

LA LEVADURA DEL PAN COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL*

Manuel Gutiérrez-Aguilar^{1*} y Norma Corona de la Peña²

¹Dalton Cardiovascular Research Center, University of Missouri-Columbia, Columbia, Missouri, 65211, USA.

*Correo electrónico: gutierrezaguilarm@missouri.edu

²U. de Inv. en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital Gabriel Mancera, IMSS, México D.F., Mexico.

RESUMEN

Las mitocondrias de mamíferos presentan un canal inespecífico de identidad desconocida llamado Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial. Los estudios para elucidar la estructura proteica de este poro han sido escasos dada la dificultad para generar organismos mutantes carentes de poro. En este sentido, la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) constituye una alternativa para este tipo de estudios ya que presenta un poro mitocondrial de características similares. Por ser un microorganismo facultativo y por ser relativamente fácil manipular su genoma, la levadura *S. cerevisiae* representa un modelo atractivo para descifrar la estructura molecular del poro de transición de la permeabilidad.

PALABRAS

CLAVE:

Mitocondria, transición de la permeabilidad, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Mammalian mitochondria express a structurally unidentified unselective channel termed the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Studies designed to determine the protein structure of this pore have been scarce mainly due to difficulties in generating knock out organisms of potential pore components. In this scenario, baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) represents an appealing alternative since it harbors a pore with similar characteristics. Given the available genetic tools as well as the possibility for this yeast to grow with dysfunctional mitochondria for oxidative phosphorylation, *S. cerevisiae* represents an attractive model to study the molecular structure of the mitochondrial permeability transition pore.

KEY WORDS:

Mitochondria, permeability transition, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un organelo cuyo funcionamiento es de suma importancia para la homeostasis celular. En condiciones normales, la mitocondria genera ATP a partir de azúcares y ácidos grasos. Es también en este organelo en donde convergen vías de degradación de aminoácidos y esqueletos de carbono (1). Las mitocondrias no son consideradas organelos estables por ser un blanco del estrés oxidante y por la sobrecarga de iones Ca^{2+} provenientes del retículo endoplásmico. La inestabilidad puede ser observada durante el daño por isquemia-reperusión (DIR) (2,3). El daño mitocondrial derivado de esta lesión está íntimamente ligado a la inducción de la tran-

sición de la permeabilidad mitocondrial: Un estado en donde la mitocondria cesa sus funciones como proveedor de energía y se convierte en un potente factor de muerte celular (2). El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP) es la estructura responsable de disipar el potencial electroquímico ($\Delta\psi$) utilizado para la síntesis de ATP así como el transporte de iones, solutos y macromoléculas. A pesar de ser un fenómeno ampliamente estudiado a nivel bioquímico, las características estructurales de este poro son poco claras y siguen siendo el tema de investigación de muchos grupos en el mundo (4). Las mitocondrias de la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) representan una herramienta valiosa para el establecimiento de la estructura del

