

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

12-1-2005

CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTACTO EN MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. AIDA URIBE MEDINA

DIRECTOR DE TESIS: **DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**

MÉXICO, D. F.

Noviembre 2005



0349948



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo **resopolonal**.

NOMBRE: Aida Uribe Medina

FECHA: 15 NOV 2005

FIRMA: Aida Uribe Medina

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **URIBE MEDINA AIDA** con número de cuenta **83221600** y número de expediente **3931137**, con la tesis titulada: "**Caracterización de los sitios de contacto en mitocondrias de la placenta humana y su papel en la síntesis de progesterona**", bajo la dirección del **Dr. Federico Martínez Montes**.

Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dr. Juan Pablo Pardo Vazquez
Vocal:	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Vocal:	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Secretario:	Dr. Federico Martínez Montes
Suplente:	Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann
Suplente:	Dr. Fabián J. Arechavaleta Velasco

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D.F., 10 de noviembre del 2005


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Federico Martínez Montes en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

El proyecto para la realización de la Tesis de Doctorado recibió apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. de registro de Becario 130037) y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado. Apoyo a Proyectos de Investigación. Tesis Doctorales. Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (Clave del proyecto, PAEP número 101333).

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Síntesis de hormonas esteroides	6
La vía esteroidogénica	7
El metabolismo esteroidogénico	9
Glándulas suprarrenales	9
Transporte de colesterol	9
Modelos propuestos para la función de la proteína StAR	12
Gónadas	19
Placenta	19
Sitios de contacto	23
Objetivos	29
Publicación	
Discusión y conclusiones	30
Referencias	34

ABREVIATURAS

AR	adrenodoxina reductasa
Adx	adrenodoxina
P450 _{scc}	citocromo P450 que corta la cadena lateral del colesterol
HSD	3-β hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ-isomerasa
TH	Transhidrogenasa
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
GC	Gonadotropina coriónica
LH	Hormona luteinizante
P5	Pregnenolona
P4	Progesterona
NAD ⁺	Nicotín adenín dinucleótido
NADP ⁺	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
PKA	Proteína cinasa A
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A reductasa
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
SCP ₂	Proteína acarreadora de esteroides
SAP	Péptido activador de la esteroidogénesis
GRP	Proteínas reguladas por glucosa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Hsp	Proteínas de choque térmico
TOM	Translocasas de membrana externa
TIM	Translocasas de membrana interna
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
PBR	Receptor periférico a benzodiazepinas
FSBA	5- <i>p</i> -fluorosulfonil benzoil adenosina
CAH	Hiperplasia adrenal congénita lipóide
ANT	Translocador de adenín nucleótidos

CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTACTO EN MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA

RESUMEN

Los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales desempeñan un papel importante en el metabolismo celular. Se ha demostrado que en los tejidos esteroideogénicos se forma un tipo especial de sitio de contacto, a través del cual se lleva a cabo el transporte del colesterol hasta el citocromo P450_{scc}, donde se transforma en pregnenolona. Sin embargo, para la placenta humana no se conoce como están formados los puntos de unión ni las proteínas involucradas. En este trabajo se aislaron y caracterizaron los sitios de contacto de las mitocondrias de la placenta humana a término. El tratamiento de las mitocondrias con un choque osmótico permitió obtener la separación de las membranas mitocondriales y la separación de éstas en varias fracciones. Cada fracción contiene diferentes proporciones de proteínas y enzimas marcadoras de las membranas mitocondriales. En especial, las fracciones que mostraron el mayor contenido de P450_{scc}, porina, ATP-difosfohidrolasa y colesterol presentaron un aumento en la síntesis de progesterona. Estos datos indican que los puntos de contacto contienen todos los elementos y enzimas necesarias para la esteroideogénesis, incluyendo a la NADP-isocitrato deshidrogenasa. La adición de la proteína MLN64-START recombinante, la cual contiene el dominio START asociado al transporte de colesterol, estimuló la síntesis de progesterona en los sitios de contacto provenientes de la membrana externa mitocondrial, pero no en aquellos provenientes de la membrana interna. En este sentido, se propone un posible papel para la proteína MLN64 en la esteroideogénesis placentaria.

ABSTRACT

Contact sites between mitochondrial membranes play a very important role in the cell metabolism. It had been accepted that in steroidogenic tissues, a special contact site is formed through which cholesterol is transported to the cytochrome P450 side chain cleavage to be transformed into pregnenolone. However, in the human placenta there is not information how these contact sites are formed and what proteins are involved. In this paper, we isolated and characterized the mitochondrial contact sites from the human placenta. By using an osmotic shock treatment of placental mitochondria, several fractions containing contact sites were isolated derived from inner and outer mitochondrial membranes. The fractions contained various proteins and marker enzymes associated to mitochondrial membranes. Interestingly, those containing the highest content of cytochrome P450_{scc}, porine, cholesterol concentration, and ATP-diphosphohydrolase activity showed the capacity to synthesized progesterone, indicating that all necessary elements and enzymes for steroidogenesis are present and functional in these contact sites, including the NADP-isocitrate dehydrogenase. The addition of the START domain from the MLN64 protein to contact sites from outer membrane increased the P4 synthesis, but failed to increase the progesterone synthesis in contact sites from the inner mitochondrial membrane. A possible role of MLN64 in the placental steroidogenesis is discussed.

INTRODUCCIÓN

Síntesis de Hormonas Esteroides

La esteroidogénesis es el proceso que usa al colesterol como sustrato para sintetizar las hormonas esteroides, como los glucocorticoides, mineralocorticoides, progestágenos, estrógenos y andrógenos. Este proceso se lleva a cabo en las glándulas suprarrenales, gónadas, placenta y cerebro. La velocidad de síntesis de esteroides en los diferentes tejidos está controlada por diversas hormonas peptídicas, como la hormona adenocorticotrópica (ACTH), la cual aumenta la síntesis de los glucocorticoides que regulan el metabolismo de los carbohidratos y las reacciones de estrés provocadas por eventos como la ansiedad y la agresión, que se caracterizan por la liberación de catecolaminas, cortisol y hormona del crecimiento. Los mineralocorticoides regulan el balance salino y, por lo tanto, la presión arterial; la angiotensina II y el potasio aumentan su síntesis en la glomerulosa de las glándulas suprarrenales (Orme-Johnson 1990). La gonadotropina coriónica (GC) o la hormona luteinizante (LH) estimulan la síntesis de progesterona en las células del cuerpo lúteo (Niswender 2002), y la LH incrementa la síntesis de testosterona en las células de Leydig (Cooke y cols. 1992).

En los testículos, las células de Leydig sintetizan los andrógenos, mientras que en los ovarios se sintetizan los estrógenos, hormonas que se encargan de los caracteres sexuales secundarios y la función reproductiva. En la placenta se sintetiza la progesterona, hormona encargada de mantener el embarazo a mediados del primer trimestre (Strauss y cols. 2000)

La esteroidogénesis en las glándulas suprarrenales y en las gónadas está sujeta a una regulación aguda, mientras que en el cerebro y la placenta tiene una regulación crónica, la cual puede tener una duración de horas o días y se da a nivel de la transcripción de genes y la proliferación de las células esteroidogénicas. La regulación aguda es de minutos y se da por la acción de las hormonas tróficas sobre la movilización y el flujo del colesterol hacia la mitocondria, donde se inicia la esteroidogénesis (**Figura 1**)

Se ha sugerido que uno de los pasos limitantes en la síntesis de hormonas esteroides es el transporte de colesterol del citoplasma a las mitocondrias (Brownie y cols. 1972, Simpson y cols. 1979, Crivello y Jefcoate. 1980, Privalle y cols. 1983, Hanukoglu y cols. 1986, Jefcoate y cols. 1987).

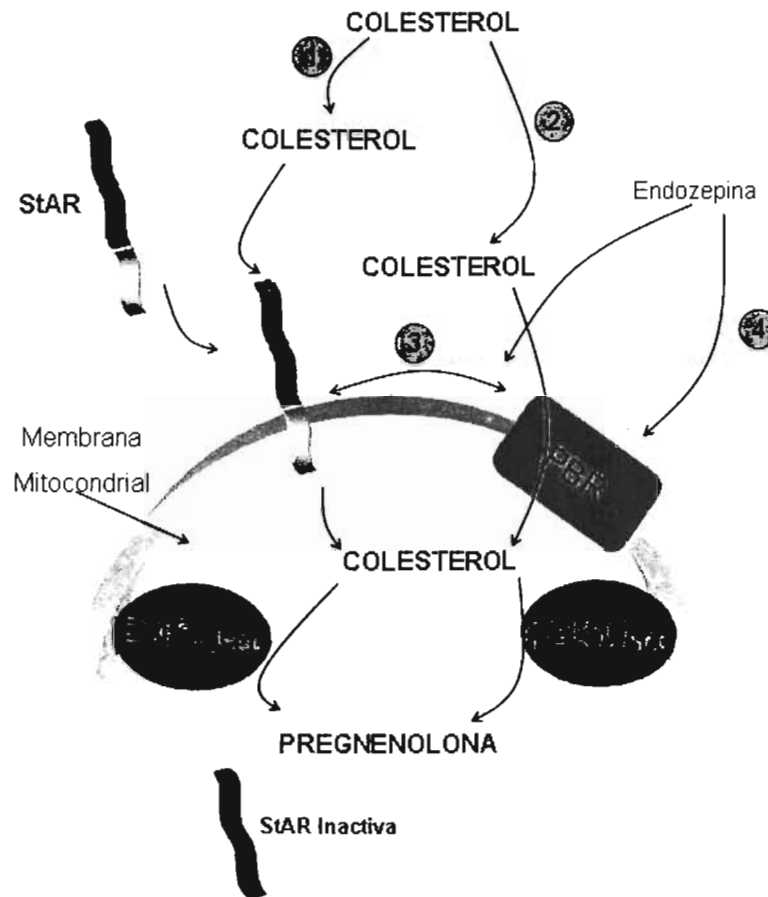


Figura 1. Modelo propuesto para el transporte de colesterol en las mitocondrias de los tejidos esteroidogénicos. La proteína StAR une colesterol en el citoplasma (1) para llevarlo hacia la mitocondria (2), la proteína StAR transfiere colesterol a la membrana o al PBR (3) donde se transporta hacia la membrana interna mitocondrial. La endozepina cambia la conformación del PBR permitiendo el transporte de colesterol (4), o facilitando la interacción de la proteína StAR con el PBR para su transporte (3) (Tomado de Niswender, 2002).

La vía esteroidogénica

En todos los tejidos esteroidogénicos el precursor a partir del cual se sintetizan las hormonas esteroides es el colesterol.

El estudio del metabolismo esteroidogénico involucra uno de los fenómenos biológicos más importantes: la conversión del colesterol en pregnenolona, lo cual incluye, como se mencionó, su transporte desde el citoplasma hasta las membranas mitocondriales. El citocromo P450_{scc} se encarga de romper la cadena lateral del colesterol para la síntesis de pregnenolona (P5). El poder reductor para la reacción del citocromo P450_{scc} se aporta en forma de NADPH mitocondrial a través de la enzima málica, la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ y la transhidrogenasa (TH). El citocromo P450_{scc} está acoplado a una

cadena formada por una flavoproteína que recibe los electrones provenientes del NADPH denominada adrenodoxina reductasa (AR), una proteína transportadora de electrones con centro fierro-azufre denominada adrenodoxina (adx), y el propio citocromo P450_{scc} que corta la cadena lateral del colesterol una vez que éste ha sido reducido, dando origen a la pregnenolona, precursor de la progesterona y del resto de las hormonas esteroideas

La estequiometría de la reacción de transformación del colesterol a pregnenolona es: colesterol: NADPH: O₂, 1:3:3. De manera particular, en las mitocondrias de la placenta, la enzima 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa-Δ-isomerasa (HSD), dependiente de NAD⁺, transforma la pregnenolona (P5) en progesterona (P4) (**Figura 2**).

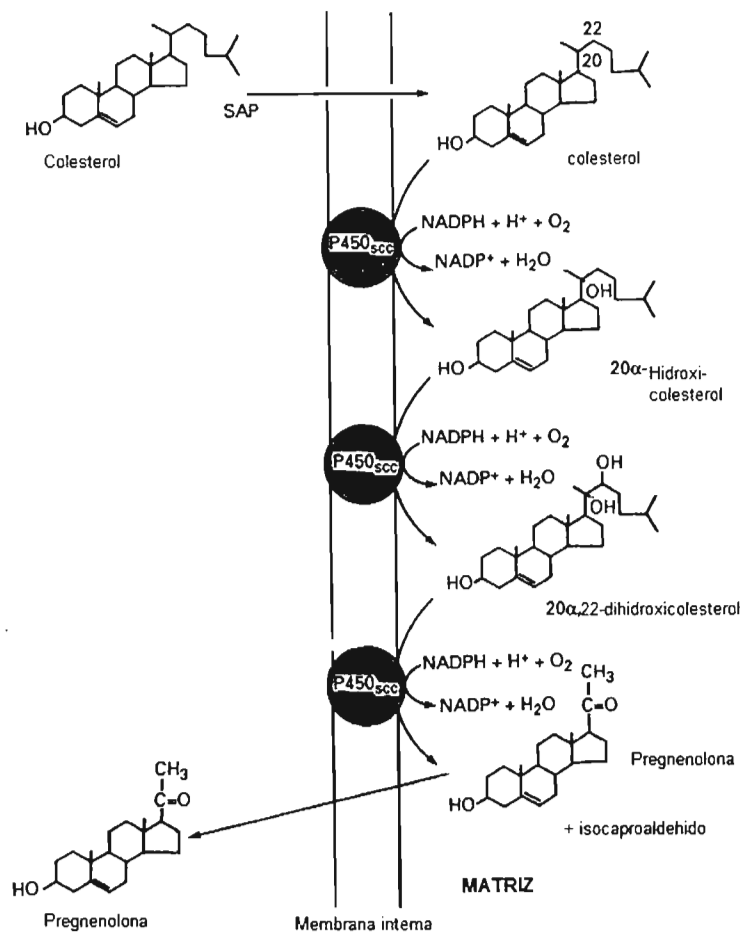


Figura 2. Transformación de colesterol en pregnenolona.

El Metabolismo Esteroidogénico

Glándulas Suprarrenales

El tejido de las glándulas suprarrenales se divide en médula y corteza. En la médula se sintetizan las catecolaminas, como son la noradrenalina, la adrenalina y la dopamina. La corteza está dividida en tres tipos celulares que forman la zona glomerular, fascicular y reticular. Las dos últimas sintetizan glucocorticoides (cortisol, desoxicorticosterona) y andrógenos (dehidroepiandrosterona), mientras que la zona glomerular sintetiza mineralocorticoides (aldosterona). El metabolismo esteroidogénico de las zonas fascicular y reticular se regula principalmente por la cascada de señalización de la ACTH a través del aumento en los niveles citoplásmicos del AMPc. La esteroidogénesis en la zona glomerulosa se regula principalmente por la cascada de angiotensina II o el K^+ extracelular, a través del aumento de los niveles del Ca^{2+} citosólico (Quinn y cols. 1988). La zona fascicular también responde al mecanismo de señalización por Ca^{2+} (Barbara y cols. 1995).

En los tejidos de respuesta aguda, el colesterol se almacena en el citosol en forma de ésteres de colesterol. La estimulación de las glándulas suprarrenales por la ACTH promueve que la proteína cinasa A (PKA) active a la hidrolasa que rompe los ésteres de colesterol permitiendo que el colesterol libre se movilice a la mitocondria (Trzeciak y cols. 1973, Behrman y cols. 1972). El aumento en la hidrólisis de los ésteres de colesterol va aunada a la disminución en la esterificación y el incremento en la síntesis de novo, mediante la activación de la HMG-CoA reductasa (Hall 1985) (**Figura 3**).

Aunque no es clara la dinámica de la distribución del colesterol entre la membrana plasmática, las pozas citosólicas y las membranas de los organelos, se han propuesto tres posibles mecanismos: la difusión, el transporte mediado por vesículas y la participación de acarreadores solubles (Liscum y cols. 1995, Stocco 2000); sin embargo, en los tejidos esteroidogénicos se ha sugerido que el transporte de colesterol es mediado por proteínas.

Transporte de Colesterol

En las glándulas suprarrenales se han descrito proteínas relacionadas con el transporte de colesterol del citoplasma a la membrana externa de la mitocondria y proteínas que lo transfieren de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial.

La proteína acarreadora de esteroides (SCP2), que tiene una masa molecular de 13 kDa (Seedorf y cols. 2000), *in vitro* es capaz de llevar a cabo la transferencia de varios esteroides; en condiciones fisiológicas tiene una baja especificidad para el transporte de colesterol (Pfeifer y cols. 1993, Chanderbhan y cols. 1982, Xu y cols. 1989).

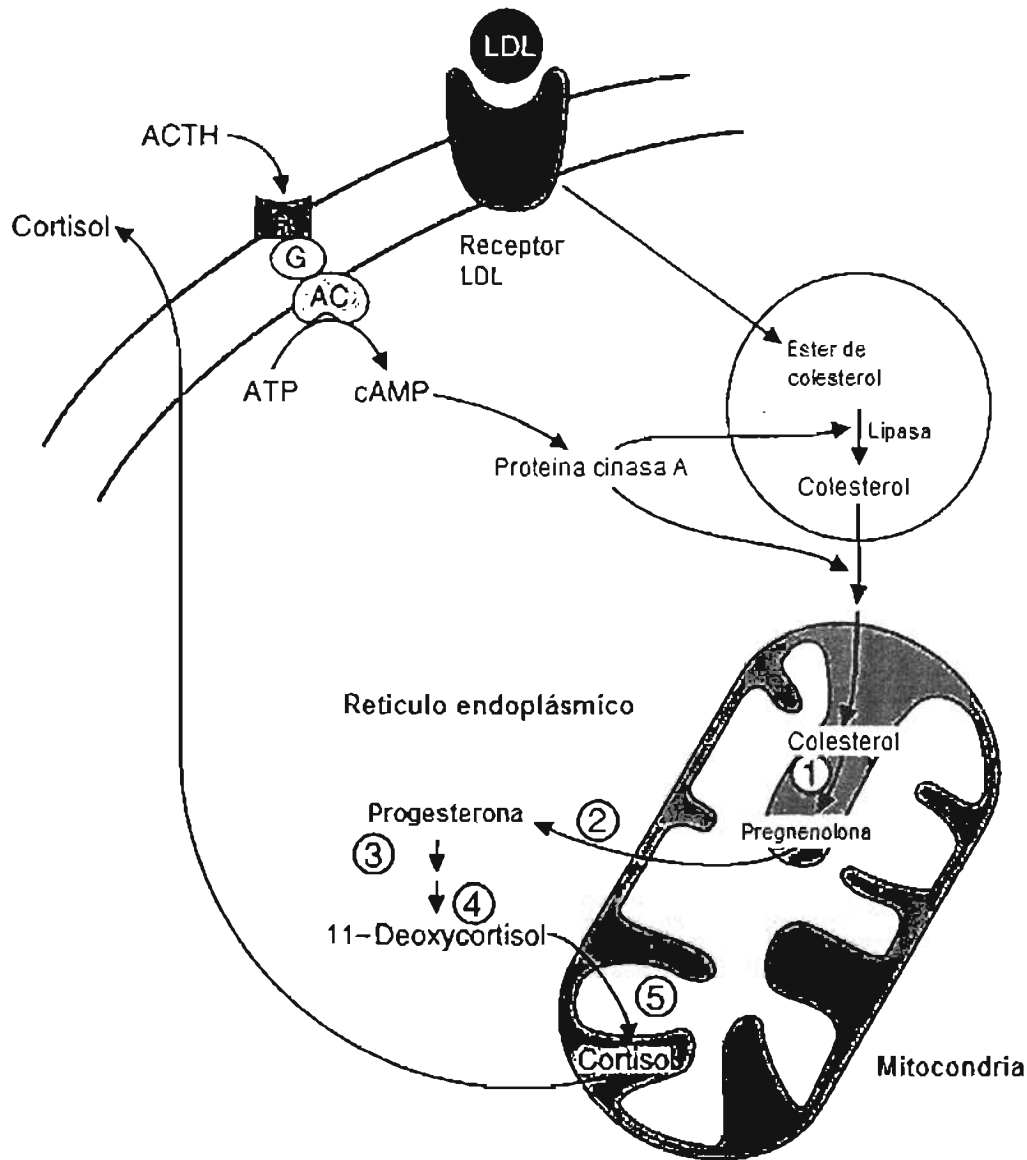


Figura 3. Esquema general del transporte de colesterol para la síntesis de hormonas esteroides. La estimulación de la esteroidogénesis aguda por la ACTH, se realiza a través de la interacción de esta hormona con su receptor (R), la proteína G (G) activa a la adenilato ciclasa (AC) activando la síntesis de AMPc. La cascada de fosforilación involucra a la PKA, ésta activa a la hidrolasa que rompe los ésteres de colesterol, iniciando el transporte de colesterol a la mitocondria para la síntesis de las hormonas esteroides. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) captan el colesterol y aumentan su movilización de los depósitos específicos hacia la mitocondria ocasionando un aumento en la concentración de colesterol disponible para el citocromo P450_{scc}, e incrementando la síntesis de pregnenolona.

