

LA FAMILIA DE TRANSPORTADORS MITOCONDRIALS: LA TRANSLOCASA ADP/ATP

OCTAVI VIÑAS

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. Barcelona 08028, Catalunya, Espanya.

INTRODUCCIÓ

Els mitocondris, presents en quasi totes les cèl·lules eucariotes, són orgànuls citoplasmàtics especialitzats en la conversió de l'energia d'oxidació en energia quimioosmòtica i química, que la conserven en forma d'ATP, mitjançant el procés de la fosforilació oxidativa (Mitchell, 1979). Per a la realització d'aquesta tasca, un dels principals requisits és una alta impermeabilitat de la membrana mitocondrial interna (MMI). El mitocondri també realitza altres funcions metabòliques i per tant ha d'existir un flux de metabòlits entre el citosol i el mitocondri. Aquest flux és possible per l'existència en la membrana mitocondrial interna de tot un seguit de proteïnes amb una relativament alta especificitat per a transportar molècules. Hi ha, com a mínim, nou proteïnes transportadores d'anions en aquesta membrana, tres transportadors coneguts de cations i com a mínim un que transporta molècules neutres (Figura 1). Per a poder dur a terme la fosforilació oxidativa, el mitocondri necessita ADP i fosfat inorgànic (P_i) provinents

del citosol i a la vegada ha de poder extreure l'ATP generat en aquest procés dins el mitocondri per a les necessitats energètiques de la resta de la cèl·lula. Per aconseguir-ho, hi han d'intervenir dos transportadors: el translocador d'ADP/ATP (AAC) i el transportador de P_i (PIC). El transportador de piruvat (PYC) en subministra a la matriu mitocondrial en la fase catabòlica del metabolisme per a proporcionar d'àtoms de carboni el cicle de Krebs, i durant la fase anabòlica per a iniciar la síntesi de glucosa. El translocador d'aspartat/glutamat (AGC) i el transportador d'oxoglutarat (OGC) són necessaris no només en la síntesi de glucosa i en el metabolisme nitrogenat sinó que també formen part essencial del sistema de llançadores de regeneració de NAD^+ citosòlic en la glucòlisi. El transportador d'àcids dicarboxílics (DIC), com el malat, participa en la síntesi de glucosa i en la d'urea. El transportador de citrat (CIC) és essencial en la biosíntesi d'àcids grassos. El transportador de glutamat (GC) participa en la síntesi d'urea i en el

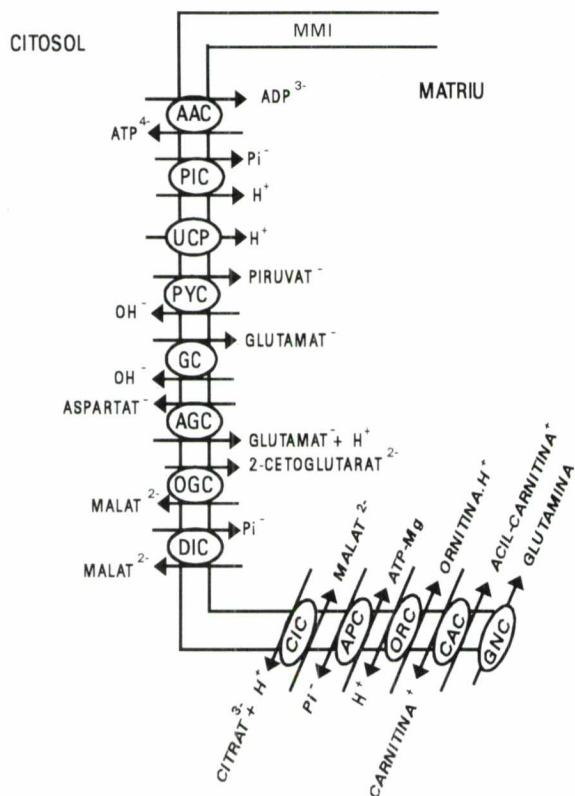


FIGURA 1. Transportadors de la membrana mitocondrial interna. Les abreviatures són: AAC, translocador ADP/ATP; PIC, transportador de fosfat inorgànic; UCP, proteïna desacobladora; PYC, transportador de piruvat; GC, transportador de glutamat; AGC, transportador de glutamat/aspartat; OGC, transportador d'oxoglutarat/malat; DIC, transportador d'àcids dicarboxílics; CIC, transportador de citrat; APC, transportador d'ATP-Mg/Pi; ORC, transportador d'ornitina; CAC, transportador de carnitina; GNC, transportador de glutamina. MMI, membrana mitocondrial interna.

metabolisme nitrogenat més general. I potser el menys conegut, el transportador ATP-Mg/P_i (APC), és el responsable de l'increment en la concentració de nucleòtids d'adenuina de la matriu mitocondrial durant el desenvolupament, la qual cosa indueix la maduració funcional del mitocondri. A part d'aquests, també són importants diferents transportadors de cations, com el transportador d'ornitina (ORC) essencial en la síntesi d'urea i el transportador de carnitina (CAC) en l'oxidació d'àcids grassos, o el transportador de glutamina (GNC) en els mitocondris d'alguns teixits. Finalment, cal citar la proteïna desacobladora (UCP) del teixit adipós marró, translocador de protons, que desacobla la fosforilació oxidativa i permet la dissipació del gradient electroquímico en forma

de calor. Té així una funció termogènica, i encara que no sigui estrictament un transportador de metabòlits, la seva estructura i el seu funcionament fan necessari d'incloure'l aquí.

No tots els mitocondris contenen tots els transportadors. Els que estan relacionats amb la fosforilació oxidativa (AAC i PIC) es troben en tots els mitocondris. Els transportadors que permeten l'entrada al mitocondri d'equivalents reductors o substrats per la fosforilació oxidativa (PYC, CAC, OGC, AGC) es troben distribuïts àmpliament. Altres transportadors tenen una distribució limitada i reflecteixen el seu paper en funcions especials, com la gluconeogènesi (DIC), la síntesi d'àcids grassos (CIC), la síntesi d'urea (ORC, GC, i GNC) o la termogènesi

TAULA I. Progressos fets en l'estudi de transportadors mitocondrials

	AAC	PIC	OGC	UCP	CIC	AGC	DIC	PYC	APC	GC	CAC
Purificació	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	±
Reconstitució	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	±
Anàlisi cinètica	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
cDNA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Seqüència gens	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Topologia	±	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-
Expressió funcional	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sobreexpressió	+	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cristal·lització	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estructura 3D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Regulació gen	±	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cromosoma humà	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

El signe + indica que l'aspecte concret està resolt, o que s'ha fet molt treball. El signe - indica que pràcticament es desconeix, no s'ha provat o no s'ha aconseguit. El signe ± indica que, encara que s'hi ha treballat, queda feina per fer. (Vegeu les abreviatures a la figura 1).

(UCP). Malgrat que siguin característics de la MMI, la majoria d'aquests transportadors es troben en quantitats minúscules. Només AAC, PIC i UCP poden representar un percentatge important de la proteïna de la MMI.

El grau de coneixement que es té actualment d'aquests diferents transportadors és força variable. En la taula I es resumeix, no de manera exhaustiva, l'estat de la qüestió per a la majoria d'aquests transportadors. Tres dels transportadors aniònics (AAC, PIC, OGC) i la UCP s'han purificat, reconstituït, clonat, seqüenciat i s'han expressat de manera funcional en un sistema heteròleg. Del CIC, de què existeixen dues isoformes no relacionades, també s'han obtingut valuoses dades sense arribar, però, a l'expressió funcional.

Per la seva relativa simplicitat, els transportadors mitocondrials són un model clau per al nostre coneixement del mecanisme molecular del transport a través de membranes. Aquests transportadors són molècules petites (28-34 KD) i les estructures primàries fins ara conegudes demostren que molts d'aquests estan clarament relacionats

des del punt de vista evolutiu i funcional.

S'han construït models molt il·lustratius del mecanisme de transport, però aquests són encara hipotètics, car no ha estat possible fins ara la cristal·lització de cap d'aquests transportadors i, per tant, en desconeixem les estructures tridimensionals. El mecanisme de transport junt amb la caracterització gènica i la seva regulació, són, sens dubte, els principals punts que la investigació sobre les proteïnes transportadores haurà d'encarar en un futur immediat.

ESTRUCTURA PRIMÀRIA: FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS MITOCONDRIALS

Actualment es coneix la seqüència d'aminoàcids de cinc transportadors mitocondrials que han estat bioquímicament ben caracteritzats, AAC, UCP, PIC, OGC i CIC, bé per seqüència directa de la proteïna o per seqüència DNA (Aquila *et al.*, 1982b; Aquila *et al.*, 1985; Runswick *et al.*, 1987; Runswick *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1993; Azzi *et al.*, 1993).

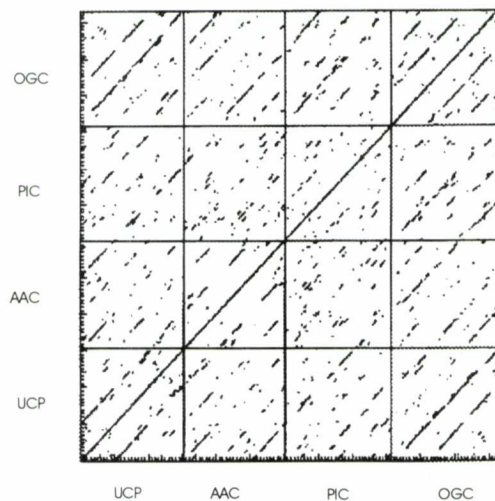


FIGURA 2. Comparació de seqüències del transportadors mitocondrials. S'han emprat les seqüències bovines, excepte per a la UCP, que és de hámster. Les comparacions s'han realitzat amb el programa DIAGON. La finestra emprada és de 25 aminoàcids. Vegeu les abreviatures a la figura 1.