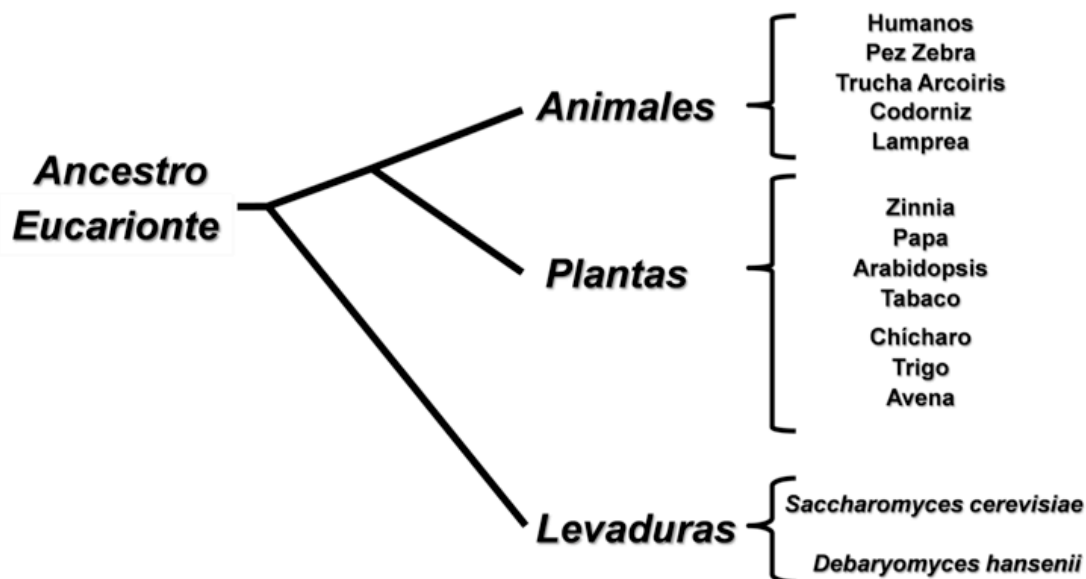


Figura 1. Distribución de los canales inespecíficos mitocondriales en el dominio eucarionte. En la actualidad, estos canales han sido detectados tanto en animales como en plantas y levaduras. Las características de cada canal varían con respecto al organismo en donde son estudiados. Estas diferencias podrían emerger como un medio de adaptación al entorno en donde cada organismo se desarrolla. Actualmente se sabe que estos poros son mas parecidos entre plantas y animales por la sensibilidad a inhibidores clave tales como la ciclosporina A. La figura no representa un diagrama filogenético.

PTP. Lo anterior deriva de que las mitocondrias de *S. cerevisiae* poseen un PTP relativamente conservado (Fig. 1) (2). Al ser un microorganismo facultativo, *S. cerevisiae* puede crecer aún en ausencia de proteínas mitocondriales, lo que sería imposible lograr en un organismo eucarionte superior.

En la presente revisión se abordarán los eventos celulares previos y posteriores a esta transición mediada por períodos de isquemia-reperfusión en mamíferos y con énfasis en la utilización de las mitocondrias de levadura como modelo para la comprensión de la estructura del PTP.

LA MITOCONDRIA Y EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El daño ocasionado por la disminución del aporte de oxígeno a un tejido u órgano por un intervalo de tiempo umbral, seguido de la restitución en dicho aporte es conocido con el nombre de Daño por Isquemia-Reperfusión (DIR). Comúnmente, el daño involucra órganos con un metabolismo energético alto, tales como corazón, músculo esquelético, riñón, hígado y cerebro. Cuando el DIR afecta al cerebro, se le conoce como daño cerebro-vascular isquémico (3). Cuando un tejido presenta DIR, el blanco inicial son todos aquellos procesos dependientes de oxígeno. Entre ellos destaca la fosforilación oxidativa, proceso en el cual una molécula de difosfato

de adenosina (ADP) es fosforilada para dar origen al trifosfato de adenosina (ATP). En condiciones de homeostasis, esta reacción es posible gracias a la catálisis facilitada por la ATP sintasa. Este complejo utiliza como fuerza de síntesis al gradiente de protones establecido a través de la membrana interna mitocondrial (Δp). A su vez, el Δp es establecido por la cadena respiratoria, un supercomplejo de enzimas que utiliza sustratos oxidables generados en la glucólisis y en el ciclo de Krebs, reduciendo O_2 para formar H_2O (1). En condiciones de DIR, el transporte de electrones no se lleva a cabo debido a la ausencia de oxígeno. Por consiguiente, la cadena respiratoria entra en un estado de inactividad caracterizado por la inhibición en el bombeo de protones. Al carecer de combustible, la ATP sintasa se encuentra imposibilitada para catalizar la reacción de fosforilación de ADP, promoviendo la reacción termodinámicamente favorable: La hidrólisis del ATP remanente. Este último proceso tiene repercusiones celulares muy graves ya que múltiples procesos dependientes de ATP tanto a nivel celular como tisular se ven comprometidos. Como vía alternativa de producción de ATP, la célula incrementa la actividad de la glucólisis en condiciones anaeróbicas. Esto origina una acumulación de lactato citosólico y la consiguiente disminución en el pH celular (4). Si el periodo de isquemia es suficientemente largo, el ATP producido por la glucólisis también será totalmente utilizado.