Después de un estímulo con la hormona ACTH, en las glándulas suprarrenales aumenta el transporte de colesterol del citosol a las mitocondrias; sin embargo, la concentración de la proteína SCP2 en el citoplasma aumenta después de tratar a las células durante 24 horas con

la hormona (Trzeciak y cols.1987); no obstante, el papel de la SCP2 en el metabolismo esteroidogénico en este tejido aún no es claro.

Otra proteína asociada con el transporte de colesterol es el péptido activador de la esteroidogénesis, SAP (Steroidogenic Activator Polypeptide), el cual tiene una masa molecular de 2.2 kDa y es el producto de la hidrólisis de una proteína de choque térmico la GRP-78; esta hidrólisis depende de AMPc (Mertz y cols. 1989). La SAP requiere de la presencia de GTP para transportar el colesterol entre las membranas mitocondriales hasta el citocromo P450_{sc}. Se sabe que esta proteína no es esencial para llevar a cabo el transporte de colesterol en las glándulas suprarrenales y por lo tanto no regula la síntesis aguda de pregnenolona (Xu y cols. 1997). En la placenta se identificó la presencia de proteínas G (Thomson y cols. 1998) asociadas a la porina en los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales (Kuyznierewicz y cols. 2002), lo cual favorece la hipótesis de que el transporte de colesterol es un proceso mediado por proteínas en las mitocondrias de la placenta humana.

La proteína StAR es la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda y es la responsable del incremento del transporte de colesterol del citoplasma a las membranas mitocondriales y al P450_{sc}. Es la única proteína que se ha demostrado esencial en la esteroidogénesis (Strauss y cols. 2000, Stocco 2000, Saez y cols. 1984, Orme-Johnson y cols. 1990). La proteína StAR se identificó inicialmente como una proteína mitocondrial de 30 kDa, la cual aparece inmediatamente después del estímulo con hormonas tróficas en las células esteroidogénicas (Strauss y cols. 2003). Se expresa en las gónadas y la corteza suprarrenal, así como en otros tejidos no esteroidogénicos como el riñón y el cerebro (Furukawa y cols. 1998, Stocco 2001), pero no se expresa en la placenta humana.

Se sabe que después de un estímulo con ACTH, LH o HCG hay un aumento en la expresión de RNAm de la proteína StAR mediado por AMPc, lo cual se acompaña de un incremento en la concentración de la proteína y de su fosforilación, lo que repercute en el incremento de la esteroidogénesis (Stocco 2001). El precursor de la proteína se sintetiza rápidamente durante la fase aguda de la esteroidogénesis y experimenta dos cortes proteolíticos en el extremo N-terminal (Clark y Stocco 1995, Stocco, 2001) dando origen a la forma madura de la proteína, la cual se degrada una vez que transporta al colesterol y se encuentra dentro de la mitocondria (Miller, 1995).

La proteína StAR tiene un dominio START, que consiste en aproximadamente 210 residuos de aminoácidos, con una estructura α/β compacta que forma un túnel o canal hidrofóbico que se propone puede acomodar una molécula de colesterol (Strauss y cols. 2003). El dominio START, al unir esteroides, facilita la transferencia del colesterol y por lo tanto, estimula la

esteroidogénesis (Christenson y Strauss 2000). Se ha descrito una subfamilia de proteínas relacionadas con la proteína StAR denominadas StarD4, StarD5, StarD6, también relacionadas con el transporte de colesterol, aunque cabe mencionar que son tejido-específicas por ejemplo, D5 se encuentra en hígado, riñón, ovario y testículo y D6 sólo se localiza en testículo (Romanowski y cols. 2002, Tsujishi y Hurley, 2000). Las proteínas de esta subfamilia constan de 205 a 233 residuos de aminoácidos con un 30% de identidad entre ellas y un 20% de identidad con la proteína StAR y el dominio MLN64-START (Socio y cols. 2002, Strauss y cols. 2003).

El papel fisiológico de la proteína StAR se confirmó por los estudios realizados en la enfermedad denominada hiperplasia adrenal congénita lipóide (Lin y cols. 1995, Strauss y cols. 1999), la cual se caracteriza por los altos niveles de ésteres de colesterol, la acumulación de lípidos y la ausencia de esteroidogénesis. Esta enfermedad es una condición letal y presenta mutaciones en el gen que codifica para la proteína StAR.

Modelos propuestos para el funcionamiento de la proteína StAR

Se han propuesto mecanismos mediante los cuales la proteína StAR transfiere el colesterol entre las membranas mitocondriales. Stocco (2000) propone que el precursor citoplasmático de la proteína StAR de 37 kDa se une a una proteína de choque térmico, hsp70, la cual contribuye a la presentación de la proteína a la mitocondria (**Figura 4**). El modelo incluye los complejos TOM, TIM y el PBR asociados a los sitios de contacto mitocondriales.

Jefcoate (2002) utilizó de manera particular el punto de unión asociado a la fosforilación oxidativa como modelo para describir el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales de los tejidos esteroidogénicos. (**Figura 5**)

Lehoux (2003), estudió el efecto de la ACTH en la expresión de la proteína StAR en glándulas suprarrenales de hámster y rata, proponiendo que para la transferencia de colesterol la proteína presenta cambios conformacionales necesarios para su función, involucrando una vía dependiente o independiente de proteínas en el espacio intermembranal o un sistema transportador de colesterol que involucra la formación de sitios de contacto (**Figura 6**).

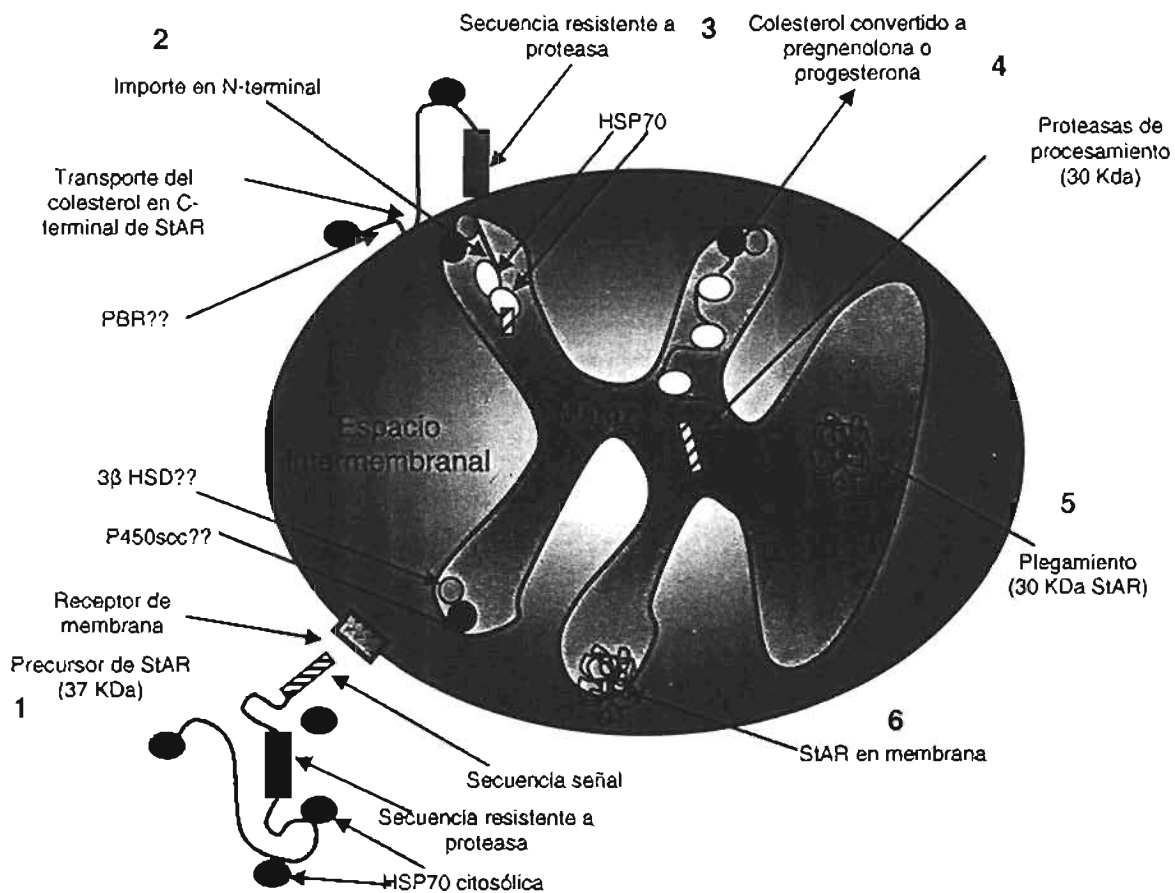


Figura 4. Modelo de la función de la proteína StAR en la transferencia de colesterol. La estimulación de hormonas tróficas (1) induce la síntesis del precursor de 37 kDa de la proteína StAR que se asocia con las proteínas de choque térmico, las cuales impiden su plegamiento. Un fragmento de la proteína que corresponde a los aminoácidos 63 al 188 (Bose y cols. 1999) es resistente a la acción de las proteasas, una característica que puede ser importante en la transferencia de colesterol. (2) La proteína de 37 kDa se asocia con la mitocondria para su importe y procesamiento. La región C-terminal de la proteína StAR interactúa con componentes de la membrana externa mitocondrial para la transferencia de colesterol a la membrana interna. La región resistente a las proteasas forma una estructura denominada "glóbulo fundido" (molten globule). (3) El colesterol es convertido a P5 y en algunos tejidos esteroidogénicos a progesterona. (4) El precursor de la proteína es procesado por proteasas de la matriz dando lugar a la proteína madura de 30 kDa. (5) La proteína StAR se pliega, (6) y se asocia a la membrana interna mitocondrial. Los sitios de contacto que se forman están enriquecidos con el citocromo P450scc y la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenada-Δisomerasa.

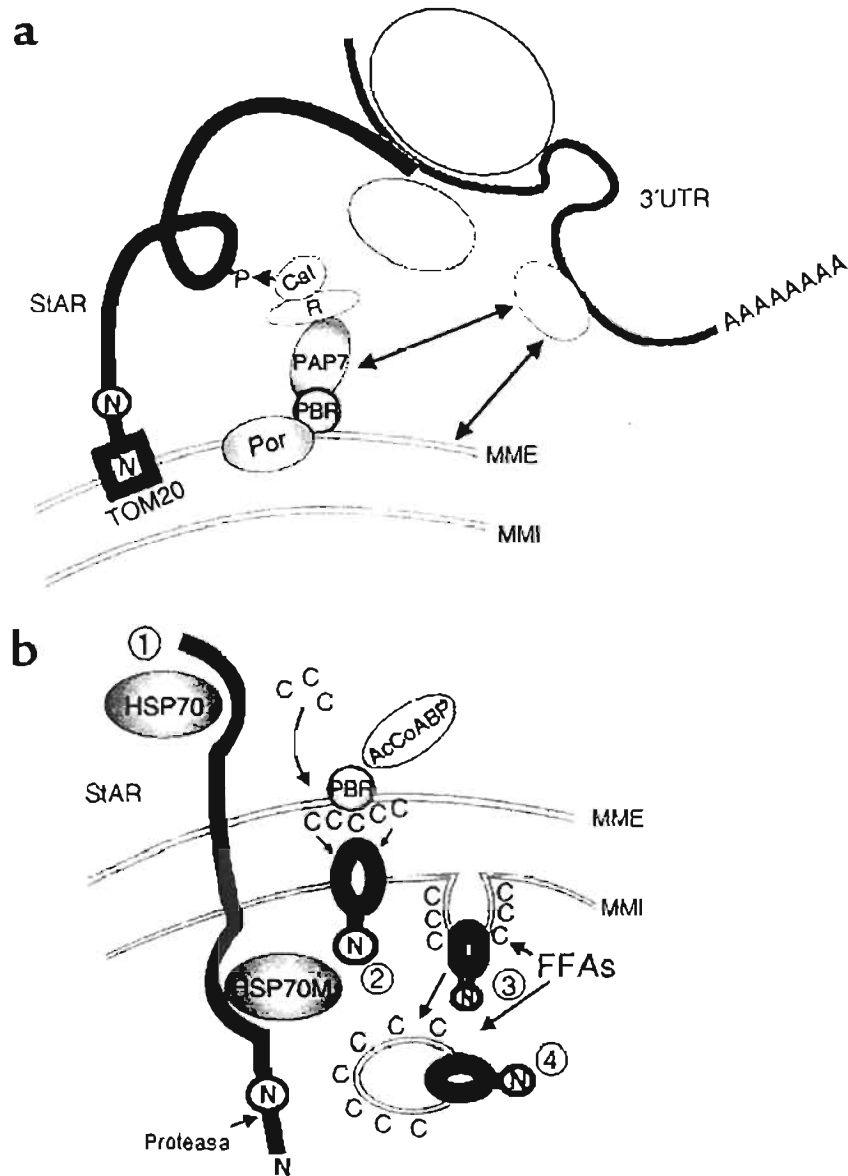


Figura 5. Modelo de localización de la proteína StAR y la transferencia de colesterol en la mitocondria.

La "N" indica la región amino terminal de la forma citoplásmica p37 de la proteína StAR. La "N" encerrada en un círculo indica la región amino terminal de la forma mitocondrial procesada pp30. (a) Localización de la StAR. La nueva p37 se asocia a la mitocondria a través de la secuencia N-terminal con la proteína TOM20. La fosforilación de p37 por la unidad catalítica de PKA (Cat) es facilitada por la interacción de la subunidad reguladora (R) mediante una proteína adaptadora, PAP7, que se une al PBR y a la porina que se encuentran en la membrana externa. (b) Transferencia de la StAR a la membrana interna mitocondrial y liberación del colesterol de la membrana externa hacia el citocromo p450sc. En el paso 1 siguiendo la interacción con TOM20, pp37 es desnaturizada por una hsp70 citosólica pasándola a través de la membrana externa y la membrana interna. Este proceso requiere de la formación de un gradiente de protones y la ayuda de una hsp70 mitocondrial (HSP70M). Posteriormente, la transferencia de colesterol a la proteína pp30 se lleva a cabo mediante la unión del PBR activado por una proteína que une (AcCoABP). acil-CoA (Tomado de Jefcoate 2002).

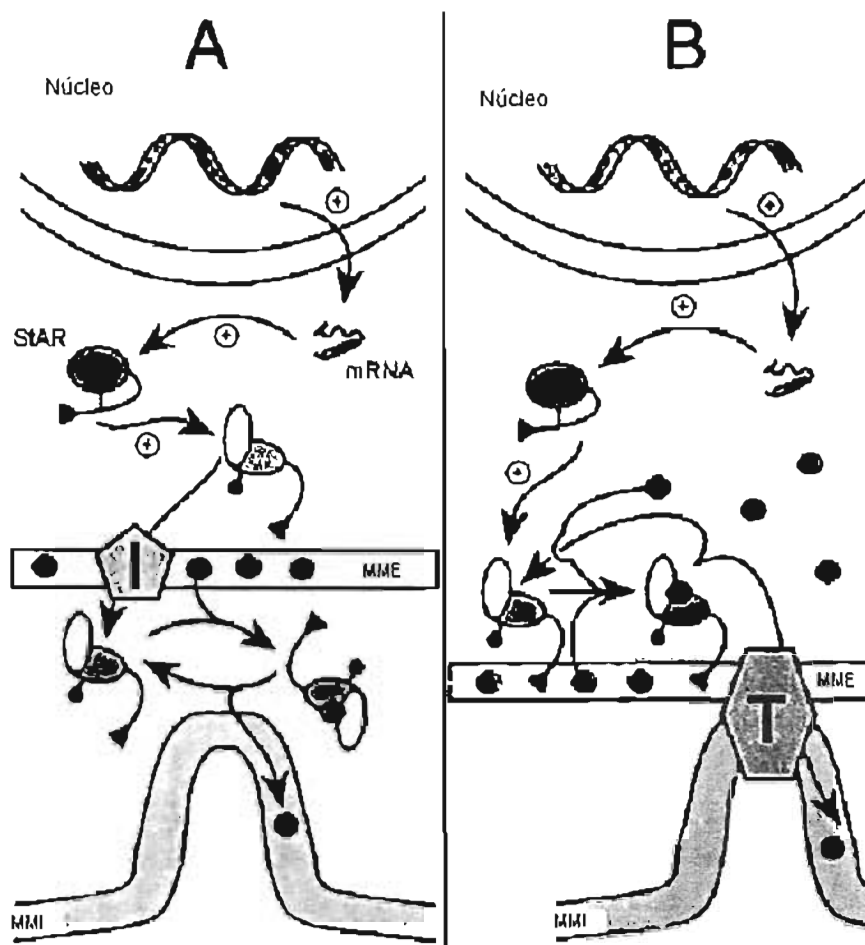


Figura 6. Mecanismos propuestos de actividad de la proteína StAR. El RNAm de la proteína StAR se transcriben después de un estímulo hormonal. La proteína StAR se fosforila para modular su actividad. El símbolo + indica pasos que pueden ser estimulados por AMPc. **A.** El mecanismo de lanzadera intermembranal, donde la StAR es fosforilada y el péptido señal es activado para dirigir el importe dependiente o independiente de proteínas (Δ). En este modelo se propone que la función de la proteína StAR es mediante cambios conformacionales a través de estados parcialmente desplegados (Niswender 2002). **B.** Este modelo propone el funcionamiento de la proteína StAR fuera de la mitocondria usando los puntos de unión. La proteína se sintetiza y fosforila rápidamente permitiendo que el péptido señal interactúe con la membrana externa para acercarla a un sistema de transporte de colesterol mitocondrial T. (West y cols. 2001) (Tomado de Lehoux 2003).