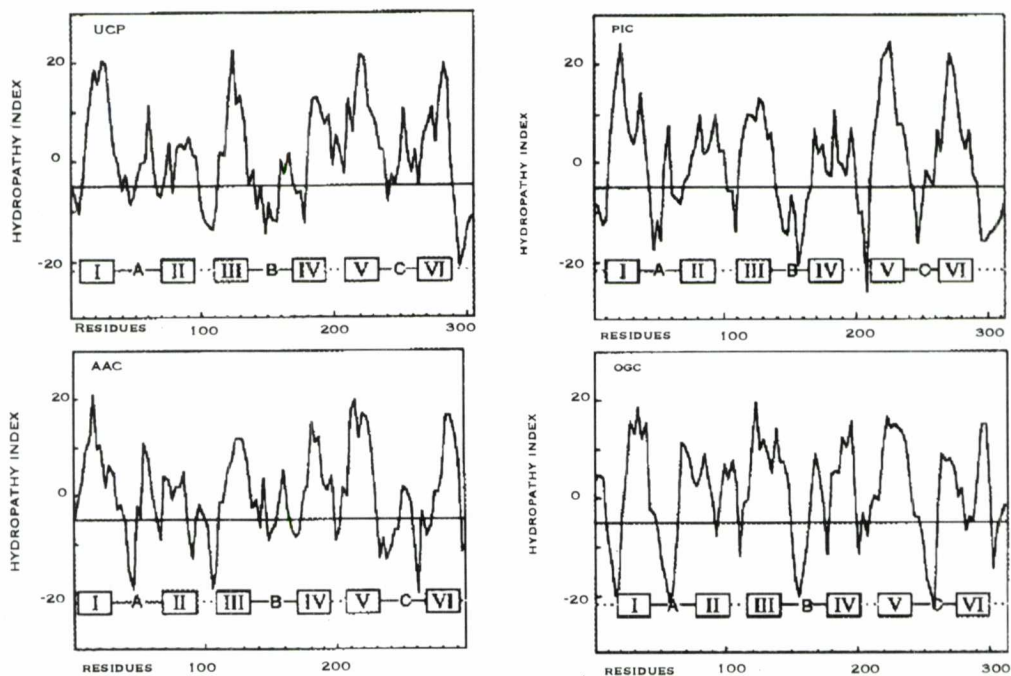


FIGURA 3. Perfils d'hidrofobicitat de quatre transportadors mitocondrials. Les seqüències emprades són les mateixes que les de la figura 2. Per cada perfil, les caixes I-VI indiquen les posicions de les possibles hèlix α transmembrana. Els segments A, B i C representen regions més hidrofíliques. Els tres dominis relacionats que es troben en cadascuna de les seqüències consisteixen en I-A-II, III-B-IV i V-C-VI.

La primera seqüència coneguda fou la de l'AAC de mitocondris de cor de bou en 1982. Fou, de fet, la primera proteïna transportadora purificada (Aquila *et al.*, 1982a) i seqüenciada (Aquila *et al.*, 1982b). Des de llavors l'AAC de 13 organismes ha estat seqüenciada, des de microorganismes a plantes i animals (20 seqüències, incloent-hi isoformes), la UCP de 6, el PIC de 5 i l'OGC de 4 espècies i el CIC d'una, però dues isoformes que no semblen estar relacionades. La comparació de la seqüència inicial de l'AAC amb si mateixa ja va revelar alguns trets característics que s'han anat repetint en les seqüències dels altres transportadors, excepte la d'un dels CIC seqüenciats: tots presenten una estructura tripartida, de seqüències relacionades d'uns cent aminoàcids de llargària (Figura 2). Cada element repetit conté dues regions hidrofòbiques, per tant sis en total (I-VI), separades per una llarga regió hidrofílica (A-C) (Figura 3). L'alineament de les seqüències primàries dels cinc transportadors (Figura 4) mostra la conservació total de catorze residus i la substitució altament conservativa d'uns altres trenta. També cal destacar la seqüència motiu P. X. D/E-(20-30 aminoàcids)-D/E. G-(4 aminoàcids)-aminoàcid aromàtic-K/R. G, que inclou la prolina i l'aminoàcid acídic conservats, que es troben en molts dels dominis repetits (Walker i Runswick, 1993). Aquestes característiques, és a dir, una llargària d'aproximadament tres-cents aminoàcids, l'estructura tripartida, la presència de dues regions hidrofòbiques en cada domini i la seqüència motiu repetida tres cops mostren clarament que aquests cinc transportadors pertanyen a la mateixa família de proteïnes. Tots provindrien d'un ancestre comú per processos de duplicació gènica. Aquests trets característics de la família mitocondrial de transportadors han permès identificar altres proteïnes, de funció encara desconeguda, com a membres d'aquesta família,

com les anomenades MRS3 i MRS4 de *Saccharomyces cerevisiae* (probablement, isoformes de la mateixa proteïna), que hom ha relacionat amb el procés de *splicing* de l'RNA mitocondrial, però podrien estar involucrades en el transport de poliamines (Wiesenberger *et al.*, 1991), una proteïna expressada en el tiroide associada a la malaltia de Grave (Zarrilli *et al.*, 1989), una proteïna del protozou *Oxytricia fallax* (Williams i Herrick, 1991), dues proteïnes codificades en els cromosomes IX i XI de *S. cerevisiae* (Colleaux *et al.*, 1992), i quatre proteïnes del nemàtode *Caenorhabditis elegans* (Runswick *et al.*, 1994). Més recentment s'han descrit dues proteïnes més amb les característiques d'aquesta família: la brittle1 de blat de moro i la PMP47 de *Candida boidinii* (vegeu les referències a Palmieri, 1994) localitzades en amiloplasts i peroxisomes, que si es confirma la seva pertinença a aquesta família implicaria que aquesta família de proteïnes transportadores no estaria restringida al mitocondri. En total, es creu que aquesta família de transportadors, la formarien més de setze membres diferents.

ESTRUCTURA SECUNDÀRIA I TOPOLOGIA TRANSMEMBRANA

Les dues regions hidrofòbiques que es troben en les tres repeticions són suficientment llargues per a travessar la membrana mitocondrial interna. Basant-se en aquesta estructura tripartida de l'AAC, ja en 1982, Saraste i Walker proposaren que cada domini repetit, consistiria en dues hèlix α transmembrana, formant una estructura amb 6 hèlix α (I-VI) en total (Figura 5). Dins de cada domini, les dues hèlix α serien unides per una seqüència llarga, més polar (A, B i C), mentre que els tres dominis serien connectats per dues seqüències curtes d'aminoàcids hidrofílics (Saraste i Walker, 1982).