Entre los procesos celulares dependientes de ATP interrumpidos, destaca la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática, originando un colapso en el gradiente de los iones K^+ y Na^+ . Esto ocasiona un incremento notorio en la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de dicha membrana (5). La acumulación creciente de Ca^{2+} en el citoplasma activa el transporte de este catión a la matriz mitocondrial mediante el enigmático uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. En estas condiciones, la mitocondria pasa a convertirse de un organelo esencial para la vida, en un organelo inductor de la muerte celular. Esto es debido a que la inactividad de la cadena respiratoria produce un incremento en la disponibilidad del radical semiquinona, el cual reduce parcialmente moléculas de O_2 para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las especies reactivas de oxígeno favorecen la peroxidación de lípidos y proteínas, originando un cambio en la permeabilidad en las membranas mitocondriales.

EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

Una consecuencia del DIR, es el incremento en la permeabilidad mitocondrial inespecífica a solutos y metabolitos, lo que ha llevado a varios grupos de

investigación a postular la existencia de un PTP (6). La apertura del PTP desencadena el transporte masivo de iones y moléculas a través de la membrana interna mitocondrial cuya masa no exceda los 1.5 KDa. El transporte de especies químicas acompañadas de agua a la matriz mitocondrial origina hinchamiento, despolarización del organelo, aumento en el consumo de oxígeno y eventualmente, la ruptura de las membranas interna y externa. Esto ocasiona la liberación de señales proapoptóticas al citoplasma ocasionando muerte celular programada cuando los niveles de ATP son elevados, y necrosis celular cuando el metabolismo energético de la célula se ha colapsado (Fig. 2) (6). Por su sensibilidad a ligandos de proteínas de las membranas externa e interna mitocondriales, se ha propuesto que este poro se localiza en los sitios de contacto entre las dos membranas. Actualmente se piensa que el PTP está compuesto por un complejo multiprotéico constituido por el translocador de adenín nucleótidos (ANT) y el acarreador de fosfato (PiC) en la membrana interna mitocondrial, el canal aniónico dependiente de voltaje de la membrana externa mitocondrial (VDAC) y la ciclofilina D (CypD) en el espacio matricial (Fig. 1A) (5,7). Sin embargo, diversos experimentos en mitocondrias de mamíferos y de levaduras sugieren que estas