Sierra (2004) propuso un modelo para la localización, regulación y posible función de la proteína StAR en el espacio intermembranal en las células de cerebro. El modelo propone la interacción del PBR, una proteína que se une a la proteína StAR (SBP) y proteínas con dominio START para llevar a cabo el transporte intramitocondrial de colesterol. Este modelo, a diferencia

de los anteriores, propone que la proteína StAR, la cual es esencial para la regulación de la esteroidogénesis en algunos tejidos, no lo es para las células de cerebro, ya que la proteína StAR sólo funciona dependiendo de la cantidad de esteroides requeridos para funciones específicas como mielinización, plasticidad sináptica, neurogénesis y supervivencia neuronal. La expresión de RNAm de la proteína StAR en cerebro de rata, humano y ratón se confirmaron mediante estudios de inmunohistoquímica (Furukawa y cols. 1998) (Figura 7).

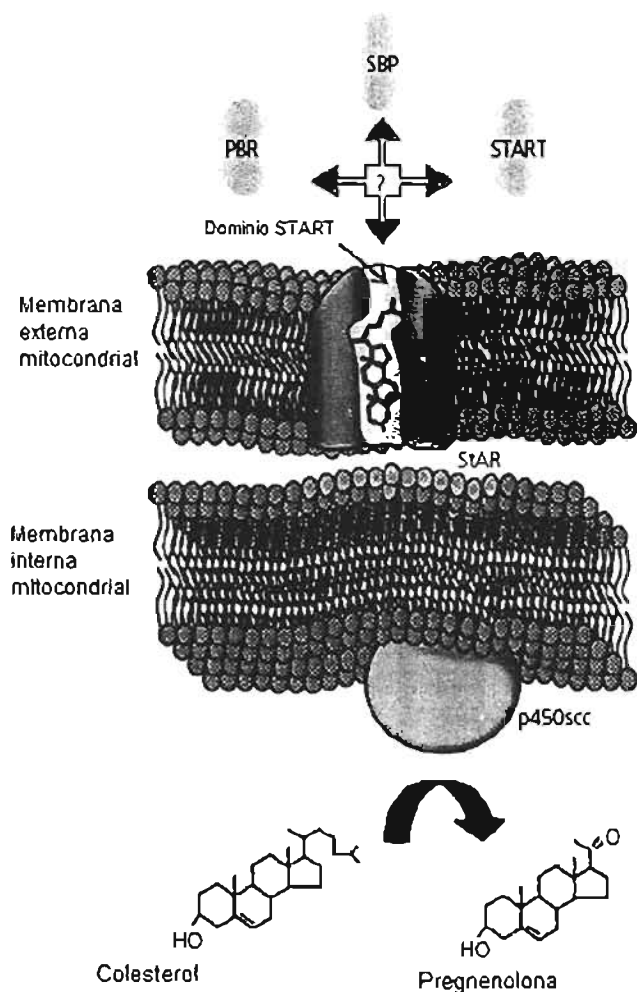


Figura 7. Representación esquemática de la proteína StAR para el transporte de colesterol en células de cerebro. La proteína StAR se localiza en la membrana externa mitocondrial, el dominio START de la proteína une al colesterol y lo pasa a través del espacio intermembranal hacia el citocromo P450scc. Otras proteínas como el PBR, la SBP (proteína que une STAR) u otras de la familia START pueden interactuar para el transporte de colesterol (Tomado de Sierra 2004).

También se ha propuesto que la proteína StAR y la MNL64 actúan en la transferencia de lípidos a través del citoplasma ya que cuentan ambas con el dominio START (Alpy 2005), el cual interactúa con la membrana a través de la hélice $\alpha 4$ de la región C-terminal; esta interacción induce cambios conformacionales en las proteínas y abre la cavidad que une a los lípidos. Una vez que se une, ésta se cierra y el dominio START transporta al lípido a la membrana aceptora (**Figura 8A**). El dominio de la proteína MNL64 que se ancla a las membranas de los endosomas es denominado MENTAL, el dominio START puede retirar el colesterol unido al dominio MENTAL y transferirlo a la membrana aceptora. Este modelo propone una transferencia rápida de colesterol (**Figura 8B**).

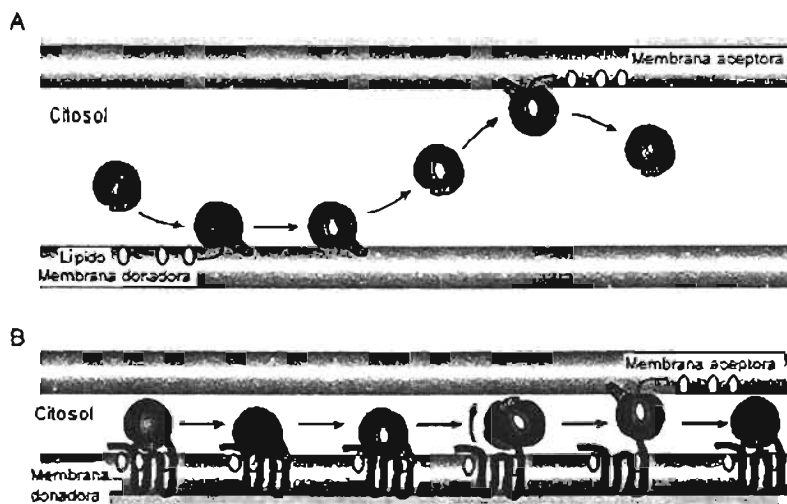


Figura 8. Transporte de lípidos a través del citoplasma. **A.** Mecanismo de acción de la proteína con dominio START. **B.** Mecanismo de acción de la MNL64 (Tomado de Alpy y Tomasetto 2005).

En el modelo de desabsorción del colesterol propuesto por Strauss y cols. (2003) la región C-terminal de la proteína StAR interactúa con la membrana externa rica en colesterol causando su desabsorción hacia la membrana interna mitocondrial, pobre en colesterol, a través de los sitios de contacto (**Figura 9A**). Un modelo alternativo de la acción de la proteína StAR es el modelo de lanzadera intermembranal (Tsujiyama y Hurley 2000, Bose y cols. 2002, Strauss y cols. 2003) en donde la proteína StAR se desplaza en el espacio intermembranal, moviendo al colesterol unido al dominio START en dirección vectorial entre las membranas mitocondriales (**Figura 9B**).

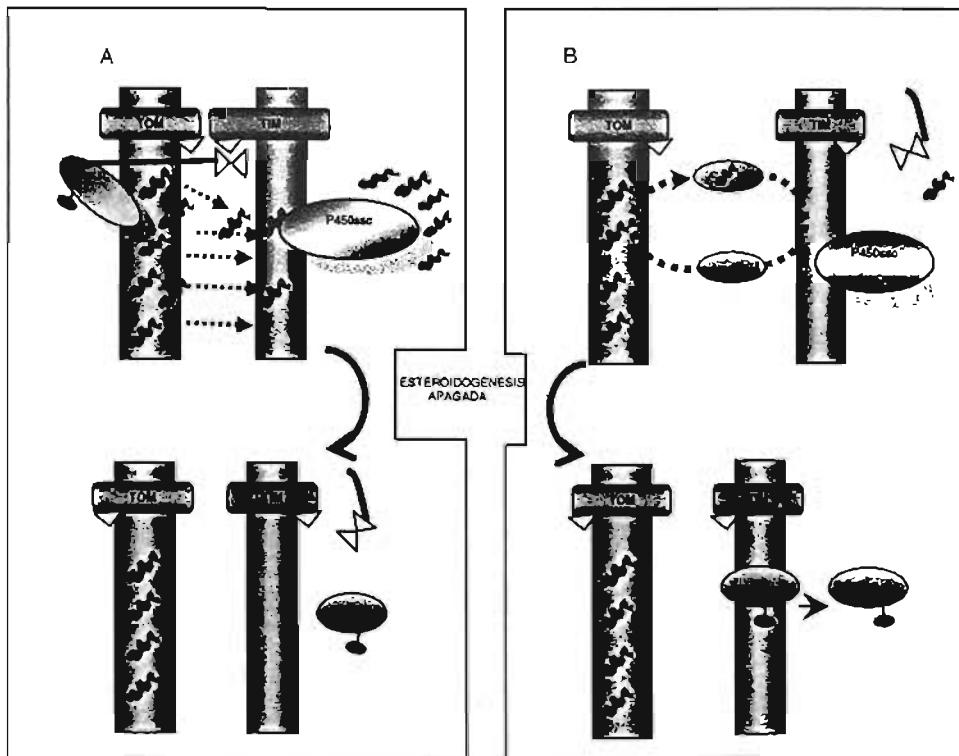
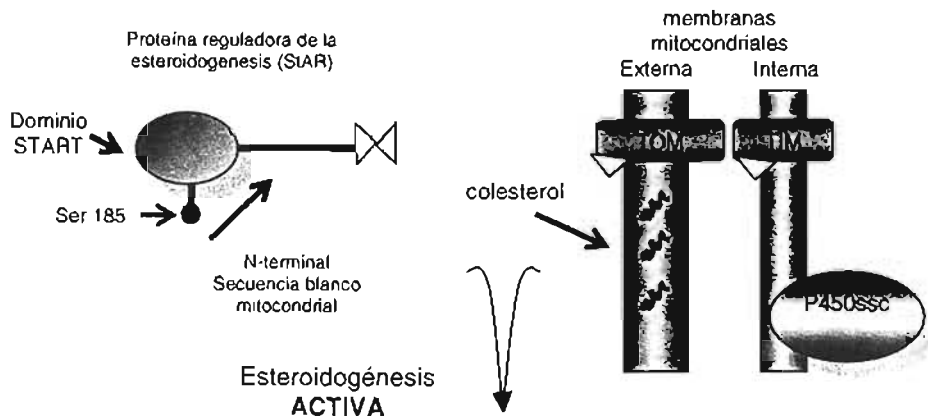


Figura 9. Modelo de la desabsorción del colesterol. **A.** La secuencia señal de la proteína StAR se une a las traslocasas de la membrana externa (TOM) y a las traslocasas de la membrana interna (TIM) la preproteína de la StAR es procesada a su forma madura y el dominio START estimula la desabsorción del colesterol. En el modelo de lanzadera intermembranal (**B**) la proteína StAR es transportada hacia el espacio intermembranal en donde es cortada proteolíticamente dirigiéndose a la membrana interna para liberar al colesterol. El mecanismo por medio del cual la proteína StAR se elimina del espacio intermembranal aún no se conoce (Strauss y cols. 2003).

Los sitios de contacto son estructuras especializadas, acopladas estructural y funcionalmente para facilitar el transporte de colesterol dependiendo de los requerimientos celulares.

Los modelos analizados permiten observar que el mecanismo del transporte de colesterol en los tejidos esteroideogénicos es controversial. Sin embargo, es claro que el transporte de colesterol mitocondrial se realiza mediante un mecanismo complejo que involucra sistemas multiproteicos asociados a puntos de unión y al parecer es tejido-específico.

Esto nos permite proponer que existen varios sistemas que involucran a los sitios de contacto en la regulación de la esteroideogénesis, en respuesta a las necesidades y propiedades fisiológicas de cada tejido. Los sitios de contacto desempeñan una función crucial, coordinada y una ruta eficiente para mediar el transporte de colesterol y favorecer la síntesis de hormonas esteroideas.

Gónadas

La LH es el principal agonista fisiológico de la esteroideogénesis de las células de Leydig (en testículo) a través del receptor acoplado a proteínas G, adenilato ciclasa, AMPc, PKA y la proteína StAR (Saez 1994). Sin embargo, el efecto del AMPc en la esteroideogénesis depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Kumar y cols. 1994, Foresta y cols. 1995). El incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico a través de los canales sensibles a voltaje estimula la salida de los iones Cl^- provocando un aumento en la síntesis de progesterona (Manna y cols. 1999, Ramnath y cols. 1997). El estímulo por HCG aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico que activa la transcripción de los RNAm de la proteína StAR y del factor de transcripción que la regula, el SF-1 (Dupre-Aucouturier y cols. 2002, Enyeart y cols. 1993), lo que sugiere que el aumento de ambos mensajeros está asociado a la síntesis de progesterona (Manna y cols. 1999). Otro agonista fisiológico es el ATP; la presencia de este en cultivos incrementa la concentración de Ca^{2+} citosólico, estimulando la esteroideogénesis (Foresta y cols. 1996), por lo que se ha propuesto que en las células de Leydig este proceso puede modularse por AMPc y/o Ca^{2+} como segundos mensajeros.

Placenta

La placenta es un tejido transitorio que se encarga del intercambio de una gran variedad de metabolitos entre la madre y el feto, para lo cual cuenta con diversos sistemas de transporte que le permiten satisfacer las necesidades del producto. Además, la placenta humana tiene la función de mantener el embarazo. En las mitocondrias de este tejido se sintetiza la pregnenolona a partir del colesterol a través de una cadena similar al resto de los tejidos

estereoidogénicos. La pregnenolona se transforma rápidamente en progesterona dentro de la mitocondria por el complejo enzimático de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ -isomerasa, produciendo más de 300 mg/día.

En el inicio del embarazo, la progesterona actúa como un agente inmunosupresor, permitiendo la implantación del óvulo fecundado (Theillin y cols. 2000; Niswender 2002) y la continuidad del embarazo, por lo cual, una disminución de la concentración sanguínea de la progesterona trae consigo un aborto espontáneo. Durante el primer trimestre del embarazo la producción de progesterona se lleva a cabo mayoritariamente por el cuerpo lúteo y a partir del segundo trimestre la placenta es la encargada de la síntesis de esta hormona permitiendo el desarrollo fetal (Strauss y cols. 2000) y al igual que en otros tejidos estereoidogénicos, en la placenta se considera que el transporte de colesterol del citoplasma a la mitocondria es el paso limitante de la síntesis de progesterona.

En la actualidad se conoce de manera general el mecanismo de control de la estereoidogénesis que emplean las mitocondrias de las glándulas suprarrenales. Sin embargo, aunque la placenta también es un tejido estereoidogénico, a la fecha se desconocen los mecanismos responsables de modular la transformación del colesterol en progesterona durante el embarazo (Martinez y Strauss 1997, Strauss y cols. 1996). Incluso se han aislado proteínas comunes que participan en la transferencia de colesterol en los ovarios, los testículos y las glándulas suprarrenales que no se han detectado en la placenta, lo que indica que este tejido tiene propiedades estereoidogénicas únicas.

La respuesta mediada por análogos del AMPc como en 8-Br-AMPc en cultivos de células del trofoblasto, se lleva a cabo a través de las proteínas cinasas, como la PKA, que activa a la hidrolasa de los ésteres de colesterol (Strauss y cols. 1992, Strauss y cols. 1977) la PKA también interactúa con los factores de transcripción, los cuales aumentan la expresión RNAm de la cadena del citocromo P450_{scc} (Strauss y cols. 1992, Beaudoin y cols. 1997) estimulando la producción de progesterona (Ringler y cols. 1989).

Otros factores, como la estimulación (*in vitro*) de hCG (Chaudhary y cols. 1992), estrógenos (Wunsch y cols.1986, Shanker y cols. 1997), interleucinas (Seki y cols.1997), progesterona (Shanker y cols. 1997), benzodiazepinas (Barnea y cols.1989) y la fusión celular para la formación del sinciotrofoblasto (Strauss y cols. 1992) también están involucrados en el aumento de la síntesis de progesterona.

La adición de lipoproteínas, al medio de incubación como las LDL (Chaudhary y cols. 1992) o HDL (Lasunción y cols. 1991), incrementa la síntesis de progesterona en las células del trofoblasto en cultivo, sugiriendo que el contenido de colesterol en las membranas mitocondriales limita la síntesis de progesterona. Algunos agonistas, como los estrógenos, además de activar la

cascada de señalización de AMPc, promueven la incorporación celular de las lipoproteínas al aumentar el número de receptores para LDL (Wunsch y cols. 1986, Shanker y cols. 1997).

Como se mencionó, el transporte de colesterol es un proceso mediado por proteínas, y la placenta no es la excepción, ya que tanto la incorporación de colesterol como la síntesis de pregnenolona son sensibles al tratamiento con tripsina (Martínez y cols. 1988, Espinosa-García y cols. 2000).

Aún cuando se ha descrito un papel importante para la proteína StAR en la esteroidogénesis de las gónadas y de las glándulas suprarrenales, ésta no se encuentra en la placenta (Sugawara y cols. 1995). Sin embargo, se ha reportado que la proteína endosomal MLN64 podría llevar a cabo las mismas funciones que la proteína StAR transportando el colesterol a las mitocondrias de la placenta humana. La MLN64 tiene una identidad del 60% con la proteína StAR y ambas cuentan con el dominio START que une el colesterol (Strauss 2000, Tsujishita y cols. 2000) (Figura 10).

GLÁNDULAS SUPRARRENALES Y GÓNADAS

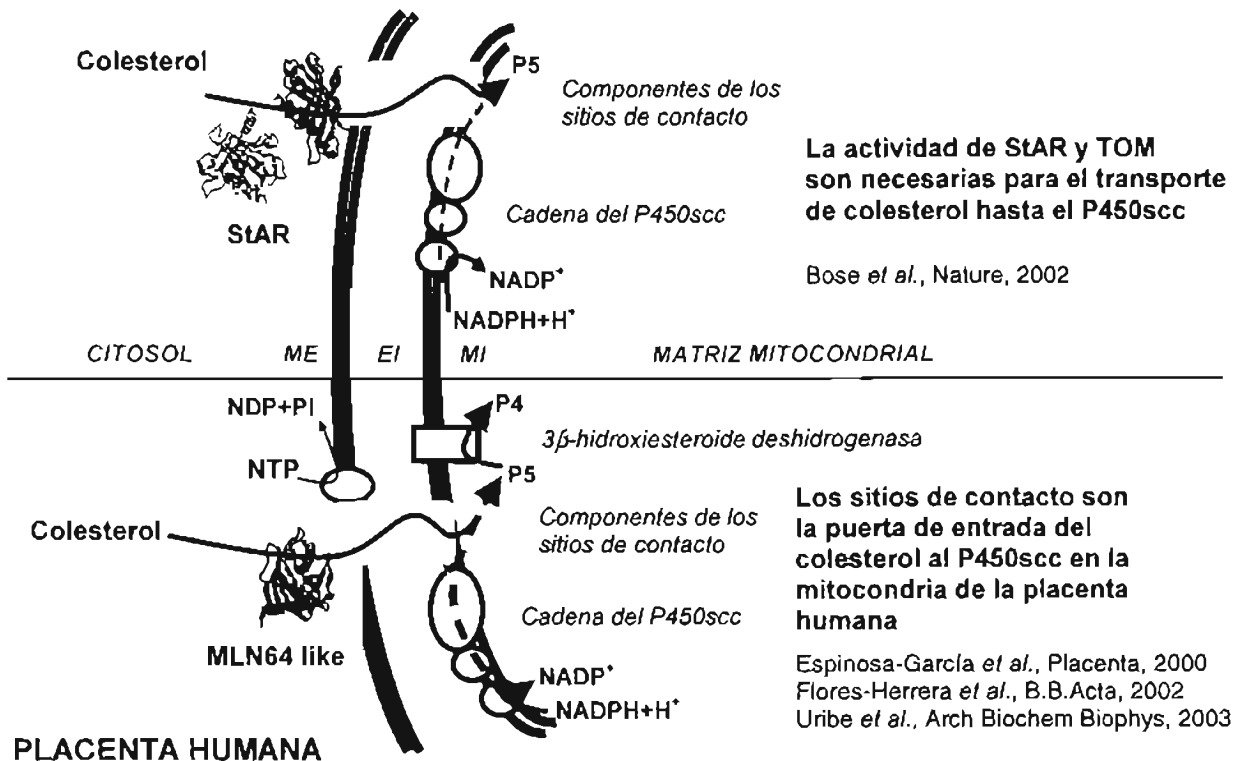


Figura 10. Modelo general propuesto para el transporte de colesterol en gónadas, glándulas suprarrenales y placenta humana.