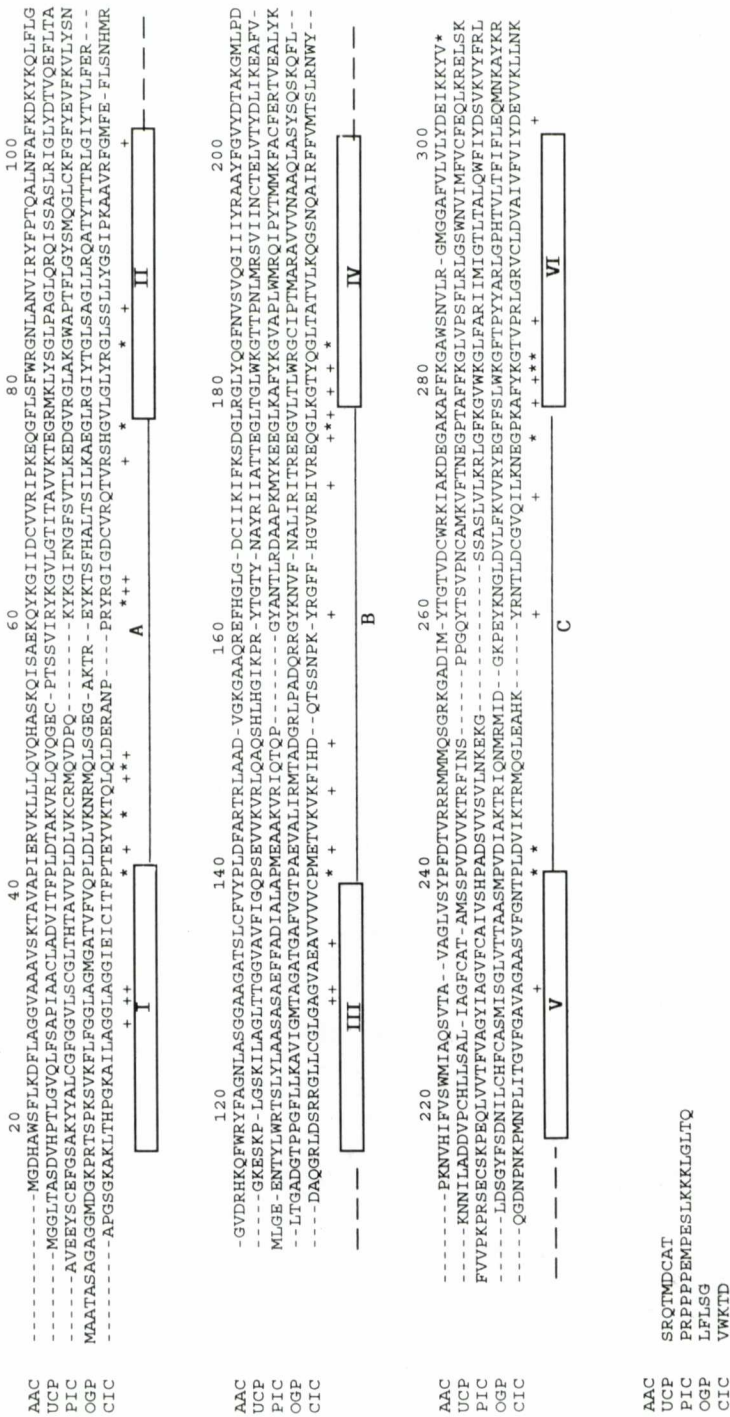


FIGURA 4. Comparació de l'estructura primària dels transportadors mitocondrials seqüenciats fins ara. Les seqüències estan alineades pels elements repetits. Els asteriscs indiquen identitats, mentre que les creus, indiquen substitucions altament conservatives. Les seqüències que es mostren són les humanes per a AAC (isoforma T1). UCP, OGC i la rata per a CIC. Les caixes numerades I-VI representen les possibles hèlixs α transmembrana. Les regions A-C representen les regions hidrofòliques que uneixen els segments transmembrana. Les línies discontinues indiquen les regions curtes hidrofòliques que uneixen les tres repeticions.

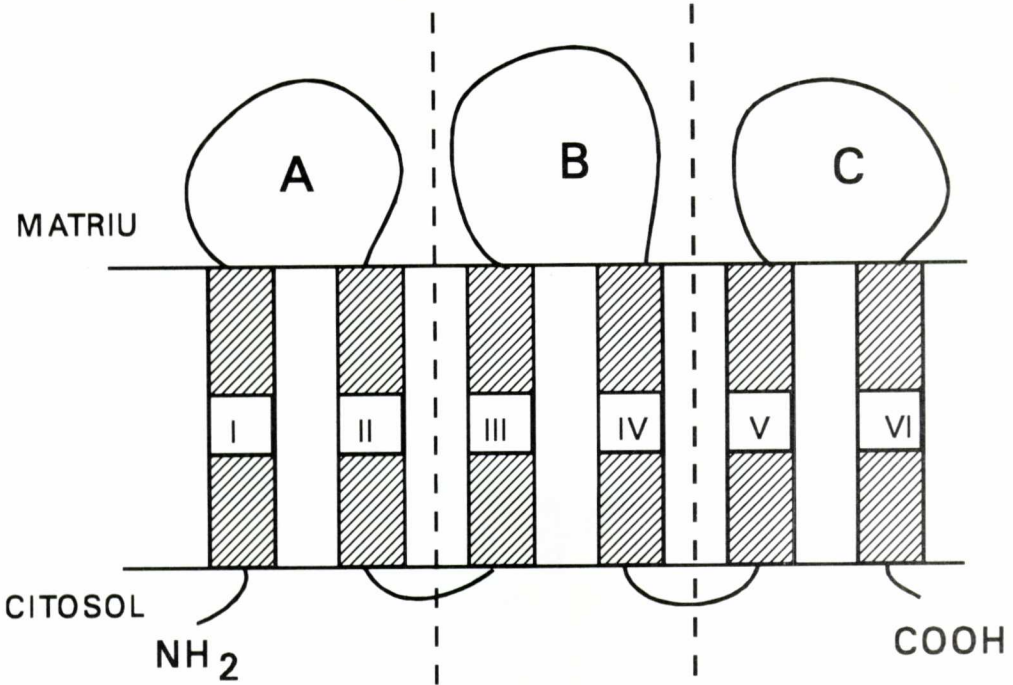


FIGURA 5. Model general de sis hèlix α (sis dominis transmembrana) de les proteïnes transportadores mitocondrials. La línia de punts indica que les proteïnes tenen tres repeticions estructurals. Noteu que el model implica que els extrems C- i N-terminals han de tenir la mateixa orientació. Les dades experimentals indiquen que aquesta orientació seria la citosòlica (vegeu el text).

Aquest model prediu que els extrems N- i C-terminals de la proteïna seran a la mateixa cara de la membrana, ja sigui la de la matriu, ja sigui la citosòlica, que els segments hidròfils que connecten les dues hèlix α de cada domini (A, B i C) es trobaran en una mateixa cara de la membrana, oposada a la dels extrems N- i C-terminal, i que els segments més curts de connexió dels dominis, es trobaran en l'altra (Figura 5).

Moltes de les dades experimentals obtingudes estan d'acord amb aquest model. Així, per exemple, s'ha comprovat en el cas del PIC (Capobianco *et al.*, 1991), de la UCP (Miroux *et al.*, 1993) i de l'OGC (Bisaccia *et al.*, 1994), emprant anticossos específics contra pèptids de la regió C- i N-terminal i l'accés de la proteïna a enzims proteolítics, que els extrems N- i C-terminals es troben

orientats cap al citosol, mentre que els *loops* A, B i C estan orientats cap a la matriu. També s'ha observat, aplicant el mateix tipus de tècniques, que l'extrem N-terminal de l'AAC està exposat a la cara citosòlica de la membrana, i que els *loops* A, B i C són accessibles a proteases per la cara de la matriu (Marty *et al.*, 1991).

ESTUDIS FUNCIONALS

La purificació de diferents proteïnes transportadores ha permès caracteritzar-les cinèticament i s'ha obtingut informació important impossible d'aconseguir amb mitocondris o partícules submitocondrials. Aquests estudis funcionals s'han realitzat reconstituïnt els transportadors en liposo-

mes. S'han obtingut dades sobre l'especificitat de substrat, afinitats, nombre de llocs d'unió, interacció amb inhibidors, influència del pH i de fosfolípids, etc. (per revisió vegeu Palmieri *et al.*, 1993). Concretament, s'han obtingut valors de K_m tant del lloc extern com de l'intern del proteoliposoma i s'ha observat que, com a mínim pel que fa a un substrat, tots els transportadors presenten una K_m aparent significativament diferent per al substrat intern i extern (Taula II). També s'ha comprovat que, a excepció de l'AAC, els transportadors es col·loquen de manera unidireccional en la membrana liposomal. Estudis de velocitat inicial amb

dos substrats han mostrat que AGC, OGC, CIC, DIC i PIC reconstituïts funcionen d'acord amb el que s'anomena *mecanisme simultani* o *seqüencial* (Taula II), que implica que perquè es dugui a terme el transport, s'ha d'haver format prèviament un complex ternari entre el transportador, el substrat intern i l'extern. Per això, s'ha proposat que els transportadors mitocondrials formarien no només una família estructural sinó també una família funcionalment homogènia caracteritzada per un mecanisme cinètic comú. Per a l'AAC si bé el model més acceptat és el de ping-pong (per revisió vegeu Klingenberg, 1989), és a dir que només hi ha

TAULA II. Dades cinètiques de transportadors mitocondrials purificats i reconstituïts

Transportador	Substrat	K_m (mM) extern	K_m (mM) intern	Mecanisme cinètic
AAC	ATP ADP	0,01 0,01	0,025	n. d.
PIC	P_i/P_i P_i/OH	1,8	9,4 11,2	Simultani Simultani
OGC	Oxoglutarat Malat	0,31 1,36	0,17 0,71	Simultani Simultani
DIC	Malat Fosfat	0,49 1,41	0,92 0,93	Simultani Simultani
CIC	Citrat Malat	0,032 0,25	0,027 0,06	Simultani Simultani
AGC	Aspartat Glutamat	0,12 0,25	2,8 3,0	Simultani Simultani
CAC	Carnitina (bescanvi) Carnitina (uniport)	1,1 0,53	10 2,2	ping-pong
ORC	Ornitina	0,16	4	n. d.
PYC	Piruvat	0,24	n. d.	n. d.

n. d. no determinat. Vegeu les referències a Palmieri *et al.*, 1993 i a Palmieri, 1994.

un únic lloc d'unió, el qual alternativament està exposat a ambdues cares de la membrana; també s'ha descrit el mecanisme seqüencial (per revisió vegeu Brandolin *et al.*, 1993), però de tota manera i curiosament no ha estat encara validat cap model per a l'AAC en sistemes reconstituïts. Dels transportadors mitocondrials coneguts, només n'ha estat demostrada una excepció, el CAC, que presenta un mecanisme de tipus ping-pong (Indivery *et al.*, 1994). Per altra banda, el CAC és l'únic transportador mitocondrial que s'ha demostrat capaç de realitzar tant intercanvi com uniport (Taula II). Encara que la coexistència dels mecanismes de ping-pong i seqüencial dins d'una mateixa família de transportadors sembla que és possible, com es demostra pel cas de la família de transportadors d'anions dels eritròcits, no coneixem la seqüència de CAC i, per tant, si pertany realment a la família de transportadors mitocondrials.

Una característica interessant de l'AAC i d'altres membres de la família de transportadors és que poden ser convertits de manera reversible per tractament amb diferents derivats mercurials, com el mersalyl, en un estat funcional diferent del transport fisiològic (Dierks *et al.*, 1990). Aquest tipus de transport no fisiològic es caracteritza per una inhibició de les funcions del transport fisiològic i l'aparició d'un flux unidireccional de substrat amb una pèrdua més o menys completa d'especificitat. Aquest nou tipus d'activitat es pot interpretar considerant la presència d'un canal intrínsec no específic, el qual es trobaria normalment amagat per la pròpia estructura de la proteïna. Aquesta interpretació seria una bonica manera d'explicar l'aparició de transportadors específics a partir de simples canals o porus, que evolucionen gradualment a estructures funcionals més i més complexes.