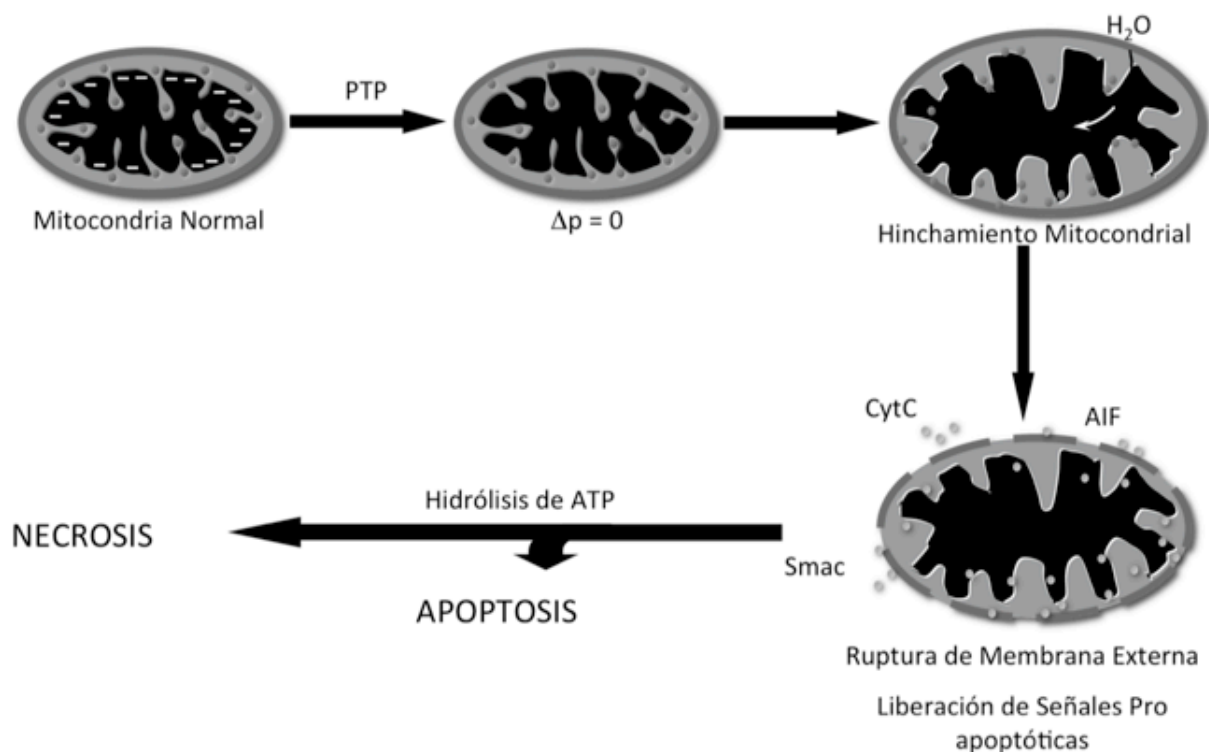


Figura 2. Consecuencias de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitochondrial en mitocondrias de mamíferos.