La proteína StAR y la MLN64 se localizan en organelos diferentes en las células (Clark y cols. 1994, Alpy y cols. 2001), pero tienen propiedades biofísicas y funcionales similares (Tuckey y cols. 2004). La MNL64 se encuentra en la membrana endosomal mediando la movilización del colesterol a suceptor citosólico o a la membrana plasmática (**Figura 11**). (Naureckiene y cols. 2000. Alpy y cols. 2002).

El dominio START, como se mencionó, promueve significativamente la esteroidogénesis en las células del trofoblasto (Watanari y cols. 1997) y puede unir colesterol en relación 1:1 (Tsujiyama y Hurley 2000), por lo que se ha propuesto que la proteína MLN64 podría ser el factor proteico que module la esteroidogénesis placentaria. En el 2002, Zhang y colaboradores demostraron que la MLN64-START recombinante estimula la síntesis de progesterona en la mitocondria aislada de la placenta humana a término, lo que sugiere que la MLN64 podría participar en la síntesis de hormonas esteroideas en la placenta. Hay que resaltar que el dominio START de la MNL64 y de la proteína StAR unen colesterol, aumentando su transporte así como la síntesis de esteroideas cuando se adicionan de manera exógena en las mitocondrias aisladas (Strauss y cols. 2003).

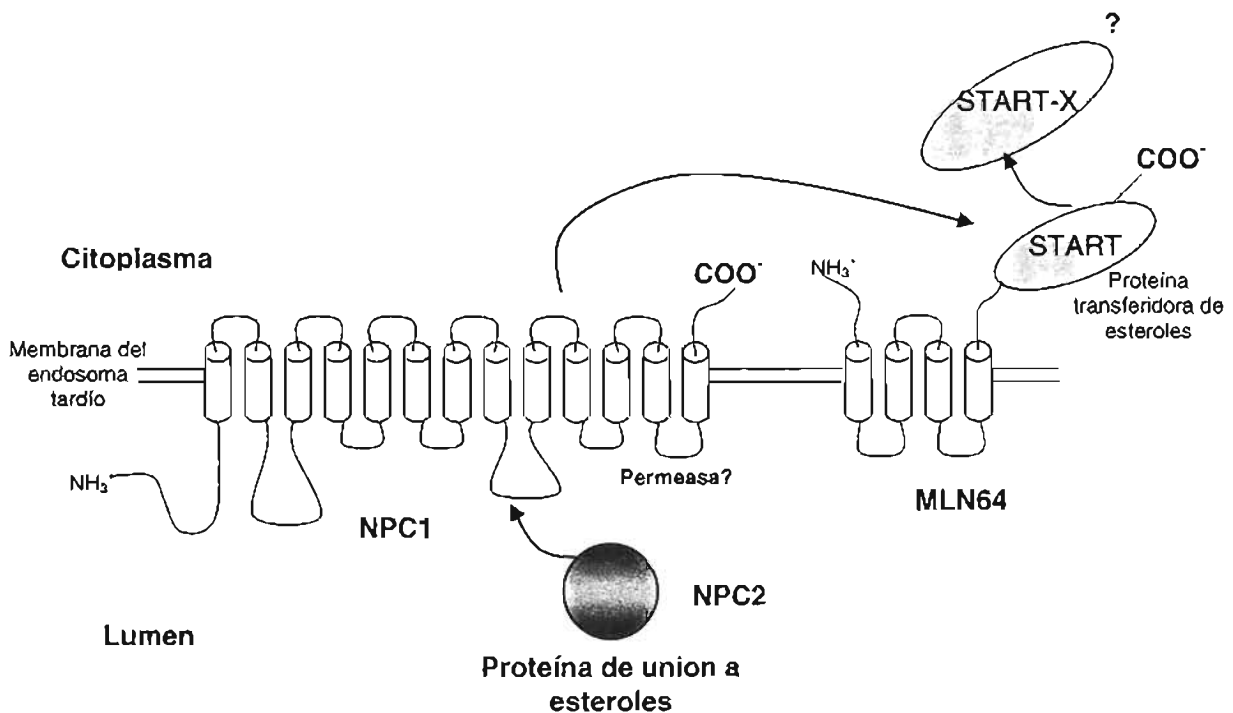


Figura 11. Modelo propuesto para la función de la proteína MNL64 endosomal. El endosoma contiene 3 proteínas asociadas con el transporte citosólico de colesterol, una proteína localizada en el núcleo del endosoma, NPC₂, y dos proteínas asociadas a la membrana, NPC₁ y MLN64. NPC₂ une colesterol y se lo presenta a NPC₁ (permeasa) que lo transfiere a la proteína MLN64, que sufre una hidrólisis liberando el segmento soluble que contiene el dominio START, el cual a su vez puede transportar el colesterol una proteína citoplásmica con dominio START, designada como START-X, o bien a la membrana plasmática o del retículo endoplásmico (Tomado de Strauss y cols. 2003).

Sin embargo, actualmente se reconoce que el transporte del colesterol en la placenta humana debe ser tejido-específico (Espinosa-García y cols. 2002). En este sentido, las mitocondrias aisladas de placenta humana muestran una disminución en su capacidad esteroidogénica después de ser tratadas con tripsina; sin embargo, el uso del 22-hidroxi-colesterol, un esteroide que atraviesa libremente las membranas biológicas y puede ser usado como sustrato del P450_{scc}, permite la síntesis de progesterona en las mitocondrias tripsinizadas, lo que sugiere que existe un sistema proteico encargado del transporte e incorporación del colesterol en las mitocondrias de la placenta humana a término.

Sitios de contacto

La presencia de los sitios de contacto o puntos de unión entre las membranas mitocondriales se describió por primera vez por Hackenbrock en 1968, siendo definidos como el lugar en el cual se realiza una semifusión de las membranas mitocondriales, produciendo una estrecha proximidad entre ellas (Reichert y Neupen 2002). La formación de estos sitios es un fenómeno rápido y dinámico, donde se crea un ambiente en el cual diversas proteínas y enzimas conforman un complejo multienzimático eficiente para diferentes funciones mitocondriales, tales como el transporte de proteínas (Schiz 1996, Tokatlidis y cols. 1996, Voss y cols. 1999, Mori y cols. 1998, Matouscheck y cols. 2000, Hoogenraad y cols. 2002), la fosforilación oxidativa (Adams y cols. 1989), la apoptosis (Crompton, 2000 Shimizu y cols. 2001), el poro de transición de la permeabilidad (Crompton 1999, Dolder y cols. 2001) y la esteroidogénesis (Jefcoate y cols. 1992, Stocco 2000). (Figura 12). Cabe mencionar que la formación de estos sitios de contacto involucra la agregación o disgregación de proteínas específicas y depende de los requerimientos de la función mitocondrial.

Aunque cada tejido esteroidogénico presenta sus propios medios para modular la producción hormonal, se han desarrollado modelos para explicar el transporte mitocondrial de colesterol a través de los sitios de contacto (Strauss, Martínez y Kiriakidu, 1996).

En cuanto a la translocación de proteínas en la mitocondria, se ha observado que es necesaria la formación de los sitios de contacto que involucran la unión de al menos dos complejos de proteínas, las translocasas de membrana externa (TOM) y de membrana interna (TIM), así como diversas proteínas de choque térmico. Este sitio de contacto formado promueve el transporte de proteínas y favorece el correcto plegamiento de las mismas dentro de la mitocondria para adquirir una conformación funcional (Wiedemann y cols. 2004, Rassow 1999, Baker 1996, Pfanner 1994, Stuart 1994, Voos y cols. 1999, Mori y cols. 1998, Rapoport 2002, Jefcoate 2002).

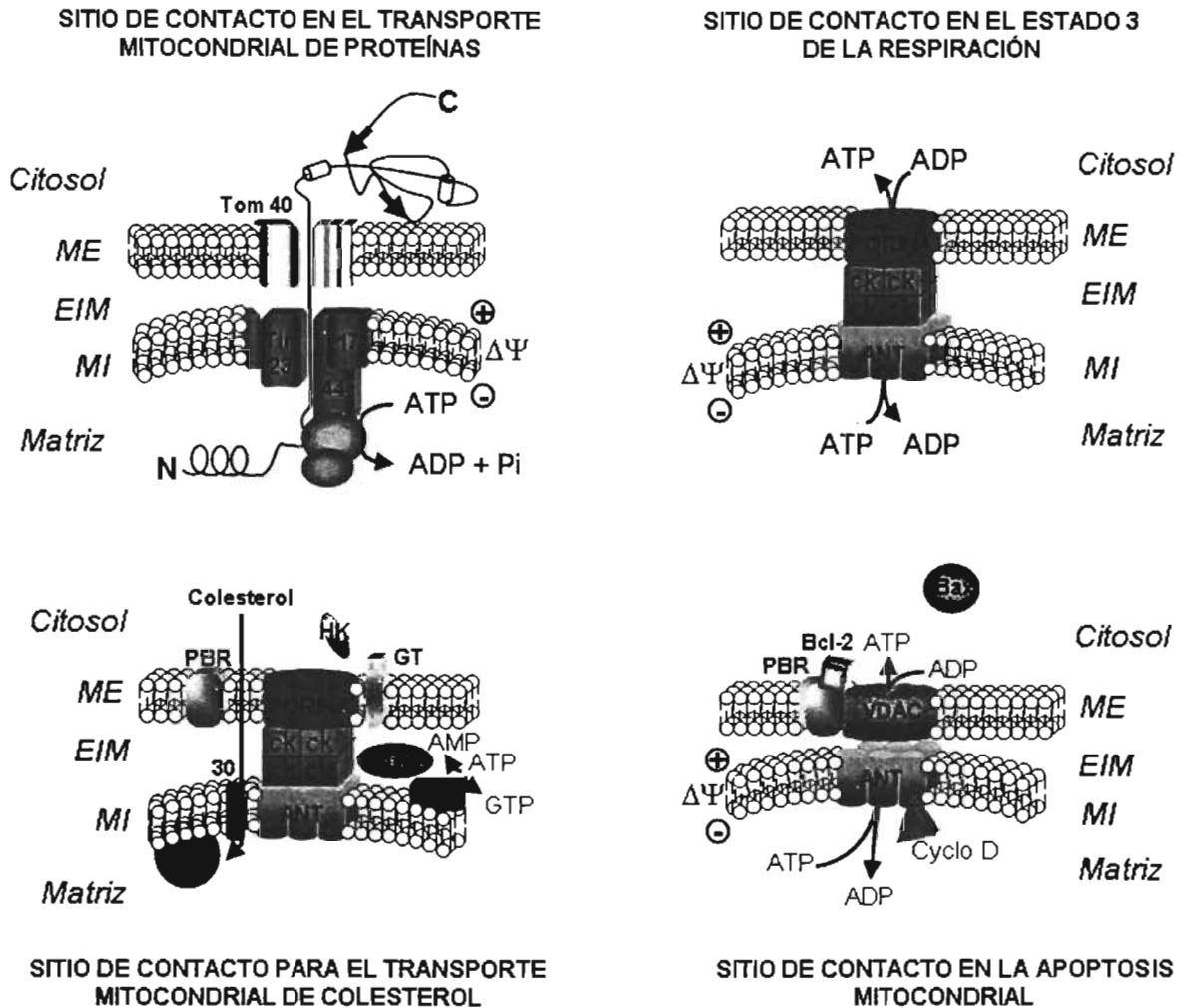


Figura 12. Diferentes sitios de contacto propuestos para algunas funciones mitocondriales.

Para la fosforilación oxidativa, se ha involucrado la formación de sitios de contacto, en donde proteínas como la porina, la creatina cinasa y el translocador de adenín nucleótidos se agregan para la síntesis el ATP.

La formación de los sitios de contacto se puede inducir por algunos efectores, por ejemplo, la ACTH. Halestrap (1986) y Connern (1996) sugieren que la estimulación por ACTH produce cambios en el volumen mitocondrial como consecuencia del movimiento de K^+ , el cual está asociado con cambios físicos, morfológicos y con el aumento del número de sitios de contacto entre las membranas. Se sabe que las diferentes membranas biológicas presentan una composición lipídica particular y se ha propuesto que esto repercute directamente en el contenido de colesterol de cada bicapa membranal (Hoppel y cols. 2002). Más aún, se ha reportado

que la ACTH que estimula la síntesis de hormonas esteroides, también incrementa la síntesis de fosfolípidos (Kimura 1986, Hoppel y cols. 2002), aparentemente como resultado de una síntesis de novo del ácido fosfatídico, lo que favorece la producción del fosfatidilinositol y la fosfatidiletanolamina. Estos fosfolípidos, al acumularse en la membrana externa mitocondrial, favorecen la unión de las proteínas que conforman el sitio de contacto. Por lo tanto se concluye que la ACTH está involucrada de manera directa e indirecta en la inducción de estos sitios.

Ardail (1990) reportó que la cardiolipina se incrementa en los sitios de contacto, por lo que se sugiere que este fosfolípido podría estar involucrado en la formación de los sitios de contacto, induciendo un cambio en la configuración lamelar de las membranas a una estructura hexagonal (H_{II}) a través de la cual se facilita el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales. Para el caso de las mitocondrias de la placenta humana se ha descrito un alto contenido de esfingomielina, la cual está relacionada con el contenido de colesterol en otras membranas biológicas (Ridway 2000, Hoekstr e Ijzendoorn 2000)

Los sitios de contacto propuestos para la apoptosis involucran proteínas como el VDAC, el translocador de adenín nucleótidos, la ciclofilina D y la hexocinasa II. En este modelo, el VDAC se une a la hexocinasa II e impide la salida de proteínas del espacio intermembranal, inhibiendo la apoptosis. Asimismo, el PBR se une a proteínas anti-apoptóticas como Bcl2, formando un canal en la membrana externa para modular la permeabilidad mitocondrial a través de la interacción del VDAC con el translocador de los adenín nucleótidos (Shi y cols. 2003).

Finalmente, Jefcoate, basándose en el modelo descrito originalmente por Brdiczka en 1991 para la fosforilación oxidativa, propuso que el octámero de la creatina cinasa (CK), la porina (Martínez y cols. 1997, Popp y cols. 1995), y el translocador de adenín nucleótidos (ANT) constituyen la estructura básica de los sitios de contacto (Dolder y cols. 2001, Beutner y cols. 1996), los cuales, al interactuar con otras proteínas como la glicerolcinasa (Vyssokikh y Brdiczka, 2004), la hexocinasa II (Pastorino y cols. 2003, Ohlendieck y cols. 1986, Levrat y Louisot, 1992), la glutatión transferasa, la adenilato cinasa, la nucleótido difosfocinasa, el VDAC (Gincel y cols. 2001, Vyssokikh y cols 2002, 2004), una fosfoproteína de 30 kDa que corresponde al receptor periférico a benzodiazepinas (PBR) y los complejos de las translocasas de la membrana externa (TOM) y de la membrana interna (TIM) conforman un nuevo sitio de contacto que se ha relacionado con el transporte de colesterol en los tejidos esteroideogénicos (**Figura 13**).

El mecanismo propuesto para el funcionamiento de este modelo plantea que la proteína StAR, la cual une con alta afinidad al colesterol, interactúa con el receptor periférico a benzodiazepinas a través de la unión con la PKA dependiente de AMPc y la PAP7 que se encuentra asociada estrechamente con el PBR. Al parecer esta interacción permite el transporte

de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Lacapere y cols. 2003), induciendo el aumento de la capacidad esteroidogénica en las células (**Figura 14**).

A pesar de que existen varios modelos que tratan de explicar el transporte de colesterol mitocondrial mediante la formación de sitios de contacto y las proteínas asociadas a estos, no se conoce el mecanismo exacto mediante el cual estas estructuras junto con otros componentes, pueden estar involucradas en la esteroidogénesis. Por ejemplo, el modelo de translocación de proteínas en las mitocondrias de órganos esteroidogénicos, como las glándulas suprarrenales y las gónadas, implica que estos puntos de unión son capaces de transportar el colesterol, por lo que recientemente Christenson y Strauss (2000, 2001) y Stocco (2000, 2001a, 2001b), han sugerido que los complejos TOM y TIM son capaces de interactuar y transportar a la proteína StAR hacia el interior de la mitocondria. Más aun, Bose y cols. (2002) mostraron que la StAR y la Tom 20 que se encuentra en el complejo TOM, están estrechamente relacionadas en el transporte del colesterol hacia el interior de la mitocondria para la síntesis de hormonas esteroides (Artemenko 2001, Tsujishita y Hurley 2002).

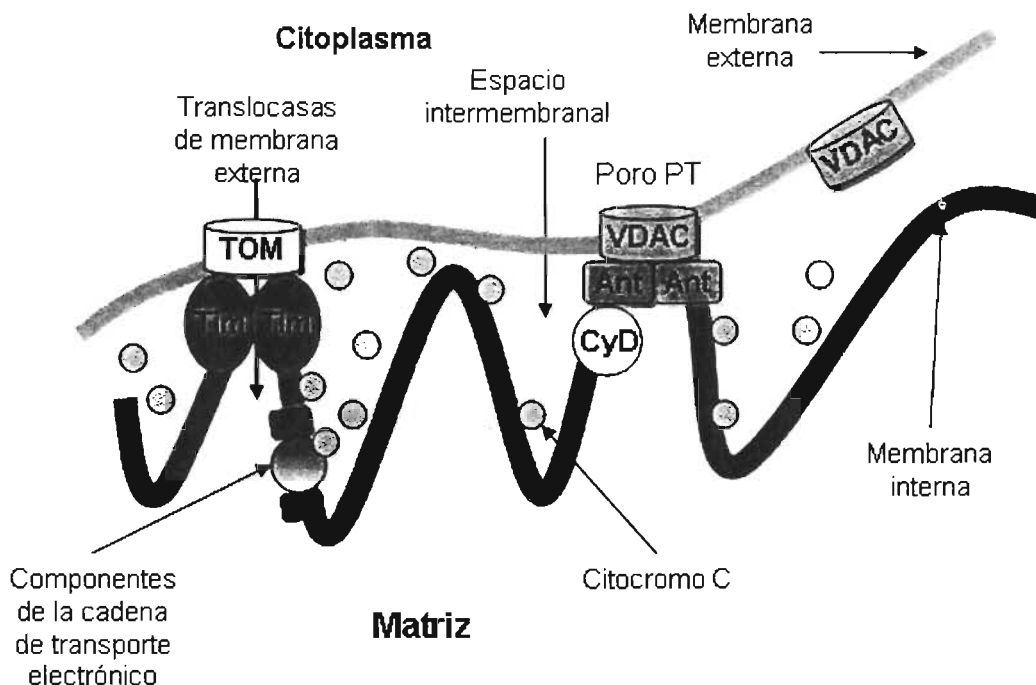


Figura 13. Modelo de la formación de los sitios de contacto entre la membrana externa y la membrana interna mitocondrial. En estos sitios se encuentran los componentes de la cadena de transporte de electrones y el translocador de adenín nucleótidos (ANT), el VDAC que se localiza en la membrana externa formando un canal que permite la distribución de iones y metabolitos, así como los complejos de las translocasas TOM y TIM (Tomado de Newmeyer y cols. 2003).