GENS I ISOFORMES

Es coneixen les seqüències dels gens d'AAC, UCP, OGC i PIC. És interessant que les estructures d'aquests gens semblen relacionades, ja que contenen introns en posicions relatives similars. Fins al moment present s'han descrit tres isoformes de l'AAC codificades per tres gens diferents (Cozens *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1989; Ku *et al.*, 1990), seqüenciats els tres, en humans, que presenten una certa especificitat de teixit en l'expressió (Stepien *et al.*, 1992). Només un gen s'ha descrit per a UCP (Cassard *et al.*, 1990) i OGC (Iacobazzi *et al.*, 1992), i les anàlisis *Southern blot* revelen que no hi ha altres seqüències relacionades en el genoma. Per al PIC s'han descrit dos mRNA, amb una certa especificitat tissular en l'expressió, però només un gen (Dolce *et al.*, 1994). Les dues isoformes sorgeixen d'un procés de *splicing* alternatiu que afecta els aminoàcids 4-45 de la proteïna madura (Dolce *et al.*, 1994). Un transcrit s'expressa majoritàriament al fetge i al cor, mentre que l'altre ho fa al pulmó (Dolce *et al.*, 1994). No es coneix si hi ha diferències funcionals entre les dues proteïnes que es generen en aquest procés.

BIOGENÈSI I IMPORTACIÓ AL MITOCONDRI

Tots els transportadors mitocondrials estan codificats en el genoma nuclear, per tant se sintetitzen en el citosol i han de ser importats al mitocondri. L'AAC, la UCP, l'OGC i el PIC de llevat se sintetitzen sense cap preseqüència d'importació, mentre que el PIC i el CIC de mamífer presenten preseqüències trencables de diferents llargàries. L'absència de preseqüència implica que la informació de destí ha d'estar compresa en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna madura. En el cas de l'AAC, s'ha comprovat

que aquesta informació es troba repetida en les tres regions de la seva estructura tripartida, és a dir que cada una d'aquestes es pot inserir de manera autònoma. Fins i tot en el cas del PIC de mamífer, que té preseqüència, s'ha determinat que la informació majoritària de direccionalitat resideix també en la seqüència de la proteïna madura (Pratt *et al.*, 1991; Zara *et al.*, 1992). La preseqüència tindria, doncs, un paper més aviat redundant i prescindible. La importació de UCP i OGC es realitza mitjançant la via d'importació general (per revisió vegeu Harlt *et al.*, 1989). Per tant, requereix factors citosòlics, ATP i potencial de membrana. De manera diferent a la majoria de proteïnes mitocondrials, sembla que l'AAC i el PIC utilitzarien de forma preferent un receptor de la membrana mitocondrial externa especial, MOM72 (Schlossmann *et al.*, 1994). D'altra banda, l'AAC i la UCP s'insereixen directament a la MMI sense passar primer per la matriu, és a dir que utilitzarien l'anomenada *via no conservativa* (Harlt *et al.*, 1989).

TRANSLOCADOR D'ADP/ATP

Cinètica del transport

El translocador d'ADP/ATP (AAC) catalitza l'intercanvi a través de la membrana mitocondrial interna d'ADP citosòlic per ATP generat en la fosforilació oxidativa. El transport és exclusivament de les formes lliures i no accepta els complexos amb Mg^{2+} , que, per altra banda, és la manera com es troben de manera molt majoritària a l'interior de la cèl·lula. L'estequiometria del procés és 1:1, amb la qual cosa l'activitat d'aquest transportador no té un efecte sobre la concentració de nucleòtids d'adenina ni en el citosol ni en el mitocondri, però sí sobre la relació ADP/ATP. Tenint en compte la diferència de càrrega elèctrica entre l'ADP³⁻ i

l'ATP⁴⁻ a pH fisiològic, i que no hi ha compensació directa de càrrega per moviment de protons, s'ha de considerar aquest transport com a electrogènic. L'energia per a realitzar aquest intercanvi prové del potencial de membrana de la MMI. S'ha calculat que l'energia necessària per a exportar l'ATP generat en la fosforilació oxidativa és el 30 % de l'energia obtinguda en la respiració mitocondrial en termes de força protomotriu.

Les mesures cinètiques realitzades amb mitocondris purificats mostraren que el transport és asimètric. L'AAC té preferència perquè transporta ADP dins el mitocondri i n'extreu ATP respecte al procés invers, encara que s'augmenti molt la concentració externa d'ATP. Els paràmetres cinètics d'aquest transport es veuen profundament influïts per la natura dels nucleòtids interns i externs, i per la presència o absència de potencial de membrana. Així, canvis en la composició de nucleòtids interns provoquen canvis paral·lels en la K_m i $V_{m\max}$ pel que fa al transport d'ADP extern, i suggereixen un mecanisme de transport de tipus ping-pong. La K_m pel que fa al transport d'ADP extern (1-10 μM) no està gaire influïda per l'estat energètic del mitocondri. Però en canvi, sí que ho està molt la K_m per l'ATP; en estat desacoblat o desenergitzat és similar a la de l'ADP, però augmenta de 50 a 100 cops en presència d'un substrat respiratori (150 μM). La $V_{m\max}$ pel que fa al transport d'ATP cap a dins el mitocondri també és més baix en l'estat energitzat però, en aquest cas, l'efecte és més petit, de 2 a 3 cops. El mateix sembla que succeeix en el transport cap a fora, la qual cosa s'ha pogut estudiar en partícules submitocondrials en què s'aconsegueix que la membrana mitocondrial interna estigui invertida respecte al mitocondri original. En aquests experiments s'observà que l'addició de SCN⁻ baixa el potencial de membrana de les partícules i causa una disminució de dues vegades la $V_{m\max}$ del transport d'ATP i

vuit vegades en la K_m . Quan es purificà l'AAC i es reconstituí en liposomes es comprovà que les K_m per ADP i ATP externs eren pràcticament iguals, entorn de $10 \mu\text{M}$, és a dir, similars a les obtingudes amb mitocondris amb un potencial de membrana baix. És un fet destacable que el potencial de membrana tingui un efecte més gran sobre el lligam del substrat que sobre la $V_{\text{màx}}$ del transport (vegeu LaNoue i Schoolwerth, 1979 per revisió i Brandolin *et al.*, 1990).

L'activitat de l'AAC és un punt de control en el procés d'obtenció d'ATP per la cèl·lula, encara que la força del control és diferent segons el teixit i les condicions metabòliques. Així, l'AAC exerceix un control parcial però majoritari en el procés de la fosforilació oxidativa en el fetge, però no en el cor, on el principal factor limitant és l'activitat de la cadena respiratòria (Bohnsack *et al.*, 1982).

Com ja hem comentat, l'AAC fou la primera proteïna transportadora purificada i seqüenciada (Aquila *et al.*, 1982a, b). El material biològic de partida foren mitocondris de cor de bou. La seva purificació fou facilitada per dues característiques més aviat excepcionals dins el món dels transportadors. Per una banda, l'AAC és una proteïna majoritària en la membrana mitocondrial interna de mitocondris de cor. Pot representar ella sola el 12% del total de proteïna de la membrana. Per l'altra, l'existència de potents inhibidors específics d'aquest transport: atractilat i carboxiatractilat, toxines vegetals obtingudes d'*Atractyles gummifera*, que es lliguen per la part citosòlica de l'AAC i l'àcid bongkreikic, toxina bacteriana derivada d'un àcid gras, que ho fa per la part mitocondrial.

Canvis conformacionals

Existeixen dues conformacions de l'AAC que es detectaren abans que se'n conegués la seqüència. Són les conformacions *c* i *m*. La

conformació *c* correspon a l'AAC amb el lloc d'unió per nucleòtids d'adenina a la part citosòlica de la membrana, mentre que la conformació *m* correspon a aquella que té el lloc d'unió encarant la matriu. L'AAC pot ser fixat per atractilat (ATR) o carboxiatractilat (CATR), que no són permeants, en la conformació *c*, també anomenada conformació CATR i per l'àcid bongkreikic (BA), que és permeable, en la conformació *m* o conformació BA (Klingenberg, 1989). Els anticossos generats contra el complex CATR-AAC a penes reconeixen el complex BA-AAC i viceversa, mentre que els anticossos generats contra ambdós complexos reconeixen la proteïna desnaturalitzada (Schultheiss i Klingenberg, 1984). Aquestes conformacions no són produïdes per la unió dels inhibidors sinó que preexisteixen en la proteïna nativa. S'ha demostrat que existeixen diferències importants quant a l'accessibilitat de diferents pèptids a anticossos específics, així com canvis de sensibilitat de diferents residus d'aminoàcids a agents reactius segons que es tracti de mitoplasts pretractats amb CATR o BA (Marty *et al.*, 1992); per tant hi ha diferències de conformació detectables entre l'estat *m* i *c*. Exploitant aquestes diferències, s'ha comprovat que l'addició d'ADP o ATP en el medi promou el canvi de conformació de l'AAC, és a dir, el pas de l'estat *c* a *m*, al mateix temps que la translocació (revisat a Brandolin *et al.*, 1993). Derivats de nucleòtids d'adenina no translocables però sí capaços de lligar-se al mateix lloc d'unió no indueixen el canvi conformacional. Com a conseqüència, aquests canvis conformacionals estan lligats al mateix procés de translocació.