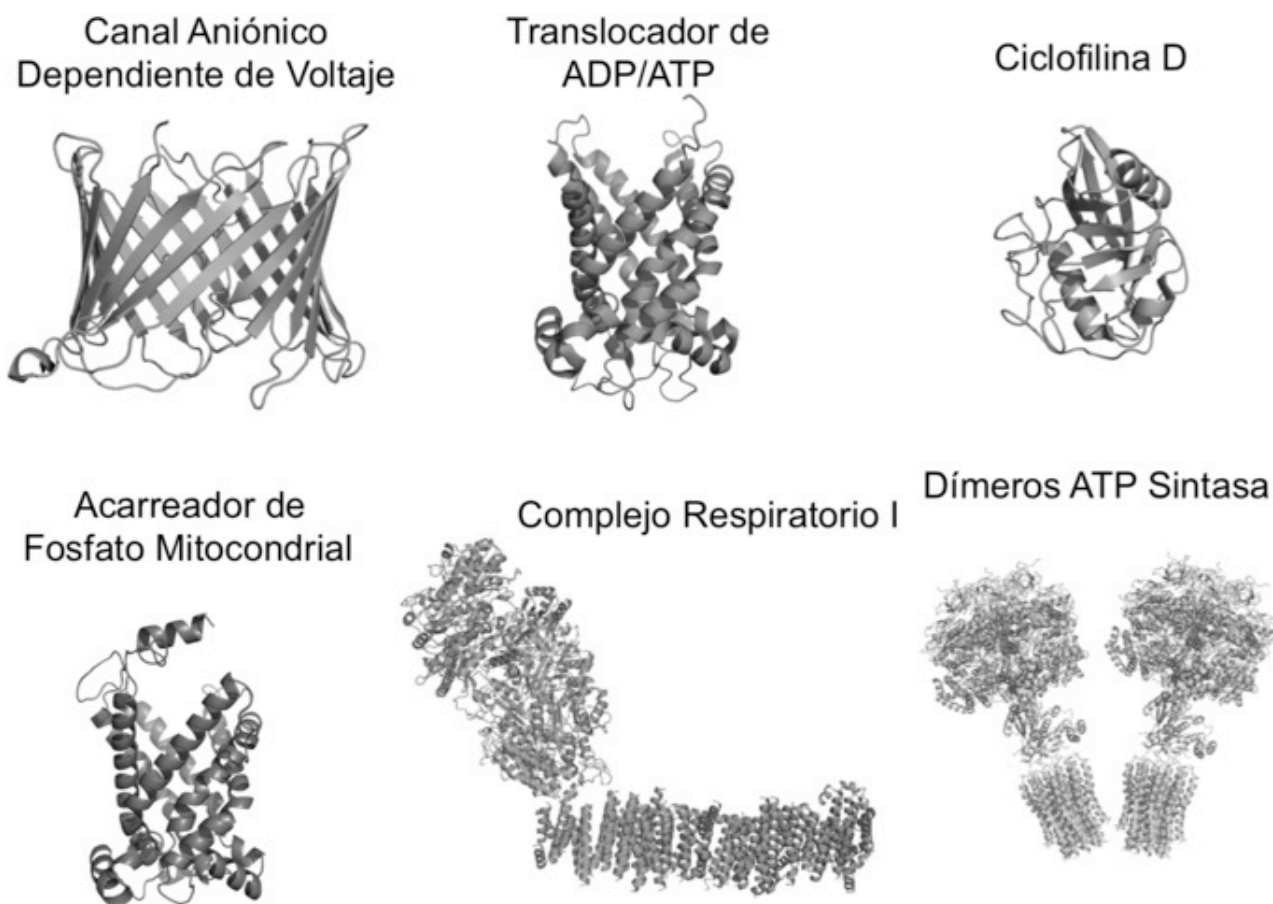


Figura 1. Estructura probable del Poro de Transición de la Permeabilidad en mitocondrias de mamíferos. La porina (VDAC) en la membrana externa mitocondrial ha sido sugerida como un blanco en donde el rojo de rutenio y el Ca^{2+} pueden modular la transición. El translocador de adenín nucleótidos (ANT) ha sido recientemente involucrado en la transición desde un punto de vista regulatorio. El acarreador de fosfato (PiC) ha sido recientemente sugerido como el componente a través del cual son transportados los solutos y metabolitos durante la transición. La ciclofilina D ha sido considerada como un componente regulador del poro. Dímeros de la ATP sintasa ha sido considerada como un probable componente del poro con base a sus propiedades electrofisiológicas. (Modelos generados con Pymol: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

proteínas desempeñan un papel regulatorio más que estructural, pues aun en ausencia de éstas, se sigue detectando el PTP (Fig. 3) (5). Hipótesis recientes proponen que el PTP está formado por dímeros de la ATP sintasa mitocondrial (3). Esto se desprende de experimentos que demuestran la presencia de un megacanal de múltiples estados de conductancia en preparaciones de la ATP sintasa dimérica. La elucidación de los componentes del PTP permitirá el desarrollo de fármacos específicos que permitan bloquear el DIR.

La consecuencia inmediata de la apertura del PTP es la depolarización del organelo (7). Como se mencionó anteriormente, el hinchamiento de la mitocondria ocasiona la incapacidad de estos organelos para recuperar su función productora de energía. En estas condiciones, la célula muere

por necrosis (Fig. 2) (8). La liberación de factores apoptóticos así como de ligandos del receptor al factor de necrosis tumoral al espacio extracelular, inducen la apoptosis extrínseca en las células del tejido aledaño a la zona de isquemia (3). Durante un período de isquemia, el pH del medio intra- y extracelular tiende a descender. En estas condiciones, el PTP se encuentra inhibido (6,7). Actualmente se piensa que la protonación de ciertas histidinas en los componentes del poro, inhiben la apertura del canal en estas circunstancias. Sin embargo, cuando se reanuda el aporte sanguíneo al tejido/órgano, la cadena respiratoria comienza a operar restableciendo un gradiente en la concentración de protones e incrementando el pH celular a niveles cercanos a 7.4. En estas condiciones (elevados niveles de Ca^{2+} mitocondrial, daño por EROs y valores de pH

suprafisiológicos) el PTP inicia el colapso final de la célula (4-8).

EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD EN LAS MITOCONDRIAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Al igual que en mitocondrias de mamíferos, las mitocondrias aisladas de la levadura del pan *S. cerevisiae* presentan un Poro de Transición el cual fue caracterizado hace 18 años por los grupos de Rial y Guérin (9,10). La caracterización del canal inespecífico en *S. cerevisiae* fue motivo de polémica entre ambos grupos, sin embargo, éstos sentaron las bases de su probable función, regulación y estructura. Entre estos descubrimientos destacan la inhibición del canal por fosfato, ADP y Mg^{2+} y su activación por restricción de fosfato y adición de ATP. Durante esos años, Pfeiffer propuso que este canal era un PTP de levaduras (yPTP) no sensible a Ciclosporina A, un inmunosupresor y potente inhibidor del PTP en mamíferos (11). Adicionalmente, Pfeiffer demostró que el yPTP presentaba dimensiones similares al PTP, lo cual sugería que ambas eran estructuras equivalentes. En este estudio se demostró que el yPTP no era inducido por Ca^{2+} a menos que se adicionara un ionóforo de Ca^{2+} , demostrando que las mitocondrias de levadura carecen de un sistema uniportador del catión. Esto reubicó el estudio de la transición de la permeabilidad en levaduras y resaltó sus similitudes como un probable modelo para el estudio de patologías mitocondriales en mamíferos como las detectadas durante el DIR y distrofias musculares (12, 13). Es importante recalcar las limitaciones de este modelo. Por ser un organismo facultativo, *S. cerevisiae* manifiesta adaptaciones a la supresión del aporte de oxígeno que no presentan organismos eucariontes superiores y por lo tanto serían un mal ejemplo para el estudio del poro desencadenado por el DIR. Paradójicamente, el ser una levadura facultativa le otorga a *S. cerevisiae* ventajas sobre organismos superiores para el estudio de la fisiología mitocondrial (ver el párrafo siguiente).

Un ejemplo de las ventajas que ofrece *S. cerevisiae* para poder determinar la estructura del yPTP (y probablemente del PTP), es la capacidad que presenta éste para crecer con mitocondrias carentes de proteínas esenciales para la fosforilación oxidativa y muchos otros procesos. Esto permite evaluar la pérdida de sensibilidad a inhibidores reportados para ambos poros como el Mg^{2+} , mersalil y mastoparan en levaduras carentes (mutantes nulas) de probables componentes del yPTP (2). Este es el caso de la pérdida de sensibilidad en levaduras mutantes nulas de VDAC a octilguanidina (OG), un inhibidor del daño por isquemia-reperfusión (13,14). A di-

ferencia de lo observado en mitocondrias aisladas de una cepa silvestre, en mitocondrias carentes de VDAC, la OG no inhibe el hinchamiento mitocondrial y la caída en el $\Delta\Psi$ (14). Los resultados sugieren que VDAC podría ser considerado el blanco en donde la OG inhibe el PTP de mitocondrias de mamíferos (13). Es importante resaltar que llevar a cabo experimentos con mutantes de VDAC en mamíferos no es posible, primero porque tienen tres isoformas del canal y la supresión genética de la isoforma 2 resulta en la muerte del organismo en el estado embrionario (5). Otro caso en donde la levadura permitió determinar el sitio de interacción de un efector del PTP se dio al evaluar el efecto del fosfato y del mersalil sobre el yPTP (15). El fosfato ha sido recientemente catalogado como un inhibidor del PTP y desde hace casi 30 años ha sido utilizado como inhibidor del yPTP (12). Éste es transportado gracias al PiC, el cual deja de funcionar al ser inhibido por mersalil. Experimentos de bioenergética clásica en una cepa mutante nula de PiC en *S. cerevisiae* permitieron elucidar que tanto el fosfato como el mersalil perdían sus efectos de antagonista y agonista del yPTP respectivamente (15). Esto sugiere que el sitio de unión de ambas moléculas es a nivel del PiC.

