienen propiedades fisicoquímicas idénticas. Por tanto, esta direccionalidad se basa finalmente en un juego entre cargas eléctricas, estructuradas en el espacio y solubilidad en las fases acuosas o lipídicas. Pero además hace falta un aporte de energía química. El punto de acción de esta energía, en cambio, es aún misterioso.

- (1) E. C. Hurt y col., EMBO J., 3, 3149, 1984.
- (2) L. Horvich y col., EMBO J., 4, 1129, 1985.
- (3) M. Van Steg y col., EMBO J., 5, 3643, 1986.
- (4) T. Keng y col., Mol. Cell. Biol., 6, 355, 1986.
- (5) T. Hasse y col., EMBO J., 3, 3157, 1984.
- (6) A. P. G. M. Van Loon, y col., Cell, 44, 801, 1986.
- (7) E. C. Hurt y col., EMBO J., 4, 3509, 1985.
- (8) E. C. Hurt y A.P.G.M. Van Loon, TIBS, 11, 204, 1986.
- (9) A.P.G.M. Van Loon y col., EMBO, J., 3, 1039, 1984.
- (10) R.G. Ridley y col., Nucl. Ac. Res., 14, 4026, 1986.
- (11) E.C. Hurt y G. Schat Nature, 325, 499, 1987.
- (12) L.L. Gillespie y col., J. Biol. Chem., 260, 16045, 1985.
- (13) M. Eilers y col., EMBO J., 6, 1073, 1987.
- (14) L.K. Tamiz, Biochemistry, 25, 7470, 1986.