Topografia de l'AAC en la membrana mitocondrial interna

A partir de la seqüència d'aminoàcids de

l'AAC ja es determinaren com a trets característics l'estructura tripartida i un perfil d'hidrofobicitat que permetia postular l'existència de sis dominis transmembrana, dos per domini, en forma d'hèlix α , que és el model general per a la família de transportadors mitocondrials. Per al cas de l'AAC, tanmateix, s'ha proposat un model de cinc dominis transmembrana (Marty *et al.*, 1992), car aquests autors consideren que el grau d'hidrofobicitat dels aminoàcids que formarien el segon domini transmembrana no seria suficient. No havent-se encara aconseguit la cristal·lització de cap d'aquestes proteïnes transportadores, els models de la topografia de l'AAC són hipotètics, basats, però, en diferents aproximacions experimentals que, de fet, no permeten ara per ara discernir entre els models de cinc o sis dominis transmembrana. Així, tècniques de fotomarcatge amb derivats azido d'ADP, ATP i CATR, modificació de residus de lisina amb piridoxal 5-fosfat, o modificació química de residus cisteïna amb reactius SH s'han emprat no tan sols per a estudiar la topografia de l'AAC sinó també per a tenir informació dels llocs d'unió dels nucleòtids d'adenina i estudiar el mecanisme del transport. També ha estat molt útil la utilització d'anticossos específics contra diversos pèptids de l'AAC. Estudis realitzats amb anticossos específics contra l'extrem N-terminal (Marty *et al.*, 1992) demostraren que aquest extrem és accessible des del citosol, ja que aquests anticossos reconeixien la proteïna utilitzant mitoplasts, és a dir, mitocondris en què s'ha eliminat la membrana mitocondrial externa, però no quan s'empraven partícules submitocondrials. En aquests estudis també s'observà que pèptids corresponents als *loops* A, B i C eren reconeguts pels anticossos específics corresponents emprant partícules submitocondrials però no mitoplasts; per tant, aquestes àrees han d'estar orientades cap a la matriu en la proteïna

nativa. L'ús d'anticossos contra l'extrem C-terminal, no ha estat tant determinant, ja que s'ha trobat que existia un reconeixement, molt feble, però, per anticossos específics, tant emprant partícules submitocondrials com mitoplasts. Aquest resultat s'interpreta suposant que l'extrem C-terminal estaria probablement dins la membrana ja que es tracta d'una regió molt curta, que podria ser accessible per les dues cares de la membrana, depenent de les condicions experimentals. La manca de definició de l'extrem C-terminal no permet descartar cap dels dos models d'inserció de l'AAC a la MMI. Combinada amb aquesta aproximació amb anticossos, es van realitzar estudis de proteòlisi controlada i de seqüenciació dels fragments resultants, en què tant els mitoplasts com les partícules submitocondrials es van fer reaccionar, en condicions molt controlades, amb diferents proteases que no són permeants, i per tant la seva acció havia de ser externa. El primer resultat obtingut fou més aviat sorprenent, ja que l'AAC resultà pràcticament resistent a l'atac per diferents proteases com ara la tripsina, l'endo-Arg i l'endo-Lys, a relativament altes concentracions quan s'empraven mitoplasts, però era força sensible quan s'estudiaven partícules submitocondrials. D'aquesta manera es va poder determinar l'orientació matricial d'alguns enllaços peptídics com R30-V31, R59-I60, K42-E43, K146-G147 i K244-G245 (Marty *et al.*, 1992) (vegeu la figura 6). L'orientació a la part de la matriu d'aquests aminoàcids està d'acord amb el model general teòric de sis dominis transmembrana. Emprant mitoplasts es va estudiar el fotomarcatge de l'AAC amb diferents derivats azido d'ADP i atractilat. Es va comprovar que els fragments F153 a M200 i Y250 a M281 de l'AAC de cor de bou es marcaven covalentment amb azido-ADP (Dalbon *et al.*, 1988) i el primer d'aquests fragments també ho era per azido-ATR (Boulay *et al.*,

1983). Tant l'azido-ADP com l'azido-ATR són no permeants, i per tant el marcatge amb mitoplasts indica que aquestes regions són accessibles des del citosol. Però, els fragments marcats formen part dels *loops* B i C, els quals segons el model de sis dominis transmembrana estarien orientats a la matriu. Aquesta divergència es pot solucionar considerant que formen part del canal de translocació i que, per tant, han de poder ser accessibles des dels dos extrems de la membrana. Per marcatge químic de lisines amb fosfat de piridoxal s'ha trobat que diverses

lisines, K22, K42, K48, K106 i K162 són accessibles des de les dues cares de la membrana, cosa que suggereix que formarien part del canal de translocació (Figura 6) (Bogner *et al.*, 1986). Força informació s'ha obtingut de l'ús de reactius SH que ataquen específicament residus de cisteïna individuals com N-etilmaleimida (NEM), que és permeant, i eosin 5-maleimida (EMA) com a no permeant. Amb aquests experiments s'ha determinat l'orientació matricial de C56, C159 i C256, mentre que C128 formaria part d'una regió transmembrana, ja que no és

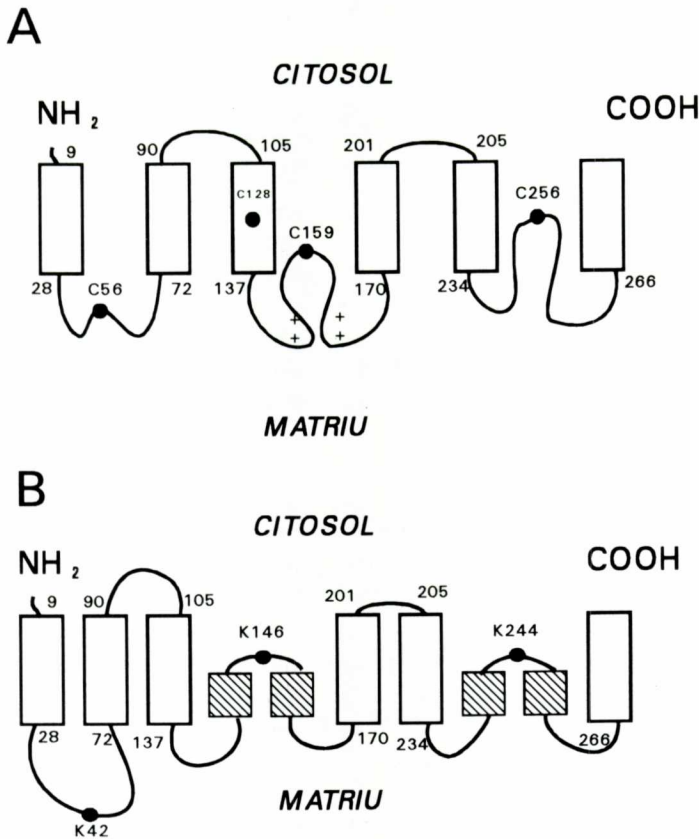


FIGURA 6. Model de topografia de l'AAC a la membrana mitocondrial interna. A) Es mostren les posicions de les cisteïnes de l'AAC. Noteu que la C159 estaria en una butxaca de la *loop* B amagada per càrregues positives. Observeu, també, que les C159 i especialment la C256 es trobarien embotides dins la membrana. B) Es mostren les lisines reactives a fosfat de piridoxal i s'indica la proposta de les regions amfipàtiques que penetrarien a la membrana (quadres ratllats). A i B són totalment compatibles (vegeu el text).

marcat per cap dels dos reactius (Boulay i Vignais, 1984; Majima *et al.*, 1993) (Figura 6). Estudis realitzats amb els reactius SH NEM i EMA en competència amb ADP, ATP, CATR i BKA han permès de proposar que el lloc d'unió de l'AAC estaria al voltant del residu C159 de la seqüència bovina (Majima *et al.*, 1993, 1994) (Figura 6), al bell mig del *loop* B, que forma part del fragment que resultava marcat amb azido-ATP i azido-ATR. Aquesta és una zona que presenta càrrega elèctrica neta positiva, la qual cosa estaria d'acord amb el lligam d'ADP i ATP carregats negativament a pH de 7, encara que probablement la mateixa C159 no hi estaria directament involucrada ja que no es troba conservada en els diferents AAC seqüenciats. La regió formaria una espècie de butxaca que penetraria en la membrana (Figura 6) creant un canal a través d'aquesta. Aquests estudis també indiquen que tant C159 com, sobretot, C256 es trobarien dins la membrana (Figura 6). Aquesta possibilitat també ha estat suggerida de manera independent en analitzar-se les seqüències d'aminoàcids dels *loops* B i C. Segons Marty *et al.* (1992), tant el en el *loop* B com en el C hi hauria dues regions amb característiques amfipàtiques, que formarien petites regions α -hèlix, que no tindrien prou longitud per a travessar la membrana, però permetrien la formació d'un canal més curt, en produir-se un aprimament local de la membrana (Figura 6).