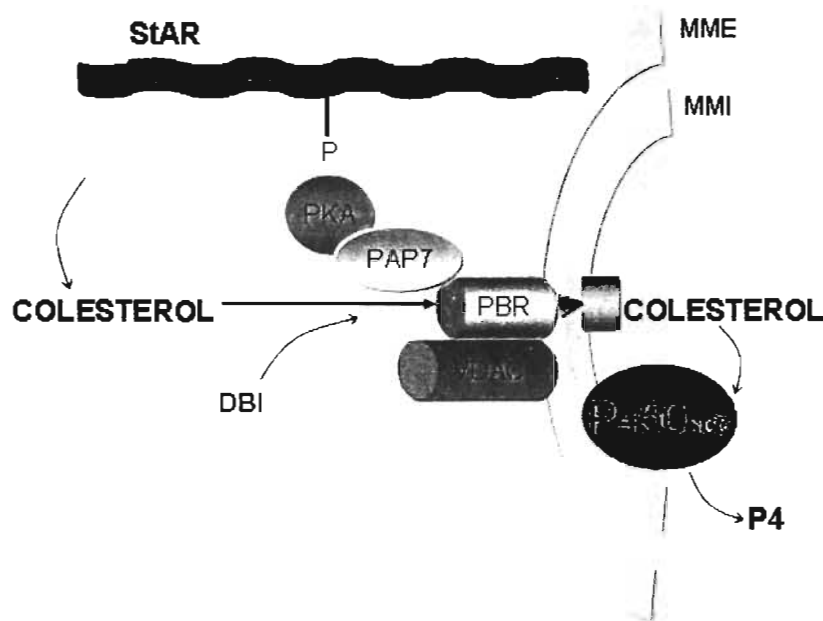


Figura 14. Modelo propuesto para el transporte de colesterol en mitocondrias. La proteína StAR une el colesterol en el citoplasma y lo transfiere al PBR localizado en la membrana externa. La fosforilación de la StAR por la unidad catalítica de la PKA se facilita por la interacción con una proteína denominada PAP7 que se une al PBR y al VDAC. El transporte de colesterol involucra al PBR que es activado por una endozepina (DBI) así, el colesterol pasa al citocromo P450scc para la síntesis de progesterona (P4) (Tomado de Lacapère y Papadopoulos 2003).

Por otra parte, se han descrito enzimas capaces de hidrolizar nucleótidos unidas a los sitios de contacto en las mitocondrias de la placenta (Barash y cols. 1991, Flores-Herrera y cols. 1991). Se reportó la actividad de la ATP-difosfohidrolasa (apirasa) extramitocondrial que no desacopla la respiración (Flores-Herrera y cols. 1999); esta enzima se encuentra orientada hacia el lado citoplásmico y se inhibe por vanadato (Martínez y cols. 1995), es la responsable de que el ATP estimule la respiración al degradarlo a ADP. Sin embargo, la presencia de esta apirasa no genera un ciclo fútil y parece estar regulada por el estado energético de la mitocondria (Flores-Herrera y cols. 1999).

Se reportó que la apirasa está relacionada con la síntesis de progesterona, ya que el FSBA, un análogo del ATP, que se une de manera covalente a enzimas que emplean nucleótidos de adenina, inhibe la actividad de la apirasa un 95%, por lo tanto, las mitocondrias no son capaces de sintetizar progesterona (Flores-Herrera y cols. 2002).

Esta propuesta apoya la hipótesis general de que el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales de los tejidos esteroidogénicos se realiza por un complejo proteico a través de sitios de contacto, que en la placenta humana requiere de ATP y de la ATP-difosfohidrolasa, de manera semejante a las mitocondrias de las glándulas suprarrenales, las

cuales requieren de GTP y una GTPasa.

También se propuso que algunas proteínas de choque térmico (Hsp) están relacionadas no solo con procesos de transporte, transducción de señales y translocación de proteínas, sino con la función de algunos receptores de hormonas esteroides; este es el caso del complejo hsp90/hsp70 (Valle y cols. 1999, Pratt y cols, 2003).

En estudios realizados en células tumorales de Leydig MA-10, la expresión de hsp70 afecta la capacidad esteroidogénica mediante la disminución de la expresión de los RNAm de la proteína StAR, disminuyendo el transporte de colesterol y la síntesis de hormonas esteroides (Zhiming y cols. 1997).

En otros tejidos esteroidogénicos como el cuerpo luteo de la rata, la síntesis de hsp70 inhibe la síntesis de progesterona inducida por la hormona luteinizante (LH) sin afectar los niveles de AMPc. Aunque el mecanismo por el cual la hsp70 modifica la síntesis de esteroides no es claro, se propone que estas chaperonas están estrechamente relacionadas con la proteína StAR para el transporte de colesterol (Khanna y cols. 1994,1995). En la placenta humana no se conocen los factores que inducen a las hsp y poco se sabe de cómo éstas pudieran estar relacionadas en la modulación de la esteroidogénesis.

En este trabajo experimental se aislaron los sitios de contacto de las mitocondrias de la placenta humana a término y se caracterizó su composición proteica y su capacidad esteroidogénica. Con respecto a su composición, se demostró que los sitios de contacto presentan diferentes proteínas que típicamente se encuentran en la membrana interna o externa mitocondrial. En cuanto a su actividad esteroidogénica, los sitios de contacto presentan un alto contenido del citocromo P450_{scc} y de colesterol, lo que repercute en su capacidad de sintetizar progesterona. En este sentido, la adición del dominio START de la proteína MLN64 produjo una estimulación en la síntesis de progesterona en los puntos de contacto derivados de la membrana externa, lo que apoya la hipótesis de que esta proteína puede estar involucrada en la esteroidogénesis de la placenta humana.

OBJETIVOS

Aislar los sitios de contacto esteroideogénicos de las mitocondrias de la placenta humana a término

Caracterizar la composición proteica y función de los sitios de contacto esteroideogénicos de las mitocondrias de la placenta humana a termino



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Archives of Biochemistry and Biophysics 413 (2003) 172–181

ABB

www.elsevier.com/locate/yabbi

Contact sites from human placental mitochondria: Characterization and role in progesterone synthesis

Aida Uribe,^a Jerome F. Strauss, III,^b and Federico Martínez^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal 70-159, 04510 México, DF, México

^b Center for Research on Reproduction and Women's Health, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

Received 21 January 2003, and in revised form 19 February 2003

Abstract

To understand the functional compartmentalization of human placental mitochondria, we analyzed the composition and steroidogenic activity of contact sites. Several fractions containing contact sites were isolated using osmotic shock treatment and sucrose gradient centrifugation. These fractions contained various proteins and marker enzymes associated with mitochondrial membranes. The fractions containing the cytochrome P450 side chain cleavage system, cholesterol, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate–isocitrate dehydrogenase, porin, and adenosine 5'-triphosphate–diphosphohydrolase activity showed the capacity to synthesize progesterone. Our observations indicate that all necessary elements and enzymes for steroidogenesis are present and functional in placental mitochondrial contact sites. This organization may facilitate the metabolism of cholesterol delivered to the outer mitochondrial membrane into steroid hormones by the inner mitochondrial membrane cholesterol side chain cleavage system.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Human term placental mitochondria; Contact sites; Progesterone synthesis; Marker enzymes; Mitochondrial cytochromes; Porin; Isocitrate dehydrogenase

The process of steroid hormone synthesis requires cholesterol transport from cytoplasm to mitochondria, cholesterol incorporation into the mitochondrial membranes, and its transformation into pregnenolone (P5)¹ by the cytochrome P450 side chain cleavage system (P450scc) [1]. It is thought that cholesterol transport from the outer mitochondrial membrane to the inner membrane where P450scc resides takes place at contact sites between the outer and the inner mitochondrial membranes [2].

The apposition of the inner and outer membranes, where specific proteins are located or transferred from the cytoplasm into the mitochondria, defines contact sites. Formation of contact sites is thought to be a dynamic phenomenon. They may be a transient environment where proteins and enzymes function as a multienzyme (protein) complex. The contact sites are thus macromolecular complexes that are assembled or disassembled as required for specific mitochondrial functions such as protein transport [3–7], oxidative phosphorylation [8], apoptosis [9,10], the permeability transition pores [11,12], and steroidogenesis [13]. For example, the contact site for protein translocation in mitochondria involves several proteins, including heat shock proteins, the translocases of the outer membrane (TOM) complex, and the translocases of the inner membrane (TIM) proteins [14–17].

Several hypotheses about how contact sites are formed have been proposed. Halestrap and Dunlop [18] and Connern and Halestrap [19] suggested that hormone stimulation of cells increases the mitochondrial

* Corresponding author. Fax: +11-5-616-2419.

E-mail addresses: fedem@pine.servidores.unam.mx, fedem@bq.unam.mx (F. Martínez).

¹ Abbreviations used: P5, pregnenolone; P450scc, cytochrome P450 side chain cleavage system; TOM, translocases of the outer membrane; TIM, translocases of the inner membrane; STAR, steroidogenic acute regulatory protein; SDH, succinate dehydrogenase; MAO, monoamine oxidase; ADK, adenylate kinase; CK, creatine kinase; hsp, heat shock proteins; P4, progesterone; ICDH, isocitrate dehydrogenase; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase.

volume by moving K^+ , which is associated with morphological and physical changes, increasing the number of contact sites. Jefcoate et al. [13] suggested that contact sites could be associated with an increase in steroidogenesis induced by ACTH in the adrenal gland, although ACTH could also be involved in the synthesis of proteins that bind mitochondrial membranes or it could produce changes in mitochondrial volume. In any case, ACTH increases the size and number of contact sites, which in turn could facilitate the passive transport of cholesterol from the outer (cholesterol-rich) membrane to the inner (cholesterol-poor) membrane.

With regard to a complex contact site originally described for oxidative phosphorylation by Brdiczka [20], Jefcoate et al. [13] proposed that octameric creatine kinase with other proteins such as porin, ADP/ATP translocator, hexokinase, glutathione transferase, a phosphoprotein of 30 kDa (later shown to be the steroidogenic acute regulatory protein), and the peripheral-type benzodiazepine receptor could comprise the structure involved in the intramitochondrial transport of cholesterol in steroidogenic tissues.

It has been suggested that the efficient incorporation of cholesterol into vesicles or biological membranes requires a specific lipid and protein composition. It is well known that biological membranes have distinct lipid compositions, resulting in certain membranes containing more cholesterol than others [21]. It has been reported that ACTH increases the synthesis of phospholipids, apparently as a secondary effect on *de novo* synthesis of phosphatidic acid [22], favoring the production of phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine, which in turn increase in concentration in the outer mitochondrial membrane. These data, together with those with regard to the increase in cardiolipin in contact sites [23], suggest that these unions could result from changes in the lamellar configuration of membranes to a hexagonal structure (H_{II}). A higher content of sphingomyelin has been found in the human placental mitochondria, which has been associated with the cholesterol content in biological membranes [24,25].

In adrenal glands, ACTH and cAMP analogues stimulate synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) [26], a protein known to have an essential role in the intramitochondrial transport of cholesterol in adrenal glands and gonads [27]. StAR has a signal peptide that directs it to the mitochondria where it is thought to function as a molten globule [28]. Contact sites, where TOM and TIM are found, may be sites for cholesterol transport mediated by StAR protein [29–32]. In fact, Bose et al. [33] recently demonstrated that StAR, TOM 20, and the outer mitochondrial membrane are necessary for transport of cholesterol to P450_{sc}. Thus, StAR activity (i.e., cholesterol transport) may be expressed immediately prior to or during the translocation of StAR by the TOM/TIM complex [34,35].

The human placenta does not express the StAR protein [36,37]. Therefore, it has been proposed that it must have another system to mediate cholesterol transport [38]. In this regard, isolated placental mitochondria treated with trypsin showed a decrease in pregnenolone synthesis. However, in the presence of 22-OH cholesterol, a sterol that freely crosses biological membranes, mitochondria treated with trypsin synthesized pregnenolone at a rate similar to that of control mitochondria, supporting the notion that a trypsin-sensitive protein is responsible for intramitochondrial cholesterol movement in the placenta [38].

The START domain of MLN64, a protein that shares nearly 60% similarity with StAR [39], could be associated with cholesterol transport in trophoblast cells [40]. Recently, Zhang et al. [41] demonstrated that the MLN64 START domain increases progesterone synthesis when added to intact human term placental mitochondria, suggesting the participation of MLN64 in placental steroidogenesis.

Although several studies have explored progesterone synthesis in the human placenta, our understanding of this process is still rudimentary. In this study, contact sites from human placental mitochondria were isolated and characterized. It was observed that there was enrichment in several marker proteins typically found in the inner or outer mitochondrial membranes, and, interestingly, the contact sites with the highest concentration of P450_{sc}, cholesterol and isocitrate dehydrogenase, retained the capacity to synthesize progesterone. These observations indicate that the steroidogenic machinery of human placental mitochondria is organized in a functional unit in discrete mitochondrial membrane domains.

Materials and methods

Isolation of mitochondria

Human placental mitochondria were isolated as previously described [2]. Protein was determined as described [42], using bovine serum albumin as standard.

Isolation of contact sites

Contact sites were isolated with modifications to the method reported by Ardail et al. [23]. Briefly, 20–25 mg of mitochondrial protein was incubated in an ice bath with 10 mM H_3PO_4 , adjusted to pH 7.3 with Tris base in the presence of 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/ml leupeptin. After incubation, sucrose was added to attain a concentration of 0.382 M and the mixture was then incubated for another 20 min in the ice bath. The mixture was centrifuged at 12,500g for 10 min. The pellet contained mitoplasts, and

the supernatant contained the outer mitochondrial membranes. This supernatant was centrifuged at 137,000g for 1 h to separate the outer membranes.

The mitoplasts were incubated in 1 mM H_3PO_4 , adjusted to pH 7.3 with Tris base, for 20 min in an ice bath; then sucrose was added to reach a concentration of 0.31 M and the mixture was incubated for another 20 min in the ice bath and centrifuged at 102,000g for 1 h. The pellet contained the inner membranes.

Each membrane fraction was sonicated four times in an ice bath for 5 s, in an MSE Soniprep 150 at maximal output. Outer and inner membranes were layered over a discontinuous sucrose gradient (1.06 to 1.29 g/ml densities) and centrifuged at 96,000g for 20 h at 4°C. The outer membrane preparation yielded three bands, and the inner membrane preparation yielded four bands; each band was collected separately and washed three times with 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, with pH adjusted with Tris base to 7.4, and recovered by centrifugation at 137,000g for 30 min at 4°C. The protein content in each band was determined as noted above.

Western blots

Tricine sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) in 10% polyacrylamide gels was performed as described [43] on each fraction. Aliquots containing 25 µg of protein were analyzed. The polypeptides from SDS–PAGE were blotted onto polyvinylidene fluoride or nitrocellulose membranes and the presence of the following proteins was investigated using specific antibodies at the indicated dilutions: Hsp 40 (1:500), Hsp72 (1:500), Hsp27 (1:500), Hsp90 (1:500), porin (VDAC) (1:400), MLN64 (1:1000), cytochrome P450_{sc} (1:300), cytochrome *b* (1:20,000), and cytochrome *c*₁ (1: 50,000).

Enzyme assays

Succinate dehydrogenase (SDH) activity, a marker of the inner mitochondrial membrane, was assayed in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 1.1 mM phenazine methosulfate, 80 µM dichlorophenol indophenol, and 20 mM succinate. The final reaction volume was 1 ml with 50 µg of mitochondrial protein. The reaction was followed at 600 nm at 30°C. A molar extinction coefficient of 21 mM⁻¹ was used for calculation of enzyme activity.

Monoamine oxidase (MAO), a marker of the outer mitochondrial membrane, was determined in 50 mM buffer phosphate, pH 7.4, containing 0.08% Lubrol and 250 µg of protein from each sample, in a final volume of 1 ml. The reaction was started by the addition of 5 mM benzylamine, according to Ochoa [44]. A molar extinction coefficient of 13 mM⁻¹ was used for calculation of enzyme activity.

Adenylate kinase (ADK), a marker of the inter-membrane space, was assayed in the following mixture: 0.2 M Tris buffer, pH 7.3, 0.3% Tween 20, 5 mM ADP, 10 U hexokinase, 10 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $NADP^+$, and 10 mM glucose. The reaction was started by addition of 50 µg of mitochondrial protein. The final reaction volume was 3 ml. Incubations were carried out at 30°C and the formation of NADPH was followed at 360 nm according to Schnaitman and Greenwalt [45]. A molar extinction coefficient of 6.22 mM⁻¹ was used for calculation of enzyme activity.

Creatine kinase (CK) activity, a marker of the contact sites, was determined using reagents purchased from Sigma (DG147-K) and the manufacturer's instructions; 50 µg of mitochondrial protein was assayed at 37°C in a final volume of 1 ml.

Apyrase assay

Hydrolysis of ATP, ADP, CTP, or GTP by apyrase (EC 3.6.1.5) was measured in 30 mM Tris–HCl, pH 8, containing 1 mM $MgCl_2$ with 50 µg of mitochondrial protein at 37°C. The final volume was 0.5 ml. The hydrolysis reaction was started by the addition of 4 mM each nucleotide after 5 min incubation. Trichloroacetic acid was added (6%) to stop the reaction and the mixture was then centrifuged at 4500g for 10 min at 4°C. An aliquot (0.5 ml) of the clear supernatant was used to determine the concentration of the phosphate released using the method described by Sumner [46]. The hydrolysis of ATP, ADP, CTP, or GTP was assayed in each contact site band.

Cholesterol content in contact sites

Cholesterol was determined in each fraction with a commercial kit (CHOD-PAP) purchased from Spinreact SA, Spain, in aliquots of 0.5 mg protein from each submitochondrial fraction.

Progesterone synthesis by contact sites

The synthesis of progesterone was determined in a reaction mixture containing 120 mM KCl, 10 mM 4-morpholineethanesulfonic acid, 0.5 mM EGTA, 10 mM isocitrate, 0.2% bovine serum albumin, 2 mM Pi, 2 mM ADP, 0.4 µg aprotinin/0.1 ml in a final volume of 0.1 ml, pH 7.4, with 0.1 mg of protein from the mitochondrial membranes. The mixture was incubated at 37°C for the indicated times. After the incubation period, the reaction was stopped by the addition of 150 µl methanol and vigorous mixing. Aliquots were taken to determine progesterone using a specific immunoassay (Diagnostic Products Corp.).

Chemicals and antibodies

The antibodies for heat shock protein were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-porin (VDAC, Ab-1) was purchased from Oncogene Res. Products (Boston, MA, USA). P450sc and MLN64 antibodies have been previously described. Antibodies against cytochrome *b* and *c*₁ were a generous gift from Dr. Diego Gonzalez-Halphen and were prepared by Miriam Vázquez, from the Instituto de Fisiología Celular, National University of Mexico, Mexico. All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA).

Data analysis

Experiments were performed at least three times in triplicate. Values are presented as mean \pm SD. Where it is indicated, the results were analyzed for statistical significance using the Tukey–Kramer test. A *p* value of the <0.05 was considered significant.