Un caso más controvertido de similitud entre el PTP y el yPTP se dio cuando se determinó que el Ca^{2+} presentaba un efecto dual en el PTP: A bajas concentraciones, promovía el estado abierto del poro, lo cual se observa durante el DIR. Sin embargo, experimentos de un grupo líder en el ramo demostraron que en presencia de muy bajas concentraciones de rojo de rutenio (Un complejo de rutenio que inhibe la entrada de calcio a la mitocondria), el Ca^{2+} inhibía la apertura del PTP en concentraciones muy similares a las reportadas para la inhibición del yPTP en levadura (13). Experimentos subsecuentes con mitocondrias purificadas de una cepa mutante nula de VDAC permitieron demostrar que el Ca^{2+} interactúa con VDAC para inducir el estado cerrado del yPTP (13).

CONCLUSIONES

El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial es probablemente una estructura conservada en organismos eucariontes. En la actualidad, un número creciente de inhibidores del PTP son reportados. Sin embargo, el sitio o mecanismo a través del cual cumplen sus funciones por lo general no es determinado. En este sentido, la utilización de mitocondrias de *S. cerevisiae* para establecer el blanco de los ligandos reportados representa un modelo relativamente confiable y de fácil utilización para comprender las relaciones estructura-función del PTP de mamíferos y con ello contribuir al dise-

ño racional de fármacos inhibidores del daño por isquemia-reperusión.

Agradecimientos

Manuel Gutiérrez-Aguilar agradece al CONACyT el apoyo otorgado para la realización de una estancia

postdoctoral con el apoyo del programa "ESTANCIAS POSDOCTORALES Y SABÁTICAS AL EXTRANJERO PARA LA CONSOLIDACIÓN DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN 2011". Agradecemos al Dr. Salvador Uribe-Carvajal por los comentarios y sugerencias hechas al manuscrito. 

REFERENCIAS

1. Lehninger AL ND, Cox MM (1993) Principles of Biochemistry Worth Publishers, New York, NY, USA: 1013.
2. Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2010) The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 584:2504-2509.
3. Kerrigan CL, Stotland MA. (1993) Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery.* 14:165-175.
4. Halestrap AP, Pasdois P (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1402-1415.
5. Halestrap AP (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46: 821-831.
6. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. (2013) Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:5887-5892.
7. Zoratti M, Szabo I (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176.
8. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ (2006) Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43: S31-44.
9. Prieto S, Bouillaud F, Ricquier D, Rial E (1992) Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur J Biochem* 208: 487-491.
10. Manon S, Roucou X, Guerin M, Rigoulet M, Guerin B (1998) Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? *J Bioenerg Biomembr* 30: 419-429.
11. Jung DW, Bradshaw PC, Pfeiffer DR (1997) Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 272:21104-21112.
12. Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2010) The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 584:2504-2509
13. Pavon N, Aranda A, Garcia N, Hernandez-Esquivel L, Chavez E (2009). In hyperthyroid rats octylguanidine protects the heart from reperfusion damage. *Endocrine* 35: 158-165.
14. Gutierrez-Aguilar M, Perez-Vazquez V, Bunoust O, Manon S, Rigoulet M, Uribe S (2007) In yeast, Ca²⁺ and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1245-1251.
15. Uribe-Carvajal, S, Luévano-Martínez, L A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Peña, N. A., Gutiérrez-Aguilar, M (2011) Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion* 11: 382-390.