Anàlisis de mutagènesi de l'AAC de llevat han aportat coneixements importants amb relació a l'essencialitat de diferents residus d'aminoàcids per a l'activitat AAC (Nelson *et al.*, 1993). Aquests estudis s'han realitzat en una soca de *S. cerevisiae* a què s'ha eliminat el gen AAC2, que és el responsable en el llevat de la funció fisiològica del translocador. Aquesta soca és incapaç de créixer en un medi on l'única font energètica és el glicerol, el qual no és fermentable. La

introducció del gen per AAC2 amb mutacions puntuals permeté d'estudiar el restabliment de la capacitat de creixement del llevat. D'aquesta manera es determinà que sis residus arginina (R96, R204, R252, R253, R254 i R295) i una lisina (K38) són essencials per al funcionament correcte d'AAC2. R252, R253 i R254 formen una regió altament conservada RRRMMM, que diferents estudis han permès de situar en la zona matricial, present en quinze de setze translocadors (RRRLMM en *Clorella*), que en canvi no es troba en cap altre membre de la família de transportadors. Per tant, aquesta regió sembla específica d'AAC. El més probable és que les càrregues negatives d'ATP i ADP interactuïn amb càrregues positives de l'AAC, i aquestes arginines altament conservades són bones candidates per a fer-ho. Els altres quatre residus essencials presenten també càrrega neta positiva, situats en segments de membrana i estan 100 % conservats en totes les seqüències conegudes d'AAC. Es consideren llocs d'interacció durant el transport de nucleòtids. L'essencialitat de R96 ja es coneixia perquè és el lloc d'una mutació natural anomenada OP₁ o *pet9* que produeix deficiències respiratòries (Adrian *et al.*, 1986; Lawson *et al.*, 1990). En el mutant *pet9*, R96 està substituïda per H i fa que la cèl·lula no pugui créixer en glicerol. En aquests mateixos estudis de mutagènesi també es testà l'essencialitat de diferents residus que altres estudis de modificació química ja comentats havien conclòs que estaven involucrats en la funció transportadora, com per exemple C73, C244 i C271 que es modificaven per NEM, o K179 i K182 que es marcaren amb 2-azido ATP. Cap d'aquests mostrà ser essencial per al funcionament d'AAC. En el cas de les cisteïnes se suposa que no estarien elles mateixes involucrades en el transport, encara que sí la regió en què es troben.

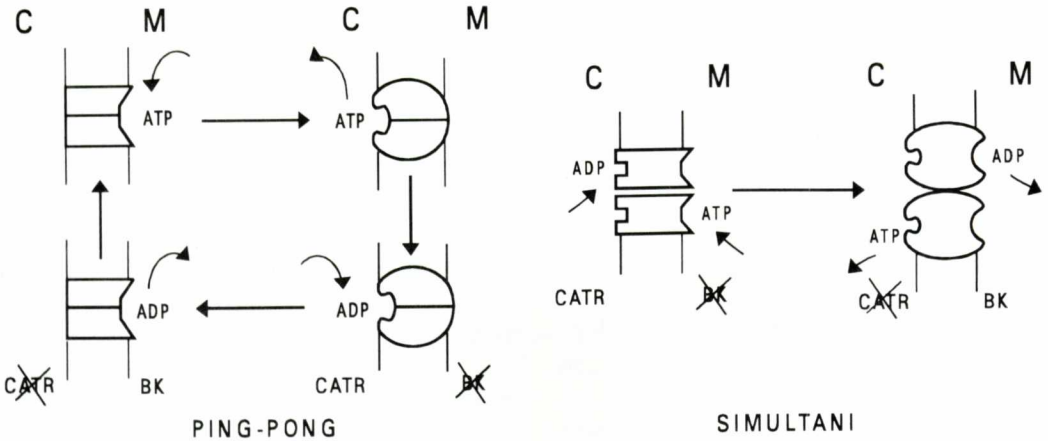


FIGURA 7. Esquema dels models cinètics proposats pel funcionament de l'AAC. El model de ping-pong implica que l'AAC actiu seria un dímer amb un únic lloc d'unió, el qual alternativament estaria orientat a la matriu mitocondrial o al citosol. El model simultani implica que l'AAC actiu ha de tenir com a mínim dos llocs d'unió. En aquest model tant encaixa l'AAC com a dímer amb dos llocs d'unió, com un tetràmer amb un únic lloc d'unió per dímer (vegeu el text).

Mecanisme de transport

El model clàssic de funcionament de l'AAC considera que aquest transportador seria actiu en forma dimèrica, el qual tindria un únic lloc d'unió que es reorientaria en el procés de translocació (per a revisió vegeu Klingenberg, 1989). En altres paraules, l'ATP intern es lligaria al lloc d'unió que estaria orientat cap a la matriu mitocondrial (estat *m*), aquesta unió induiria la transició conformacional de manera que el lloc d'unió s'orientaria cap al citosol (estat *c*). L'ATP s'alliberaria i com a conseqüència el lloc d'unió quedaria lliure per a ser ocupat per ADP extern. Al seu torn, la unió d'ADP revertiria el procés, amb la qual cosa l'ADP seria introduït a la mitocondria (Figura 7). La cinètica d'aquest transport seria, doncs, de tipus ping-pong. Aquest model també és

avalat per la demostració que l'AAC dímer té un únic lloc d'unió per CAT. Això suposa que la forma activa de l'AAC és la dimèrica. De fet, és la forma dimèrica la que s'obté quan es purifica el complex AAC-CATR. Hi ha dades experimentals que contradiuen aquest model, però. Així, s'han publicat dades que indiquen que el nucleòtid extern i l'intern haurien d'estar units al translocador abans que es produís la translocació, i per tant, es tractaria d'una cinètica simultània o seqüencial (Brandolin *et al.*, 1993). Aquest tipus de cinètica només és possible si l'AAC actiu té com a mínim dos llocs d'unió (Marty *et al.*, 1992). Existeixen dues possibilitats per a explicar aquesta contradicció. Per una banda, si realment l'AAC dímer només tingués un únic lloc d'unió, aleshores l'AAC actiu podria ser un tetràmer (Marty *et al.*, 1992). Per l'altra, podria ser que el dímer tingués

dos llocs d'unió, però per fenòmens de cooperativitat negativa el lligam d'un substrat o CATR impedis el lligam d'un altre (Nelson i Douglas, 1993), i això experimentalment donaria la falsa impressió que hi ha un únic lloc. Òbviament, hi ha una gran diferència entre les dues possibilitats pel que respecta a l'estructura tridimensional de l'AAC. En la primera possibilitat, que l'AAC actiu sigui un tetràmer, s'ha proposat que els canals podrien estar formats per regions dels *loops* B i C que podrien estar inserides en la MMI com a estructures *hairpin*, ja que aquestes regions amfipàtiques es pot considerar que estan formades per dues hèlix α curtes, com ja hem comentat. Cada canal de translocació estaria format per la interacció de dos monòmers, amb la qual cosa el tetràmer tindria dos canals de translocació. Tenint en compte consideracions estèriques s'ha proposat que l'existència de segments amfipàtics curts dins d'estructures amb múltiples segments transmembrana, resultaria en aprimaments locals de la membrana, i per tant en una distància de canal reduïda (Marty *et al.*, 1992). La segona possibilitat, el dímer AAC seria actiu amb dos llocs d'unió, implica que cada monòmer, mitjançant els seus sis dominis transmembrana, formaria un canal de translocació. Segons Nelson i Douglas (1993) el diàmetre del canal generat d'aquesta manera seria suficient per a permetre el pas de molècules com ADP i ATP. A més, a cada canal hi hauria distribuïdes quatre càrregues positives, 100 % conservades en les seqüències de tots els AAC, i que ja hem comentat que són essencials per al funcionament del transportador, que podrien interactuar amb les tres càrregues negatives de l'ADP o les quatre de l'ATP. De totes maneres aquests models no podran ser validats fins que s'obtinguin dades definitives sobre l'estructura tridimensional de l'AAC.

Gens i isoformes

S'han descrit tres isoformes de l'AAC en éssers humans, codificades per gens diferents i expressades de manera específica a cada teixit (Stepien *et al.*, 1992). La isoforma ANT1 (o T1), expressada principalment al múscul esquelètic i al cor, la isoforma ANT2 (o T3), de la qual a penes s'ha trobat expressió en els diferents teixits humans estudiats, i la isoforma ANT3 (o T2), de què s'ha trobat expressió a baix nivell en tots els teixits humans, però sembla més predominant en aquells teixits aeròbics que no tenen ANT1, com ara el ronyó, l'intestí o el cervell. Homòlegs d'aquestes isoformes es troben en altres organismes com el bou o la rata, si bé hi ha diferències quant a la distribució tissular (Powell *et al.*, 1989; Stepien *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1993). L'homologia de la seqüència de les proteïnes isoformes deduïdes a partir dels cDNA supera el 85 %, i més del 95 % si es compara la seqüència d'una isoforma determinada amb les diferents espècies estudiades. Sembla, doncs, que aquestes isoformes sorgiren per processos de duplicació gènica fa uns tres-cents milions d'anys (Stepien *et al.*, 1992). Bastant anteriorment al clonatge de les isoformes, per tècniques immunològiques (Schultheiss i Klingenberg, 1985) es va comprovar que els anticossos generats contra la proteïna purificada de cor de bou reconeixien principalment l'AAC de cor, menys l'AAC de ronyó i amb dificultat l'AAC purificat de fetge. Per tant, les proteïnes d'aquests tres teixits, encara que relacionades, havien de tenir diferències en algun(s) epítot(s), i per consegüent havien de ser proteïnes diferents. L'existència d'isoformes s'interpreta com la manera d'aconseguir que cada teixit tingui l'activitat translocadora ajustada als seus requeriments. De tota manera aquestes diferències han de ser força subtils, si bé importants fisiològicament, car les caracterís-