Results

Several bands were obtained on sucrose gradients in the process of isolation of contact sites (Fig. 1). Three bands were recovered from the outer membrane fraction and four from the inner membrane. The bands were collected from top to bottom of the gradient and numbered sequentially. Band 1 (OM1) from outer membranes was located in the density range 1.10–1.14 g/ml, band 2 (OM2) between 1.19–1.21 g/ml, and band 3 (OM3) between 1.225–1.24 g/ml. For inner membrane, the densities for each band were band 1 (IM1) 1.10–1.14 g/ml, band 2 (IM2) 1.15–1.18 g/ml, band 3 (IM3) 1.20–1.22 g/ml, and band 4 (IM4) 1.24–1.26 g/ml. These patterns were observed in all the isolation experiments

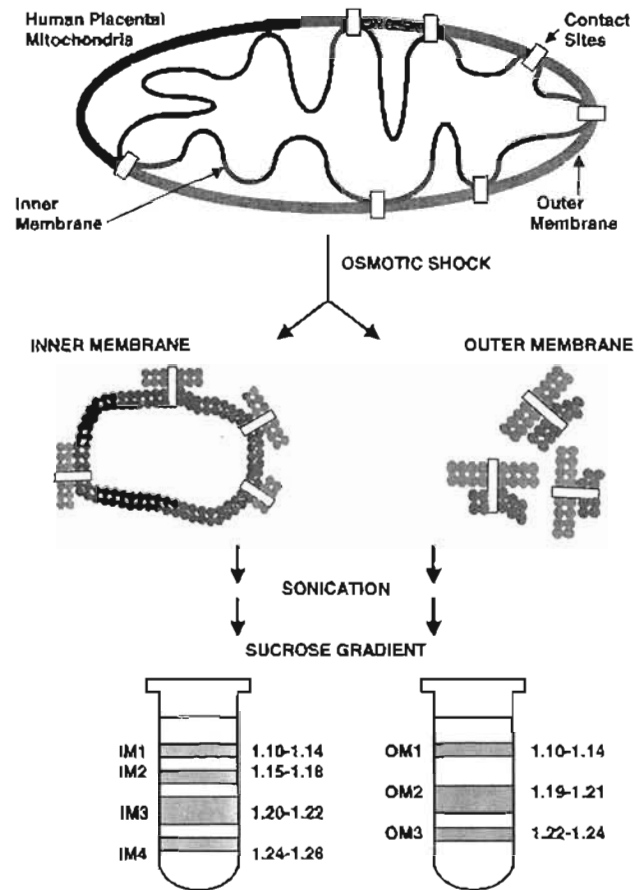


Fig. 1. Isolation of contact sites from human term placental mitochondria. The different contact sites observed during the isolation process after osmotic shock of human placental mitochondria are shown. From the inner mitochondrial membrane, four different contact sites were collected with the following densities: IM1 1.10–1.14 g/ml, IM2 1.15–1.18 g/ml, IM3 1.20–1.22 g/ml, and IM4 1.24–1.26 g/ml. From the outer mitochondrial membrane, three bands were collected: OM1 1.10–1.14 g/ml, OM2 1.19–1.21 g/ml, and OM3 1.22–1.24 g/ml.

Table 1
Enzyme activities observed in contact sites isolated from human placental mitochondria

	SDH	MAO	ADK	CK
Inner membrane				
IM1	15.7 \pm 5.6	12.0 \pm 4.1	10.2 \pm 2.4	1.2 \pm 0.7
IM2	11.5 \pm 6.1	16.9 \pm 4.2	3.2 \pm 0.8	8.6 \pm 1.5
IM3	74.6 \pm 10.8	15.6 \pm 6.0	18.9 \pm 3.1	26.2 \pm 7.3
IM4	47.9 \pm 7.2	6.7 \pm 2.9	4.1 \pm 1.3	15.9 \pm 5.1
Outer membrane				
OM1	9.7 \pm 2.9	27.3 \pm 5.4	9.8 \pm 2.4	0.72 \pm 0.3
OM2	10.6 \pm 0.8	20.3 \pm 4.8	30.7 \pm 5.6	11.4 \pm 1.1
OM3	4.6 \pm 2.5	11.7 \pm 2.6	12.7 \pm 2.7	1.4 \pm 0.8
	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 3

The enzyme activities were determined as described under Materials and methods. Results are expressed as nmol DCPIP/mg/min for succinate dehydrogenase (SDH), nmol benzylamine/mg/min for monoamine oxidase (MAO), nmol NADP reduced/mg/min for adenylate kinase (ADK), and μ KaU/ml for creatine kinase (CK). Each experiment was performed in triplicate. The values shown are the mean \pm SD from three to six different placentas, as indicated.

and appear to be the result of the different structural relationships between inner and outer membranes in each band. The presence of proteins previously reported to be located in contact sites, such as porin and creatine kinase, was determined, in addition to other proteins related to steroidogenesis, such as cytochrome P450_{scc}.

Table 1 shows that CK activity was highest in the IM3 and OM2 bands. Similar patterns were observed for SDH, MAO, and ADK activities.

Porin, a protein associated with contact sites [21,47,48], was present in all contact site fractions isolated. The concentration of porin was higher in the OM contact sites compared to the whole mitochondria, being most abundant in the OM1 and OM2 fractions (Fig. 2).

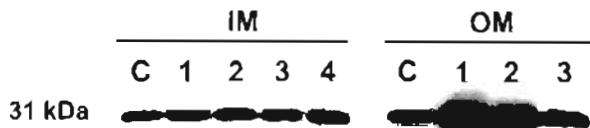


Fig. 2. Presence of porin in contact sites isolated from placental mitochondria. The lines indicate the different contact sites isolated from placental mitochondria. Each band was collected, washed, and concentrated as described under Materials and methods. Western blot analysis of mitochondrial fractions from human placental mitochondria was done using 25 µg of protein. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites in the sucrose gradients.

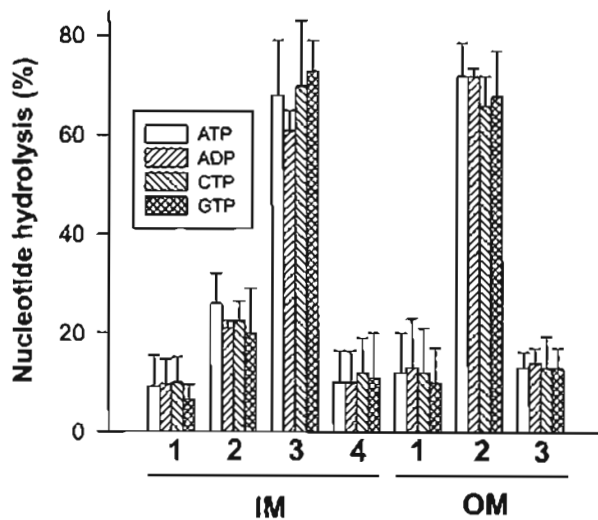


Fig. 3. ATP-diphosphohydrolase activity. ATP-diphosphohydrolase (apyrase) activity was determined by using the following nucleotides: ATP-Mg, ADP-Mg, CTP-Mg, or GTP-Mg. The hydrolysis of these nucleotides in placental mitochondria is solely catalyzed by apyrase since the H⁺-F₁-ATPase exclusively hydrolyzes ATP. Data are the mean + SD from three different experiments done in triplicate. The hydrolysis by the IM and OM membranes before collecting the different contact sites was taken as 100%. The total activity is expressed as nmol of Pi released/total mg obtained in each fraction/min. The total activities varied for IMC were 3200–8000 for ATP-Mg, 2000–8400 for ADP-Mg, 2000–63,000 for CTP-Mg, and 3000–7000 for GTP-Mg. For OMC, total activities were 3200–16,000 for ATP-Mg, 2400–12,000 for ADP-Mg, 2000–12,500 for CTP-Mg, and 1500–14,500 for GTP-Mg.

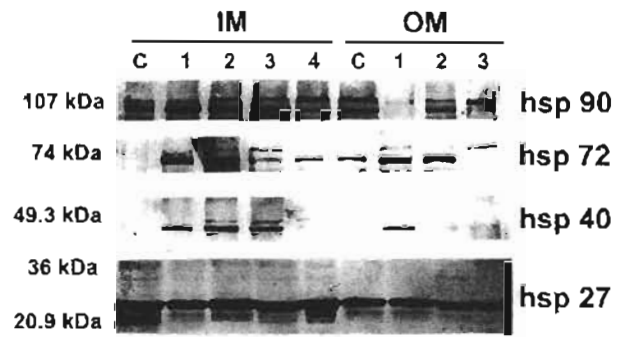


Fig. 4. Western blot of heat shock proteins in placental contact sites. The dilution used for each hsp antibody is described under Materials and methods. The results shown are from a representative experiment. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites on sucrose gradients. Molecular weight markers in kDa, as indicated at left side.

Previously, we described the presence of an ATP-diphosphohydrolase (apyrase) tightly bound to human placental mitochondria [49], which could be associated with attachment points, since its inhibition by FSBA decreased both cholesterol incorporation and P4 synthesis [50]. Since it was suggested that this apyrase could be related to mitochondrial steroidogenesis in the human placenta in the contact sites, its activity was determined in the fractions collected. The results showed apyrase activity in all contact sites (Fig. 3). However, 70% of total apyrase activity was contained in the IM3 and OM2 fractions.

Different heat shock proteins (hsp) have been found to be associated with contact sites [3,51–54]. The distribution of several of the hsps in the contact sites isolated from the human placental mitochondria is shown in Fig. 4. hsp 90, hsp 72, and hsp 40 were more abundant in IM contact sites compared to the starting preparation (C in IM from Fig. 4), with the highest abundance observed in the IM2 and IM3 fractions. The OM2 fraction was relatively enriched in hsp72 compared to the starting preparation (C in OM from Fig. 4), but it did not contain detectable hsp 40. hsp 27 was present at similar levels in all fractions.

Fig. 5 shows that cytochrome *b* is distributed differentially in each contact site fraction with IM3 being the fraction with the highest cytochrome *b* concentration. Cytochrome *c*₁ was not detectable.

Cytochrome P450_{scc} is located in the inner mitochondrial membrane of steroidogenic mitochondria. Fig. 6 shows that P450_{scc} was found mainly in the inner membrane contact site fractions.

The presence of P450_{scc} and apyrase in contact site fractions suggests that they could contain the elements required for steroidogenesis. Therefore, it was important to determine the content of cholesterol in these contact site preparations. IM3 and OM2 had the highest cholesterol contents (Fig. 7), with OM2 having significantly

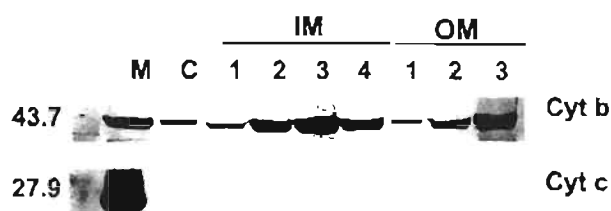


Fig. 5. Identification of respiratory chain cytochromes. Cytochromes *b* and *c* were identified in placental contact sites. Cytochrome *b* was observed in all fractions from inner mitochondrial membrane, but not cytochrome *c*. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites in sucrose gradients; M, mitochondria. Molecular weight markers in kDa, as indicated at left side.

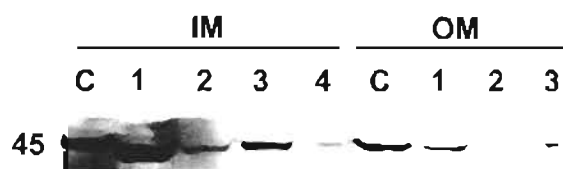


Fig. 6. Identification of cytochrome P450 side chain cleavage in contact sites from placental mitochondria. The determination of cytochrome P450_{scc} was described under Materials and methods. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites in sucrose gradients. Molecular weight marker in kDa, as indicated at left side.

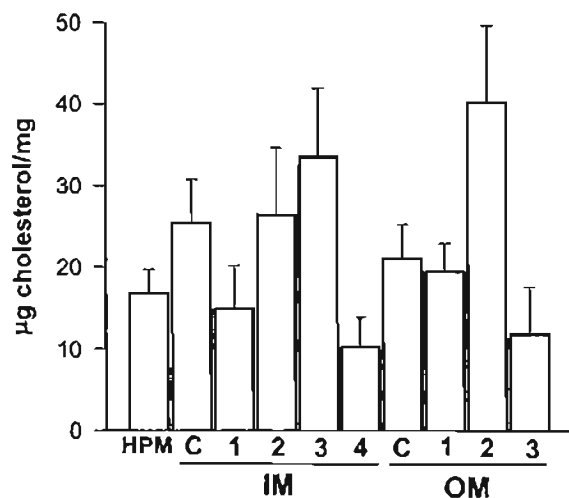


Fig. 7. Concentration of cholesterol. Cholesterol was determined as described under Material and methods. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites on sucrose gradients. The cholesterol content of OM2 is significantly greater than those of other OM contact sites ($p < 0.05$). The cholesterol content of IM3 is significantly greater than that of IM4 ($p < 0.05$).

greater cholesterol than the other OM contact sites and IM3 having greater cholesterol levels than IM4. The presence of proteins containing the MLN64-START domain in the mitochondrial fractions was also analyzed. The results showed that the 55-kDa, full-length MLN64 was present in all OM contact sites (Fig. 8), but it was virtually absent from IM contact sites. These

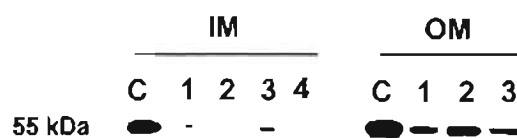


Fig. 8. Western blot for MLN64-START domain. START Western blotting was performed as described under Materials and methods. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites in sucrose gradients. Molecular weight marker in kDa, as indicated at left side.

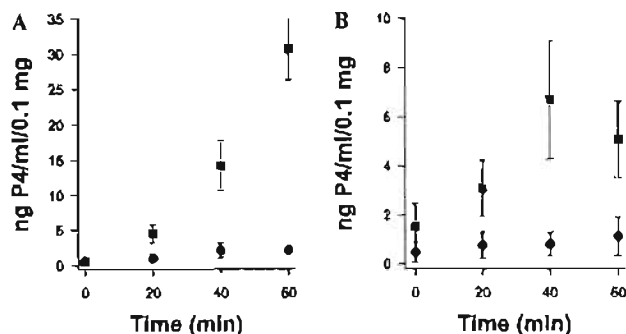


Fig. 9. Progesterone synthesis in IM3 and OM2 isolated from placental mitochondria. P4 synthesis was assayed as described under Materials and methods. Results are the means \pm SD from four different experiments performed in triplicate. (A) Progesterone synthesis by IM3; (B) progesterone synthesis by OM2.

findings are consistent with the notion that MLN64 delivers cholesterol and acts on the outer mitochondrial membrane [41].

We then decided to determine whether IM3 and OM2 were able to synthesize P4. We found that both IM3 and OM2 fractions synthesize P4 at minimal rate. However, when 2 mM NADP⁺ was added, a significant increase in P4 synthesis was observed in the IM3 fraction; while P4 synthesis in OM2 was lower (Fig. 9). These results indicate that NADP-isocitrate dehydrogenase was

Table 2
NADP-ICDH specific activity in different contact sites isolated from human placental mitochondria

	Specific activity (nmol/mg/min)
IMC	53.0 \pm 7.7
IM1	3.9 \pm 0.7
IM2	7.6 \pm 0.8
IM3	55.9 \pm 9.2
IM4	7.4 \pm 0.5
OMC	72.8 \pm 8.2
OM1	24.2 \pm 4.6
OM2	14.6 \pm 1.7
OM3	5.2 \pm 0.9

IMC and OMC are the inner and outer mitochondrial membrane fractions prior to isolation of the respective contact sites on sucrose gradient. Results are the means from three to four different experiments \pm SD.

present, since in the incubation media, isocitrate was the only oxidizable substrate present and no NADPH was added. NADP-ICDH was assayed in each fraction, and the results are shown in Table 2. OM1 and IM3 were the fractions with the highest NADP-ICDH activity, although significant NADP-ICDH activity was present in OM2 (Table 2).

Discussion

The mechanisms controlling steroidogenesis in human placental mitochondria are still unknown. However, there is enough evidence suggesting that cholesterol transport to mitochondria and between the mitochondrial membranes are rate-limiting steps. Similarly to other steroidogenic tissues, contact sites have been proposed as the gate for cholesterol to P450_{scc} in placental mitochondria [38] and, although the specific protein components required for cholesterol transport are unknown, there is a consensus that the basic structure for all contact sites includes adenine translocase, porin, and creatine kinase [8,9,13,20,47]. On this basis, our results show that several types of contact sites can be isolated from human placental mitochondria, since porin was observed in all fractions collected. This is not surprising, since placental mitochondria have other functions, requiring contact sites such as oxidative phosphorylation. The isolation of contact sites was reproducible, since in all experiments the same patterns of bands in the sucrose gradient were obtained. Also, it is reasonable to suggest that each contact site has a particular proportion of inner and outer mitochondrial membrane, as demonstrated by the analyses of the different marker enzymes shown in Table 1. Cytochrome *b* is also present. It is important to point out that Na/K-ATPase activity was not detected in any fraction, indicating no contamination with plasma membrane (data not shown). Moreover, the different contact sites are not likely to be artifacts of protein degradation, since inhibitors of proteases were present during the process of isolation and the electrophoresis pattern from several preparations did not show significant differences, which indicates the absence of significant proteolysis (data not shown).

We previously reported that a novel porin [38] and apyrase activity [50] could be related to progesterone synthesis in placental mitochondria. These proteins might be anticipated to be present in the contact sites where P4 synthesis takes place. Around 70% of the apyrase activity was concentrated in IM3 and OM2 (Fig. 3), corresponding to fractions also containing CK activity and porin, two classical markers of contact sites [55]. IM3 and OM2 also showed an enrichment in hsp 72 compared to starting material, a protein associated with

P4 synthesis in the corpus luteum and adrenal cortex [56–59].

As shown in Fig. 6, cytochrome P450_{scc} was found in IM3, with lesser amounts detectable in OM contact sites. This result is expected given the localization of cytochrome P450_{scc} in the inner mitochondrial membrane. When cholesterol was quantified, its highest concentration per milligram of mitochondrial protein was in OM2, consistent with the known distribution of mitochondrial cholesterol, which is highest in outer membranes [60]. However, cholesterol should be found in the mitochondrial membrane microdomains according to its functional role. This could explain why IM3, where most inner mitochondrial markers were observed, also showed a high cholesterol concentration. Therefore, we assumed that IM3 contains all the elements necessary for P4 synthesis. This assumption appeared to be incorrect when P4 production was determined in the absence of NADP⁺ (Fig. 9). The following results were obtained when we determined P4 synthesis in the contact sites: 12.6% IM1, 14.4% IM2, 63.1% IM3, 9.9% IM4, 19.2% OM1, 71.8% OM2, and 9% OM3 of the combined total P4 synthesis by IM or OM fractions taken as 100%. Although all contact sites synthesized P4, IM3 and OM2 were most active, findings that agree with the marker proteins and enzymes and that support our assumption of different contact sites with distinct protein contents. However, when 2 mM NADP⁺ was added, P4 synthesis by IM3 increased 20 times and almost sixfold in OM2, a response which was not observed in the other fractions (Table 3). These results have several important implications. First, they suggest that NADPH was produced in both contact sites, but mainly in IM3. This indicates that NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (ICDH-NADP) is present in IM3 and OM2, since the only oxidizable substrate in the incubation media was isocitrate and the only electron acceptor was NADP⁺. This implies that ICDH-NADP is a protein associated with inner mitochondrial membrane, since IM3 was the fraction where P4 synthesis was highest. This assumption was confirmed when the

Table 3
Progesterone synthesis by different contact sites in the presence (+) or the absence (-) of 2 mM NADP⁺

Fraction	Progesterone synthesis (ng/ml/0.1 mg)	
	-2 mM NADP ⁺	+2 mM NADP ⁺
IM1	1.03 ± 0.30 (11)	1.05 ± 0.49 (13)
IM2	0.92 ± 0.06 (11)	1.65 ± 0.52 (14)
IM3	1.67 ± 0.36 (9)	29.9 ± 4.36 (19)
IM4	0.76 ± 0.36 (5)	1.24 ± 0.16 (9)
OM1	1.44 ± 0.09 (5)	1.54 ± 0.08 (11)
OM2	1.09 ± 0.33 (11)	7.36 ± 0.61 (14)
OM3	0.30 ± 0.06 (7)	0.74 ± 0.11 (10)

Results are the means from the indicated number of separate experiments (in parentheses) ± SD.

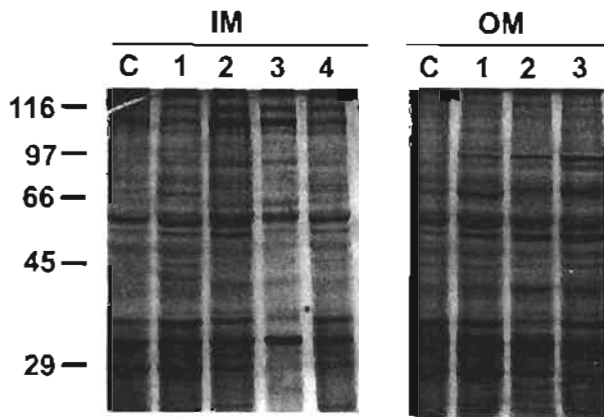


Fig. 10. Proteins in the different contact site fractions isolated from human placental mitochondria. Proteins were separated on SDS-PAGE and detected by silver staining. C is the inner or outer total membrane before the isolation of contact sites in sucrose gradients. Molecular weight markers in kDa, as indicated at left side.

ICDH-NADP activity was determined, and the highest concentration of this enzyme was found in both OM2 and IM3. Similar results were obtained in an analysis of contact sites from adrenal mitochondria [61].

It is unlikely that our fractionation procedure yielded a single fraction containing a particular high proportion of membrane proteins (OM3) because different patterns of proteins were observed among the different contact sites isolated when analyzed by SDS-PAGE (Fig. 10).

Second, adrenodoxin and adrenodoxin reductase must be present in IM3 and OM2, since they are required for the shuttling of electrons to P450_{scc} to complete the transformation of cholesterol into pregnenolone. Previously, we reported synthesis of P4 in submitochondrial particles [62], and the binding of this electron transport chain coupled to cytochrome P450_{scc} to the inner mitochondrial membrane was suggested.

Third, our results suggest that 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)- Δ^{4-5} isomerase is also present in IM3, since this contact site had the highest P4 synthesis. The type I HSD has been described in placental mitochondria [63] and its activity is not rate limiting in P4 production [64–66]. It is possible that OM2 does not have sufficient 3 β -HSD activity and, therefore, P4 production was lower. In any case, the complete system for P4 synthesis is evidently present mainly in IM3.

Four, the endogenous cholesterol located in the inner mitochondrial membrane is the substrate used by the IM3 contact site to synthesize P4, since exogenous cholesterol was not added [67].

When the distribution of the MLN64-START domain was analyzed, it was observed exclusively in the contact sites from outer mitochondrial membranes. This observation is consistent with the notion that START domain proteins involved in cholesterol transport have their site of action in the outer mitochondrial membrane [28]. Our findings raise the possibility that MLN64 delivers cholesterol to contact sites which would, by virtue

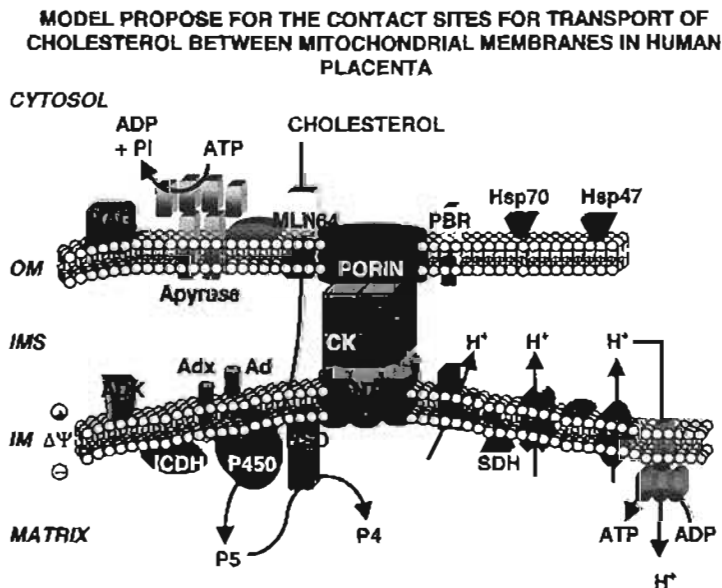


Fig. 11. Possible components of the IM3 contact site. This model shows the localization of some of the proteins analyzed in this study and others whose presence is implied. IMS, intermembrane space; P450, cytochrome P450_{scc}; Adx, adrenodoxin reductase; Ad, adrenodoxin; Cyt c, cytochrome c; Cyt b, cytochrome b; ICDH, isocitrate dehydrogenase-NADP-dependent; PBR, peripheral-type benzodiazepine receptor; HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; small pentagons, different heat shock proteins; IM, inner mitochondrial membrane; OM, outer mitochondrial membrane means a protein providing cholesterol to P450_{scc}; this protein takes cholesterol from inner membrane or from MLN64, Chol, cholesterol; P5, pregnenolone; P4, progesterone. Other abbreviations are defined in the text.

of the organization of the other components of the steroidogenic machinery at these locations, facilitate the metabolism of delivered cholesterol into progesterone. Fig. 11 represents a possible composition of placental contact sites of mitochondria.

Finally, our results suggest that several different types of contact sites may be present in placental mitochondria. IM3 and OM2 contain proteins involved in steroidogenesis. Contact sites with different protein compositions may have specialized functions other than steroidogenesis. The contact sites described in this paper will be useful system for the study of the assembly, function, and regulation of proteins involved in human placental steroidogenesis.

Acknowledgments

This study was partially supported by Grants IN200399 and IN220802 from Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM, by Grant 37263M from CONACyT, and by the Fogarty Center Grant (D43-TW-00671).

References

- [1] F. Martínez, J.F. Strauss III, in: Robert Bittman (Ed.), *Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 205–231.
- [2] F. Martínez, M. Kiriakidou, J.F. Strauss III, *Endocrinology* 138 (1997) 2172–2183.
- [3] G. Schatz, B. Dobberstein, *Science* 271 (1996) 1519–1526.
- [4] K. Tokatlidis, T. Junne, S. Moes, G. Schatz, B.S. Glick, N. Kronidou, *Nature* 384 (1996) 585–588.
- [5] W. Voos, H. Martin, T. Krimmer, N. Pfanner, *Biochim. Biophys. Acta* 1422 (1999) 235–254.
- [6] M. Mori, K. Terada, *Biochim. Biophys. Acta* 1403 (1998) 12–27.
- [7] A. Matouschek, N. Pfanner, W. Voos, *EMBO Rep.* 1 (2000) 404–410.
- [8] V. Adams, W. Bosch, J. Schlegel, T. Wallimann, D. Brdiczka, *Biochim. Biophys. Acta* 98 (1989) 213–225.
- [9] M. Crompton, *J. Physiol.* 529 (2000) 11–21.
- [10] S. Shimizu, Y. Matsuoka, Y. Shinohara, Y. Yoneda, Y. Tsujimoto, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 237–250.
- [11] M. Crompton, *Biochem. J.* 341 (1999) 233–249.
- [12] M. Dolder, S. Wendt, T. Wallimann, *Biol. Signals Recept.* 10 (2001) 93–111.
- [13] C.R. Jefcoate, B.C. McNamara, I. Artemenko, T. Yamazaki, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992) 751–767.
- [14] J. Rassow, P.J.T. Dekker, S. Van Wilpe, M. Meijer, J. Soll, *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 105–120.
- [15] N. Pfanner, E.A. Craig, A. Hönlinger, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (1997) 25–51.
- [16] R.A. Stuart, A. Grubler, I. van der Klei, B. Guiard, H. Koll, W. Neupert, *Eur. J. Biochem.* 220 (1994) 9–18.
- [17] D. Rapaport, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 190–198.
- [18] A.P. Halestrap, J.L. Dunlop, *Biochem. J.* 239 (1986) 559–565.
- [19] C.P. Connern, A.P. Halestrap, *Biochemistry* 35 (1996) 8172–8180.
- [20] D. Brdiczka, *Biochim. Biophys. Acta* 1071 (1991) 291–312.
- [21] C. Hoppel, J. Kerner, P. Turkaly, P. Minkler, B. Tandler, *Anal. Biochem.* 302 (2002) 60–69.
- [22] T. Kimura, *J. Steroid Biochem.* 25 (1986) 711–716.
- [23] D. Ardail, J.P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerne, P. Louisot, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18797–18802.
- [24] N.D. Ridgway, *Biochim. Biophys. Acta* 1484 (2000) 129–141.
- [25] D. Hoekstra, S.C. van Uzendoom, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 496–502.
- [26] D.M. Stocco, *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001) 193–213.
- [27] N.H. Orme-Johnson, *Biochim. Biophys. Acta* 1020 (1990) 213–231.
- [28] H.S. Bose, M.A. Baldwin, W.L. Miller, *Endocr. Res.* 26 (2000) 629–637.
- [29] L.K. Christenson, J.F. Strauss III, *Biochim. Biophys. Acta* 1529 (2000) 175–187.
- [30] L.K. Christenson, J.F. Strauss III, *Arch. Med. Res.* 32 (2001) 576–586.
- [31] D.M. Stocco, *Biochim. Biophys. Acta* 1486 (2000) 184–197.
- [32] D.M. Stocco, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 1245–1254.
- [33] H.S. Bose, V.R. Lingappa, W.L. Miller, *Nature* 417 (2002) 87–91.
- [34] I.P. Artemenko, D. Zhao, D.B. Hales, K.H. Hales, C.R. Jefcoate, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46583–46596.
- [35] Y. Tsujishita, J.H. Hurley, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 408–414.
- [36] T. Sugawara, J.A. Holt, D. Driscoll, J.F. Strauss III, D. Lin, W.L. Miller, D. Patterson, K.P. Clancy, I.M. Hart, B.J. Clark, D.M. Stocco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 4778–4782.
- [37] E.S. Pollack, E.E. Furth, C.B. Kallen, F. Arakane, M. Kiriakidou, K.F. Kozarsky, J.F. Strauss III, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 82 (1997) 4243–4251.
- [38] M.T. Espinosa-García, J.F. Strauss III, F. Martínez, *Placenta* 21 (2000) 654–660.
- [39] J.F. Strauss III, L.K. Christenson, L. Devoto, F. Martínez, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 55 (2000) 3–12.
- [40] H. Watari, F. Arakane, C. Moog-Lutz, C.B. Kallen, C. Tomasetto, G.L. Gerton, M.C. Rio, M.E. Baker, J.F. Strauss III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8462–8467.
- [41] M. Zhang, P. Liu, N.K. Dwyer, L.K. Christenson, T. Fujimoto, F. Martínez, M. Comly, J.A. Hanover, E.J. Blanchette-Mackie, J.F. Strauss III, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 33300–33310.
- [42] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.J. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [43] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350–4354.
- [44] S. Ochoa, in: S. Colowick, N. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 1, Academic Press, New York, 1955, pp. 735–748.
- [45] C. Schnaitman, J. Greenwalt, *J. Cell Biol.* 38 (1969) 158–175.
- [46] J.B. Sumner, *Science* 100 (1944) 413–414.
- [47] G. Beutner, A. Rück, B. Riede, W. Welte, D. Brdiczka, *FEBS Lett.* 369 (1996) 189–195.
- [48] F. Gasnier, R. Rousson, F. Lerne, E. Vanagay, P. Louisot, O. Gateau-Roesch, *Anal. Biochem.* 212 (1993) 173–178.
- [49] O. Flores-Herrera, A. Uribe, J.P. Pardo, J.L. Rendón, F. Martínez, *Placenta* 20 (1999) 475–484.
- [50] O. Flores-Herrera, A. Uribe, C. García-Pérez, R. Milán, F. Martínez, *Biochim. Biophys. Acta* 1585 (2002) 11–18.
- [51] K. Mihara, T. Omura, *Trends Cell Biol.* 6 (1996) 104–108.
- [52] B. Bukau, A.L. Horwich, *Cell* 92 (1998) 351–366.
- [53] R.E. Jensen, A.E. Johnson, *Curr. Biol.* 9 (1999) R779–R782.
- [54] T. Krimmer, J. Rassow, W.H. Kunau, W. Voos, N. Pfanner, *Mol. Cell. Biol.* 20 (1990) 5879–5887.
- [55] M. Kottke, V. Adams, T. Wallimann, V.K. Nalam, D. Brdiczka, *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991) 215–225.
- [56] A. Khanna, R.F. Aten, H.R. Behrman, *Endocrinology* 136 (1995) 1775–1781.
- [57] A. Khanna, R.F. Aten, H.R. Behrman, *Steroids* 59 (1994) 4–9.
- [58] A. Khanna, R.F. Aten, H.R. Behrman, *Mol. Endocrinology* 9 (1995) 1431–1440.
- [59] Z. Liu, M.D. Stocco, *Endocrinology* 138 (1997) 2722–2728.

- [60] G. Daum, *Biochim. Biophys. Acta* 822 (1985) 1–42.
- [61] M. Culty, H. Li, N. Boujrad, H. Amri, B. Vidic, J.M. Bernassau, J.L. Reversat, V. Papadopoulos, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 69 (1999) 123–130.
- [62] M.T. Espinosa-García, F. Martínez, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38 (1996) 205–214.
- [63] C. Beaudoin, C.H. Blomquist, M. Bonenfant, Y. Tremblay, *J. Endocrinol.* 154 (1997) 379–387.
- [64] N. Cherradi, G. Defaye, M.E. Chambaz, *Endocrinology* 134 (1994) 1358–1364.
- [65] N. Cherradi, F.M. Rossier, B.M. Vallotton, R. Timberg, I. Friedberg, J. Orly, J.X. Wang, M.D. Stocco, M.A. Capponi, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7899–7907.
- [66] N. Cherradi, M.A. Capponi, *TEM* 9 (1998) 412–418.
- [67] J.F. Strauss III, F. Martínez, M. Kiriakidou, *Biol. Reprod.* 54 (1996) 303–311.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los mecanismos que controlan la esteroidogénesis en las mitocondrias de la placenta humana son aún desconocidos. Sin embargo, se tienen evidencias que indican que el transporte de colesterol a la mitocondria entre la membrana externa y la membrana interna mitocondriales es el paso limitante en la síntesis de hormonas esteroides. En este sentido, se ha sugerido, de manera similar a lo que ocurre en otros tejidos esteroidogénicos, que en la placenta los sitios de contacto mitocondriales son la vía de entrada del colesterol desde el citosol hasta el citocromo P450_{scc}. Se ha mencionado que los sitios de contacto son complejos macromoleculares dinámicos, que se conforman para realizar diversas funciones mitocondriales específicas; su correcta asociación crea un ambiente particular que permite que las proteínas que los integran realicen de forma eficiente su función; asimismo, que la asociación específica de diferentes enzimas y proteínas pueden producir diferentes puntos de unión. Así se tienen sitios de contacto específicos para el transporte de proteínas en los diferentes compartimentos mitocondriales, sitios de contacto asociados a fenómenos como la apoptosis, fosforilación oxidativa y aquellos relacionados con el transporte de lípidos. Bose (2002) ha demostrado que para el transporte de colesterol se requieren tanto de la proteína StAR como de otras proteínas asociadas a los complejos de las translocasas de membrana externa (TOM), lo que sugiere que este fenómeno requiere de una maquinaria similar al punto de unión que se emplea para el transporte de proteínas.

No obstante, sólo se ha podido establecer con certeza que el translocador de adenín nucleótidos y la porina forman parte de este tipo de sitios de contacto, el resto de sus componentes específicos aún se desconocen (Beutner 1996, Brdiczka 1991, Jelcoate 1992, McCabe 1983, Adams 1989, Crompton 2000). En este sentido, este trabajo muestra que en las mitocondrias de la placenta humana (MPH) se pueden constituir diversos tipos de sitios de contacto, en los que la porina, la creatina cinasa y el translocador de adenín nucleótidos son los elementos básicos de su conformación. Esto refleja que la mitocondria puede estar realizando diversos procesos metabólicos de manera simultánea, donde los sitios de contacto participan activamente, por ejemplo, en la fosforilación oxidativa y en el transporte de colesterol. Además, se propone que cada tipo de sitio de contacto presenta una proporción diferente de membrana externa e interna, con base en la presencia de diferentes enzimas marcadoras que podrían reflejar su función (Tabla 1).

Recientemente hemos reportado la presencia de una nueva porina (Espinosa-García y cols. 2000) y una ATP-difosfohidrolasa (Flores-Herrera y cols. 2002), que podrían estar relacionadas con la

síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana. Si esta hipótesis es correcta, ambas proteínas deberían estar asociadas a los puntos de unión donde se lleva a cabo la síntesis de progesterona. En este sentido, el 70% de la actividad total de la apirasa se localizó en la IM3 (fracción 3 de la membrana interna) y OM2 (fracción 2 de la membrana externa) (Figura 3, publicación), donde también se presenta la mayor actividad de la CK y la porina, ambas proteínas consideradas como marcadores clásicos de los sitios de contacto (Kottke y cols. 1991, Schlattner y cols. 2001, Brdiczka y cols. 1994). Más aun, tanto en la fracción IM3 como en la fracción OM2 se detectó a una proteína de choque térmico, la Hsp70, la cual está asociada con la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo y en la corteza de las glándulas suprarrenales sensibles a LH (Khanna y cols. 1994, 1995a, b, Liu y cols. 1997). Asimismo, Stocco (2000, 2001a) ha sugerido que durante la maduración de la proteína StAR, la proteína Hsp70 actúa como una chaperonina que protege y dirige a la StAR hacia los sitios de contacto.

Otra enzima importante en la esteroidogénesis es el citocromo P450_{scc}, el cual se encuentra principalmente en los sitios de contacto derivados de la membrana interna mitocondrial. Esto correlaciona con la localización de este citocromo en la mitocondria íntegra. Además, la concentración de colesterol por mg de proteína mitocondrial es mayor en la OM2, similar a lo reportado por Daum (1985) después de estudiar la distribución de colesterol en diferentes sistemas mitocondriales. Sin embargo, en la mitocondria íntegra, el colesterol debe distribuirse entre sus membranas de acuerdo con la función que este esteroide desempeña. Esto puede explicar la alta concentración de colesterol en la fracción IM3, lo que sugiere que en este tipo de sitios de contacto se encuentran todos los elementos necesarios para la síntesis de progesterona.

Por otro lado, cuando se determinó la síntesis de progesterona en ausencia de NADP⁺ todas las fracciones mostraron síntesis hormonal: IM1 12.6%, IM2 14.4%, IM3 63.1%, IM4 9.9%, OM1 19.2%, OM2 71.8%, y OM3 9%, donde la síntesis total de la hormona por parte de la IM y OM se consideró como el 100%. Aunque los diferentes sitios de contacto sintetizaron progesterona, se puede observar que la IM3 y OM2 fueron las fracciones que tuvieron el mayor valor de este parámetro. Debido a que las fracciones IM3 y OM2 tienen diversas proteínas marcadoras, se apoya la idea de que en la mitocondria se encuentran diferentes tipos de sitios de contacto.

Por otra parte, cuando la síntesis de progesterona se determinó en presencia de NADP⁺, la producción hormonal se incrementó alrededor de 20 veces en la IM3 y de 6 veces en la OM2. Estos resultados son muy interesantes. En primer lugar, aunque el NADPH se produjo en ambas fracciones, su cantidad fue mayor en la IM3, lo que coincide con la síntesis de

progesterona. La aparición del NADPH refleja la presencia de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (ICDH-NADP) tanto en la IM3 como en la OM2, ya que en el medio de incubación el único sustrato oxidable fue el isocitrato y el NADP⁺ el único aceptor de electrones. Esto implica que la ICDH-NADP es una enzima asociada a la membrana interna mitocondrial. Lo anterior quedó claramente demostrado al determinar la actividad de la ICDH-NADP en los diferentes puntos de contacto, siendo en la IM3 y OM2 en donde se localizó principalmente a esta enzima. Resultados similares fueron obtenidos en los sitios de contacto aislados a partir de las mitocondrias adrenales.