tiques cinètiques no mostren diferències importants segons l'origen dels mitocondris. És interessant fer notar que en un organisme unicel·lular com *S. cerevisiae* s'han trobat també tres isoformes d'AAC (Kolarow *et al.*, 1990; Lawson *et al.*, 1990), encara que no mantenen tanta homologia entre si com les isoformes de mamífer que hem comentat. Mitjançant elegants estudis genètics de disrupció gènica i sobreexpressió (Gawaz *et al.*, 1990; Lawson *et al.*, 1990) s'ha comprovat que tota l'activitat normal AAC en *S. cerevisiae* es deu a la isoforma AAC2, mentre que la isoforma AAC1, pot compensar l'absència d'AAC2, però només quan el gen es troba en còpia múltiple. Aquests estudis també han demostrat que la proteïna AAC1 té menys del 40 % d'activitat que l'AAC2. Es desconeix, doncs, el paper funcional de la isoforma AAC1. També cal ressaltar que la isoforma AAC3 només s'expressa en condicions anaeròbiques, i que la disrupció d'aquest gen comporta una inhibició del creixement del llevat en aquestes condicions (Kolarow *et al.*, 1990; Drgon *et al.*, 1991). El seu paper funcional es creu relacionat amb el procés de translocació invers que es pensa que ha d'existir en aquestes condicions, ja que el mitocondri necessita ATP i aquest, en condicions anaeròbiques, ha de ser generat en el citosol. Seria interessant investigar si en els mamífers pot succeir quelcom de similar.

Les tres isoformes humanes descrites d'AAC corresponen a l'expressió de tres gens diferents (Cozens *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1989; Ku *et al.*, 1990). Aquests tres gens presenten una estructura similar quant a la situació d'introns. Les seves regions 5' no codificants (promotors i possibles regions reguladores) són, però, força diferents. El promotor del gen *ant1* presenta unes típiques regions TATA i CAAT, que se solen trobar en gens de transcripció altament regulada. De tota manera, estudis realitzats en el nostre laboratori revelen que la regió CAAT no seria

funcional. Sabem molt poc encara sobre les regions reguladores d'aquest gen. S'ha descrit una regió que estaria involucrada en l'expressió múscul/cor específica d'aquesta isoforma (Li *et al.*, 1990). És important assenyalar que aquesta regió, OX-BOX, es troba també en el gen de la subunitat β de l'ATP sintasa mitocondrial. Això no obstant, el fet que no estigui conservada en el gen homòleg de rata (Shinohara *et al.*, 1993), posa en dubte l'essencialitat real d'aquesta regió pel que fa a l'expressió específica de múscul. Molt recentment, s'han obtingut en el nostre laboratori dades que involucren factors de transcripció ETS en la regulació de l'expressió d'aquest gen així com d'altres proteïnes mitocondrials relacionades amb el procés de la fosforilació oxidativa, com la subunitat β de l'ATP sintasa o diferents subunitats de la citocrom oxidasa (Villena *et al.*, 1994). D'aquesta manera s'ha proposat la família de factors de transcripció ETS com un sistema d'aconseguir una regulació coordinada de l'expressió dels gens del sistema de la fosforilació oxidativa.

Menys encara es coneix de les regions reguladores dels altres dos gens. El gen *ant2* presenta una regió promotora amb seqüència TATA però no CAAT, que sembla que podria estar substituïda per diverses seqüències SP1 (Ku *et al.*, 1990). La regió promotora del gen *ant3*, no presenta ni seqüència TATA ni CAAT, però sí moltes regions SP1 (Cozens *et al.*, 1989), característica que comparteixen diferents gens d'expressió ubíqua.

El gen *ant1* humà està localitzat en el cromosoma 4 (Li *et al.*, 1989) mentre que els gens humans *ant2* i *ant3* es troben en el cromosoma X (Schiebel *et al.*, 1993). L'*ant3* es troba en la regió pseudoautosomal i escapa de la inactivació del cromosoma X. L'*ant2* és a Xq i sofreix inactivació (Schiebel *et al.*, 1993). El significat biològic d'aquest fet, però, no es coneix encara.

BIBLIOGRAFIA

- ADRIAN, G. S.; M. T. McCAMMON; D. L. MONTGOMERY; M. G. DOUGLAS (1986). «Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 6, pàg. 626-634.
- AQUILA, H.; W. EIERMANN; M. KLINGENBERG (1982a). «Incorporation of N-ethylmaleimide into the membrane-bound ADP/ATP translocator. Isolation of the protein labeled with n-[3H]-ethyl-maleimide». *Eur. J. Biochem.*, núm. 122, pàg. 133-139.
- AQUILA, H.; T. A. LINK; M. KLINGENBERG (1985). «The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane». *EMBO J.*, núm. 4, pàg. 2369-2376.
- AQUILA, H.; D. MISRA; M. EULITZ; M. KLINGENBERG (1982b). «Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria». *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, núm. 363, pàg. 345-349.
- AZZI, A.; M. GLERUM; R. KOLLER; W. MERTENS; S. SPYCHER (1993). «The Mitochondrial Tricarboxylate Carrier». *J. Bioenerg. Biomembrane*, núm. 25, pàg. 515-524.
- BISACCIA, F.; L. CAPOBIANCO; G. BRANDOLIN; F. PALMIERI (1994). «Transmembrane Topography of the Mitochondrial Oxoglutarate Carrier Assessed by Peptide-Specific Antibodies and Enzymatic Cleavage». *Biochemistry*, núm. 33, pàg. 3705-3713.
- BOGNER, W.; H. AQUILA; M. KLINGENBERG (1986). «The transmembrane arrangement of the ADP/ATP carrier as elucidated by the lysine reagent pyridoxal 5-phosphate». *Eur. J. Biochem.*, núm. 161, pàg. 611-620.
- BOHNENSACK, R.; U. KUSTER; G. LETKO (1982). «Rate-controlling steps of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. A synoptic approach of model and experiment». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 680, pàg. 271-280.
- BOULAY, F.; G. J. M. LAUQUIN; A. TSUGITA; P. V. VIGNAIS (1983). «Photolabelling approach to the study of the topography of the atracyloside binding site in mitochondrial adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate carrier protein». *Biochemistry*, núm. 22, pàg. 477-484.
- BOULAY, F.; P. V. VIGNAIS (1984). «Localisation of the N-ethylmaleimide reactive cysteine in the beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier». *Biochemistry*, núm. 23, pàg. 4807-4812.
- BRANDOLIN, G.; A. LESAUX; V. TREZEGUET; G. J. M. LAUQUIN; P. V. VIGNAIS (1993). «Chemical, Immunological, Enzymatic, and Genetic Approaches to Studying the Arrangement of the Peptide Chain of the ADP/ATP Carrier in the Mitochondrial Membrane». *J. Bioenerg. Bio-membrane*, núm. 25, pàg. 459-472.
- BRANDOLIN, G.; I. MARTY; P. V. VIGNAIS (1990). «Kinetics of Nucleotide Transport in Rat Heart Mitochondria Studied by a Rapid Filtration Tech-nique». *Biochemistry*, núm. 29, pàg. 9720-9727.
- CAPOBIANCO, L.; G. BRANDOLIN; F. PALMIERI (1991). «Transmembrane Topography of the Mitochondrial Phosphate Carrier Explored by Peptide-Specific Antibodies and Enzymatic Digestion». *Biochemistry*, núm. 30, pàg. 4963-4969.
- CASSARD, A. M.; F. BOULLAUD; M. G. MATTEI; E. HENTZ; S. RAIMBAULT; M. THOMAS; D. RIQUIER (1990). «Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4». *J. Cell. Biochem.*, núm. 43, pàg. 255-264.
- COLLEAUX, L.; G. F. RICHARD; A. THIERRY; B. DUJON (1992). «Sequence of a Segment of Yeast Chromosome-XI Identifies a New Mitochondrial Carrier, a New Member of the G-Protein Family, and a Protein with the PAAK Motif of the H1 Histones». *Yeast*, núm. 8, pàg. 325-336.
- COZENS, A. L.; M. J. RUNSWICK; J. E. WALKER (1989). «DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase». *J. Mol. Biol.*, núm. 206, pàg. 261-280.
- DALBON, P.; G. BRANDOLIN; F. BOULAY; J. HOPPE; P. V. VIGNAIS (1988). «Mapping of the nucleotide binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabelling with 2-azido(alpha-32P)adenisine diphosphate». *Biochemistry*, núm. 27, pàg. 5141-5149.
- DIERKS, T.; A. SALENTIN; R. KRAMER (1990). «Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a preformed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1028, pàg. 281-288.
- DOLCE, V.; V. IACOBACCI; F. PALMIERI; J. E. WALKER (1994). «The Sequences of Human and Bovine Genes of the Phosphate Carrier from Mitochondria Contain Evidence of Alternatively Spliced Forms». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 10451-10460.
- DRGON, T.; L. SABOVA; N. NELSON; J. KORALOV (1991). «ADP/ATP Translocator Is Essential Only for Anaerobic Growth of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*». *FEBS Lett.*, núm. 289, pàg. 159-162.
- GAWAZ, M.; M. G. DOUGLAS; M. KLINGENBERG (1990). «Structure-Function Studies of Adenine Nucleotide Transport in Mitochondria. 2. Biochemical Analysis of Distinct Aac1 and Aac2 Proteins in Yeast». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 14202-14208.

- HARLT, F. U.; N. PFANNER; D. W. NICHOLSON; W. NEUPERT (1989). «Mitochondrial protein import». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 988, pàg. 1-45.
- IACOBAZZI, V.; F. PALMIERI; M. J. RUNSWICK; J. E. WALKER (1992). «Genomic sequence of the oxoglutarate carrier from mitochondria». *DNA Sequence*, núm. 3, pàg. 79-88.
- INDIVERI, C.; A. TONAZZI; F. PALMIERI (1994). «The Reconstituted Carnitine Carrier from Rat Liver Mitochondria -Evidence for a Transport Mechanism Different from That of the Other Mitochondrial Translocators». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1189, pàg. 65-73.
- KAPLAN, R. S.; J. A. MAYOR; D. O. WOOD (1993). «The Mitochondrial Tricarboxylate Transport Protein - cDNA Cloning, Primary Structure, and Comparison with Other Mitochondrial Transport Proteins». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 13682-13690.
- KLINGENBERG, M. (1989). «Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 270, pàg. 1-14.
- KOLAROV, J.; N. KOLAROVA; N. NELSON (1990). «A 3rd ADP ATP Translocator Gene in Yeast». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 12711-12716.
- KU, D. H.; J. KAGAN; S. T. CHEN; C. D. CHANG; R. BASERGA; J. WÜRZEL (1990). «The Human Fibroblast Adenine Nucleotide Translocator Gene -Molecular Cloning and Sequence». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 16060-16063.
- LANOUE, K. F.; A. C. SCHOOLWERTH (1979). «Metabolite transport in mitochondria». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 48, pàg. 871-922.
- LAWSON, J. E.; M. GAWAZ; M. KLINGENBERG; M. G. DOUGLAS (1990). «Structure-Function Studies of Adenine Nucleotide Transport in Mitochondria .1. Construction and Genetic Analysis of Yeast Mutants Encoding the ADP ATP Carrier Protein of Mitochondria». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 14195-14201.
- LI, K.; J. A. HODGE; D. C. WALLACE (1990). «OXBOX, a Positive Transcriptional Element of the Heart-Skeletal Muscle ADP/ATP Translocator Gene». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 20585-20588.
- LI, K.; C. K. WARNER; J. A. HODGE; S. MINOSHIMA; J. KUDOH; R. FUKUYAMA; M. MAEKAWA; Y. SHIMIZU; N. SHIMIZU; D. C. WALLACE (1989). «A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed». *J. Biol. Chem.*, núm. 264, pàg. 13998-14004.
- MAJIMA, E.; H. KOIKE; Y. M. HONG; Y. SHINOHARA; H. TERADA (1993). «Characterization of Cysteine Residues of Mitochondrial ADP/ATP Carrier with the SH-Reagents Eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 22181-22187.
- MAJIMA, E.; Y. SHINOHARA; N. YAMAGUCHI; Y. M. HONG; H. TERADA (1994). «Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulfhydryl reagent eosin-5-maleimide». *Biochemistry*, núm. 33, pàg. 9530-9536.
- MARTY, I.; G. BRANDOLIN; J. GAGNON; R. BRASSEUR; P. V. VIGNAIS (1992). «Topography of the Membrane-Bound ADP/ATP Carrier Assessed by Enzymatic Proteolysis». *Biochemistry*, núm. 31, pàg. 4058-4065.
- MIROUX, B.; V. FROSSARD; S. RAIMBAULT; D. RICQUIER; F. BOULLAUD (1993). «The Topology of the Brown Adipose Tissue Mitochondrial Uncoupling Protein Determined with Antibodies Against Its Antigenic Sites Revealed by a Library of Fusion Proteins». *EMBO J.*, núm. 12, pàg. 3739-3745.
- MITCHELL, P. (1979). «Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems». *Eur. J. Biochem.*, núm. 95, pàg. 1-20.
- NELSON, D. R.; M. G. DOUGLAS (1993). «Function-Based Mapping of the Yeast Mitochondrial ADP/ATP Translocator by Selection for 2nd Site Revertants». *J. Mol. Biol.*, núm. 230, pàg. 1171-1182.
- NELSON, D. R.; J. E. LAWSON; M. KLINGENBERG; M. G. DOUGLAS (1993). «Site-Directed Mutagenesis of the Yeast Mitochondrial ADP/ATP Translocator - 6 Arginines and One Lysine Are Essential». *J. Mol. Biol.*, núm. 230, pàg. 1159-1170.
- PALMIERI, F. (1994). «Mitochondrial carrier proteins». *FEBS Lett.*, núm. 346, pàg. 48-54.
- PALMIERI, F.; C. INDIVERI; F. BISACCIA; R. KRAMER (1993). «Functional Properties of Purified and Reconstituted Mitochondrial Metabolite Carriers». *J. Bioenerg. Biomembrane*, núm. 25, pàg. 525-535.
- POWELL, S. J.; S. M. MEDD; M. J. RUNSWICK; J. E. WALKER (1989). «Two bovine genes for mitochondrial ADP/ATP translocase expressed differently in various tissues». *Biochemistry*, núm. 28, pàg. 866-873.
- PRATT, R. D.; G. C. FERREIRA; P. L. PEDERSEN (1991). «Mitochondrial Phosphate Transport - Import of the H⁺/Pi Symporter and Role of the Presequence». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 1276-1280.
- RUNSWICK, M. J.; A. PHILIPPIDES; G. LAURIA; J. E. WALKER (1994). «Extension of the mitochondrial transporter super-family: Sequences of five members from the nematode worm, *Caenorhabditis elegans*». *DNA Sequence*, núm. 4, pàg. 281-291.
- RUNSWICK, M. J.; S. J. POWELL; P. NYREN; J. E. WALKER (1987). «Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship

- to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondrial uncoupling protein». *EMBO J.*, núm. 6, pàg. 1367-1373.
- RUNSWICK, M. J.; J. E. WALKER; F. BISACCIA; V. IACOBAZZI; F. PALMIERI (1990). «Sequence of the Bovine 2-Oxoglutarate/Malate Carrier Protein-Structural Relationship to Other Mitochondrial Transport Proteins». *Biochemistry*, núm. 29, pàg. 11033-11040.
- SARASTE, M.; J. E. WALKER (1982). «Internal sequence repeats and the path of the polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase». *FEBS Lett.*, núm. 144, pàg. 250-254.
- SCHIEBEL, K.; B. WEISS; D. WOHRLE; G. RAPPOLD (1993). «A Human Pseudoautosomal Gene, ADP/ATP Translocase, Escapes X-Inactivation Whereas a Homologue on Xq Is Subject to X-Inactivation». *Nat. Genet.*, núm. 3, pàg. 82-87.
- SCHLOSSMANN, J.; K. DIETMEIER; N. PFANNER; W. NEUPERT (1994). «Specific Recognition of Mitochondrial Preproteins by the Cytosolic Domain of the Import Receptor Mom72». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 11893-11901.
- SCHULTHEISS, H. P.; M. KLINGENBERG (1984). «Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator: organ specificity and conformation specificity». *Eur. J. Biochem.*, núm. 143, pàg. 599-605.
- (1985). «Immunoelectrophoretic characterization of the ADP/ATP carrier from heart, kidney, and liver». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 239, pàg. 273-279.
- SHINOHARA, Y.; M. KAMIDA; N. YAMAZAKI; H. TERADA (1993). «Isolation and Characterization of cDNA Clones and a Genomic Clone Encoding Rat Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1152, pàg. 192-196.
- STEPIEN, G.; A. TORRONI; A. B. CHUNG; J. A. HODGE; D. C. WALLACE (1992). «Differential Expression of Adenine Nucleotide Translocator Isoforms in Mammalian Tissues and During Muscle Cell Differentiation». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 14592-14597.
- VILLENNA, J. A.; I. MARTIN; O. VIÑAS; B. CORMAND; R. IGLESIAS; T. MAMPTEL; M. GIRALT; F. VILLARROYA (1994). «ETS transcription factors regulate the expression of the gene for the human mitochondrial ATP synthase beta-subunit». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 32649-32654.
- WALKER, J. E.; M. J. RUNSWICK (1993). «The Mitochondrial Transport Protein Superfamily». *J. Bioenerg. Biomembrane*, núm. 25, pàg. 435-446.
- WIESENBERGER, G.; T. A. LINK; U. VONAHSEN; M. WALDHERR; R. J. SCHWEYEN (1991). «MRS3 and MRS4, Two Suppressors of Messenger Transfer RNA Splicing Defects in Yeast, Are New Members of the Mitochondrial Carrier Family». *J. Mol. Biol.*, núm. 217, pàg. 23-37.
- WILLIAMS, K. R.; G. HERRICK (1991). «Expression of the gene encoded by a family of macronuclear chromosomes generated by alternative DNA processing in *Oxytricha fallax*». *Nucl. Acids. Res.*, núm. 19, pàg. 4717-4724.
- ZARA, V.; F. PALMIERI; K. MAHLKE; N. PFANNER (1992). «The Cleavable Presequence Is Not Essential for Import and Assembly of the Phosphate Carrier of Mammalian Mitochondria But Enhances the Specificity and Efficiency of Import». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 12077-12081.
- ZARRILLI, R.; E. L. OATES; O. W. MCBRIDE; M. I. LERMAN; J. Y. CHAN; P. SANTISTEBAN; M. V. URSINI; A. L. NOTKINS; L. D. KOHN (1989). «Sequence and chromosomal assignment of a novel cDNA identified by immunoscreening of a thyroid expression library: similarity to a family of mitochondrial solute carrier proteins». *Mol. Endocrinol.*, núm. 3, pàg. 1498-1508.