Estas observaciones también tienen otras implicaciones. Por ejemplo, la conexión entre la síntesis del NADPH y la transformación del colesterol en pregnenolona (P5) está representada por la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa. En este sentido, Espinosa-García y cols. (1996), reportaron que las partículas submitocondriales pueden sintetizar progesterona y que la cadena de transporte de electrones (la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa) asociada al citocromo P450_{scc} se encuentra en la membrana interna mitocondrial. Esto sugiere que para aportar el poder reductor al citocromo P450_{scc}, en la IM3 y OM2, se encuentra la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa.

Asimismo, el citocromo P450_{scc} sólo transforma al colesterol en pregnenolona; la síntesis posterior de progesterona depende del complejo 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^{4-5} isomerasa (complejo HSD). Los resultados sugieren que en la fracción IM3 se encuentra el complejo HSD, debido a que estos sitios de contacto son capaces de sintetizar progesterona. En las mitocondrias de la placenta se ha descrito la presencia del complejo HSD tipo I (Beaundoin y cols.1997), cuya actividad catalítica no es el paso limitante en la vía de producción hormonal (Cherradi y cols. 1994, 1997, 1998). En este sentido, es posible que la concentración del complejo HSD en la OM2 no sea suficiente para realizar una eficiente transformación de la pregnenolona. No obstante, es claro que el complejo de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^{4-5} isomerasa está presente en las fracciones IM3 y OM2.

Por otra parte, el colesterol que se transforma en pregnenolona por el citocromo P450_{scc} es aquel que se encuentra en la membrana interna (IM3), debido a que durante la síntesis de progesterona no se adicionó colesterol al medio de reacción. El colesterol de la membrana externa mitocondrial (OM2) no es accesible para el citocromo P450_{scc}. En este sentido, Zhang (2002) reportó que la MLN64-START recombinante estimula la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana, lo que sugiere que esta proteína está involucrada en el movimiento de colesterol hacia el citocromo P450_{scc} para la síntesis de pregnenolona. De hecho, la expresión de una forma dominante negativa de la proteína MLN64

causa la acumulación de colesterol libre en los lisosomas (Strauss JF III y cols. 2003).

Un resultado interesante fue la localización de la proteína MLN64 en los diferentes tipos de sitios de contacto, la cual se observó exclusivamente en aquellos derivados de la membrana externa mitocondrial, pero no en los derivados a partir de la membrana interna. A este respecto, Bose (2002) reportó que la proteína involucrada en el transporte de colesterol tiene su sitio de acción en la membrana externa de la mitocondria. Como se muestra en la Tabla 4, la adición de la MLN64-START recombinante incrementa 2 veces la síntesis de progesterona en la fracción OM2, pero no en la fracción IM3, lo que apoya la hipótesis anterior.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que la mitocondria de la placenta humana presenta un sitio de contacto particular y que aquellos que contienen toda la maquinaria necesaria para la síntesis hormonal están en la fracción IM3 y la fracción OM2. El colesterol que usa el citocromo P450_{scc} se localiza en la membrana interna y el sitio de acción de la MLN64 es en la membrana externa, lo que sugiere su papel en la incorporación del colesterol a la mitocondria. Por último, el procedimiento para aislar a los sitios de contacto y la caracterización descrita en este trabajo, es una herramienta muy poderosa para el estudio de las diferentes proteínas involucradas en el transporte de colesterol a la mitocondria y el cómo estas trabajan en la esteroidogénesis de la placenta humana.

BIBLIOGRAFÍA

Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T & Brdiczka D (1989) Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases. *Biochim Biophys Acta*. 98: 213-225.

Alpy F, Stoeckel EM, Dierich A, Escola JM, Wendling C, Chenard MP, Vanier TM., Gruenberg J, Tomasetto C & Rio MC (2001) The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem*. 276(6): 4261-4269.

Arakane F, Kallen BG, Watari H, Foster AJ, Sepuri VBN, Pain D, Stayrook ES, Lewis M, Gerton LG & Strauss FJ III (1998) The Mechanism of Action of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J Biol Chem*. 273(26): 16339-16345.

Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F & Louisot P (1990) Mitochondrial Contact Sites. Lipid Composition and Dynamics. *J Biol Chem*. 265: 18797-18802.

Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, Hales KH & Jefcoate CR (2001) Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem*. 276: 46583-46596.

Bakker A, Bernaert I, Bie DM, Ravingerova T, Ziegelhöffer A, Van BH & Jacob W (1994) The effect of calcium on mitochondrial contact sites: a study on isolated rat hearts. 1224: 583-588.

Barbara JG & Takeda K (1995) Voltage-dependent currents and modulation of calcium channel expression in zone fasciculate cells from rat adrenal gland. *J Physiol*. 488(3): 609-622.

Bauer PM, Bridgham JT, Langenau DM, Johnson AL & Goetz WF (2000) Conservation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein structure and expression in vertebrates. *Mol Cell Endocrinol*. 168: 119-125.

Barnea ER, Fares F & Gavish M (1989) Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 64:155-159.

Beaudoin C, Blomquist CH, Bonenfant M & Tremblay Y (1997) Expression of the genes for 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and cytochrome P450_{scc} during syncytium formation by human placental cytotrophoblast cells in culture and the regulation by progesterone and estradiol. *J Endocrinol*. 154: 379-387.

Behrman HR & Greep RO (1972) Hormonal dependence of cholesterol ester hydrolase in the corpus luteum and adrenal. *Horm Metab Res*. 4: 206-209

Beutner G, Rück A, Riede B, Welte W & Brdiczka D (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett*. 369: 189-195

Biermans W, Bernaert I, De Bie M, Nijs B & Jacob W Ultrastructural localization of creatine kinase activity in the contact sites between inner and outer mitochondrial membranes of rat myocardium. *Biochim Biophys Acta*. 974: 74-80.

Black MS, Harikrishna AJ, Szklarz DG & Miller LW (1994) The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{scc}. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 7247-7251.

Blanchly-Dyson E, Zambronicz EB, Yu WH, Adams V, McCabe ER, Adelman J, Colombini M & Forte M (1993) Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem.* 268 (3): 1835-1841.

Blanchly-Dyson E, Baldini A, Litt M, McCabe ER & Forte M (1994) human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane: mapping and identification of two new isoforms. *Genomics.* 20(1): 62-67.

Bose SH, Baldwin MA & Miller WL (2000) Evidence that StAR and MLN64 act on the outer mitochondrial membrane as molten globules. *Endocr Res.* 26: 629-637.

Bose SH, Whittall MR, Huang MCh, Baldwin AM & Miller LW (2000) N-218 MLN64, a protein with StAR-like steroidogenic activity, is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochem.* 39: 11722-11731.

Bose HA, Lingappa VR & Miller WL (2002) Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature.* 417: 87-91.

Brdiczka D (1991) Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1071: 291-312.

Bukau B & Horwich AL (1998) The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92: 351-366.

Brownie AC, Simpson ER, Jefcoate CR, Boyd GS, Orme-Johnson WH & Beinert H (1972) Effect of ACTH on cholesterol side-chain cleavage in rat adrenal mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 46: 483-490.

Campbell AM, Capuano A & Chan SH (2002) A cholesterol-binding and transporting protein from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1567(1-2): 123-132.

Casellas P, Galiegue S & Basile AS (2002) Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int.* 40: 475-486.

Chacinska A, Rehling P, Guiard B, frazier E A, Schulze-Specking A, Pfanner N, Voos W & Meisinger C (2003) Mitochondrial traslocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J.* 22(20): 5370-5381.

Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ & Vahouny GV (1982) Sterol carrier protein 2: Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem.* 257: 8928-8934.

Chapman D (1975) Lipid dynamics in cell membranes, in: *Cell Membranes. Biology and Pathology* (G: Weismann and R Clairborne, eds) pp. 13-22. HP Publishing Co., New York.

Chaudhary J, Bhattacharyya S & Das C (1992) Regulation of progesterone secretion in human syncytiotrophoblast in culture by human chorionic gonadotropin. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 42 (3/4): 425-432.

Cherradi N, Defaye G & Chambaz ME (1994) Characterization of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinol.* 134(3): 1358-1364.

Cherradi N, Rossier FM, Vallotton BM, Timberg R, Friedberg I, Orly J, Wang JX, Stocco MD & Capponi MA (1997) Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450_{scc} and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem.* 272(12): 7899-7907.

Cherradi N & Capponi MA (1998) The acute regulation of mineralocorticoid biosynthesis: scenarios for the StAR system. *TEM.* 9(10): 412-418.

Christenson LK & Strauss JF III (2000) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1529:175-187.

Christenson LK & Strauss JF III (2001) Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res.* 32: 576-586.

Ciocca RD, Oesterreich S, Chamness CG, McGuire LW & Fuqua AWS (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (hsp27): a review. *J Nat Cancer Institute.* 85(19): 1558-1570.

Clark BJ, Ranganathan V & Combs R (2001) Steroidogenic acute regulatory protein expression is dependent upon post-translational effects of camp-dependent protein kinase A. *Mol Cel Endocrinol.* 173: 183-192.

Connern CP & Halestrap AP (1996) Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to [Ca²⁺]. *Biochemistry.* 35: 8172-8180.

Cooke BA, Choi MC, Dirami G, López-Ruiz MP & West AP (1992) Control of steroidogenesis in Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol .* 43: 445-449

Crompton M, Virji S & Ward MJ (1998) Cyclophilin-D bind strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258: 729-735.

Crivello JK & Jefcoate CR. (1980) Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. *J Biol Chem* 255: 8144-8151.

Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341: 233-249.

Crompton M (2000) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and the role in cell death. *J Physiol* 529: 11-21.

Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson & Ward MJ (2002) The mitochondrial permeability transition pore. En *Mitochondria and Cell Death*. Biochemical Society Symposium No. 66 Edited. G.C. Brown., D.G. Nicholls and C.E. Copper. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.167-179.

Culty M, Li H, Boujrad N, Amri H, Vidic B, Bernassau JM, Reversat L & Papadopoulos V (1999) In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69: 123-130.

Culty M, Luo L, Yao Z, Chen H, Papadopoulos V & Zirkin BR (2002) Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging leydig cells. *J Androl* 23(3): 439-447.

Daum G (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 822: 1-42.

De Pierre JW & Ernster L (1977) Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu Rev Biochem*. 46:201-262.

Divers MJ, Bulmer JN, Miller D & Lilford RJ (1995) Placental heat-shock proteins: immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour. *Gynecol Obstet Invest*. 40(4): 236-243.

Dolder M, Wendt S & Wallimann T (2001) Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept*. 10 (1-2): 93-111.

Dupré-Aucouturier S, Penhoat A, Rougier O & Bilbaut A (2002) ACTH-induced Cl(-) current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion *Am J Physiol Endo Metab*. 282: E355-E365.

Dyall DS, Brown TM & Johnson JP (2004) Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science*. 304: 253-257.

Endo T, Yamamoto H & Esaki M (2003) *J Cell Sci*. 116: 3259-3267.

Enyeart JJ, Mlinar B & Enyeart JA (1993) T-type Ca²⁺ channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *J Mol Endo*. 7: 1031-1040.

Espinosa-García MT & Martínez F (1996) Presence of an NAD(P)H dehydrogenase and a b-type cytochrome different from respiratory chain in submitochondrial particles from human placenta. *Biochem Mol Biol Int*. 38: 205-214.

Espinosa-García MT, Strauss JF III & Martínez F (2000) A trypsin-sensitive protein is required for utilization of exogenous cholesterol for pregnenolone synthesis by placental mitochondria. *Placenta*. 21: 654-660.

Esterman A, Finlay & TH Dancis J. (1996) The effect of hypoxia on term trophoblast: Hormone synthesis and released. *Placenta*. 17: 217-222

- Flores-Herrera O, Uribe A, Pardo JP, Espinosa-García MT, Meaney A & Martínez F (1996) Characterization of the F1-F0-ATPase and the tightly-bound ATPase activities in the submitochondrial particles from human term placenta. *Placenta*. 17: 345-350.
- Flores-Herrera O, Uribe A, Pardo JP, Rendón JL & Martínez F (1999) A novel ATP-diphosphohydrolase from human term placental mitochondria. *Placenta*. 20: 475-484.
- Flores-Herrera O, Uribe A, García-Pérez R, Milán R & Martínez F (2002) 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyladenine inhibits progesterone synthesis in human placental mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1585: 11-18.
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T & Ichikawa Y (1988) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P450_{scc} (CYP X1A1), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem*. 71: 2231-2238.
- Gasnier F, Rousson R, Lerme F, Vanagay E, Louisot P & Gateau-Roesch O (1993) Use of percoll gradients for isolation of human placenta mitochondria suitable for investigating outer membrane proteins. *Anal Biochem*. 212: 173-178
- Gincel D, Zaid H & Shoshan-Barmatz V. (2001) Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J*. 358: 147-155.
- Golani I, Weizman A, Leschiner S, Spanier I, Eckstein N, Limor R, Yanai J, Maaser K, Scherübl H, Weisinger G & Gavish M (2000). Hormonal regulation of peripheral benzodiazepine receptor binding properties is mediated by subunit interaction. *Biochemistry*. 40: 10213-10222.
- Gwynne JT & Mahaffee DD (1989) Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem*. 264: 8141-8150.
- Hackenbrock CR (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 61: 598-605.
- Halestrap AP & Dunlop JL (1986) Intramitochondrial regulation of fatty acid beta-oxidation occurs between flavoprotein and ubiquinone. A role for changes in the matrix volume. *Biochem J*. 239: 559-565.
- Hall PF (1985) Trophic stimulation of steroidogenesis: In search of the elusive trigger. *Recent Prog Horm Res*. 41: 1-39
- Hanukoglu I, Rapoport R, Weiner L & Sklan D (1993) Electron leakage from the mitochondrial NADPH-dependent adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system. *Archiv Biochem Biophys*. 305: 489-498
- Hartl UF & Martin J (1992) Protein folding in the cell: The role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol S*. 21: 293-322.
- Hauet T, Han Z, Wang Y, Hameury F, Jayle C, Gibelin H, Goujon JM, Eugene M & Papadopoulos V (2002) Modulation of peripheral-type benzodiazepine receptor expression levels in ischemia reperfusion injury in a pig kidney graft model. *Transplantation*. 74: 1507-1515.

Hauet T, Liu J, Li H, Gazouli M, Culty M & Papadopoulos V (2002) PRB, StAR and PKA : partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endo Res.* 28(4): 395-401.

Hauet T, Yao ZX, Bose SH, Wall TC, Han Z, Li W, Hales BD, Miller LW, Culty M & Papadopoulos V (2005) Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor-Mediated Action of Steroidogenic Acute Regulatory Protein on Cholesterol Entry into Leydig Cell Mitochondria. *Mol Endocrinol.* 19 (2): 540-554.

Herrmann MJ & Neupert W (2000) What fuels polypeptide translocation? An energetic view on mitochondrial protein sorting. *Biochim Biophys Acta.* 1459: 331-338.

Hoekstra D & van IJzendoorn SC (2000) Lipid trafficking and sorting: how cholesterol is filling gaps. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 496-502.

Hoogenraad JN, Ward AL & Ryan TM (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1592: 97-105.

Hoppel C, Kerner J, Turkaly P, Minkler P & Tandler B (2002) Isolation of hepatic mitochondrial contact sites: previously unrecognized inner membrane components. *Anal Biochem.* 302: 60-69.

Igarashi Y & Kimura T (1984) Adrenocorticotrophic hormone mediated changes in rat adrenal mitochondrial phospholipids. *J Biol Chem.* 259: 10745-10753.

Illsey NP, Coade SB & Harkness RA (1985) Human Placental Mitochondrial Respiration and its Regulation by Adenine Nucleotides. *Placenta.* 6: 187-197.

Ito H, Inaguma Y & Kato K. (2003) Small heat shock proteins participate in the regulation of cellular aggregates of misfolded protein. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 121(1): 27-32

Jefcoate CR, DiBartolomeos MJ, Williams CA & McNamara BC (1987) ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 27: 721-729.

Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I & Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochromes P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 43: 751-767.

Jefcoate C (2002) High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *J Clin Inv.* 110 (7): 881-890.

Jensen RE & Johnson AE (1999) Protein Translocation: is Hsp70 pulling my chain? *Curr Biol.* 9: R779-R782.

Juhola KM, Shah HZ, Grivell AL & Jacobs TH (2000) The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.* 481: 91-95.

Kallen BC, Billheimer TJ, Summers AS, Stayrook ES, Lewis M & Strauss JF III (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem.* 273 (41): 26285-26288.

Kaser M & Langer T (2000) Protein degradation in mitochondria. *Semin Cell Dev Biol.* 11(3): 181-190.

Khanna A, Aten RF & Behrman HR (1995) Physiological and Pharmacological inhibitors of luteinizing hormone-dependent steroidogenesis induce heat shock protein-70 in rat luteal cells. *Endocrinol.* 136(4): 1775-1781.

Khanna A, Aten RF & Behrman HR (1994) Heat Shock protein induction blocks hormone-sensitive steroidogenesis in rat luteal cells. *Steroids.* 59: 4-9

Khanna A, Aten RF & Behrman HR (1995) Heat Shock protein-70 induction mediates Luteal Regression in the rat. *Mol Endocrinol.* 9(11): 1431-1440.

Khanna A, Aten FR & Behrman RH. (1995) Physiological and pharmacological inhibitor of luteinizing hormone-dependent steroidogenesis induce heat-shock protein -70 in rat luteal cells. *Endocrinol.* 136(4): 1775-1781.

Kimura T (1986) Transduction of ACTH signal from plasma membrane to mitochondria in adrenocortical steroidogenesis. Effects of peptide, phospholipid, and calcium. *J Steroid Biochem.* 25: 711-716.

Koehler CM (2000) Protein Translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.* 476: 27-31.

Kottke M, Adams V, Walliman T, Nalam VK & Brdiczka (1991) Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites. *Biochim Biophys Acta.* 1061: 215-225.

Krimmer T, Rassow J, Kunau WH, Voos W & Pfanner N (1990) The mitochondrial protein import motor: the ATPase domain of matrix hsp70 is crucial for binding Tom44, while the peptide binding domain and the carboxy-terminal segment play a stimulatory role. *Mol Cell Biol.* 20: 5879-5887.

Kumar S, Blumberg DL, Canas JA & Maddaiah VT (1994) Human chorionic gonadotropin (hCG) increases cytosolic free calcium in adult rat Leydig cells. *Cell Calcium.* 15, 349-355

Kuyznierewicz, I and Thomson, M. (2002) GTP-Binding proteins Gs α , Gi α , and Ran identified in mitochondria of human placenta. *Cell Biol Inter.* 26 (1): 99-108.

Lacapere JJ, Dalavoie F, Li H, Peranzi G, Maccario J, Papadopoulos V & Vidic B (2001) Structural and Functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *Biochem Biophys Res Commun.* 248:536-541.

Lacapere JJ & Papadopoulos V (2003) Pheripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids.* 68: 569-585.

Lambeth JD & Kamin H (1979) Adrenodoxin reductase-Adrenodoxin complex. *J Biol Chem.* 254: 2766-2774.

Landry J, Crete P, Lamarche S & Chrétien P (1988) Activation of Ca²⁺-dependent processes during heat shock: role in cell thermotolerance. *Radiation Research*. 113: 426-436.

La-Piana G, Marzulli D, Gorgoglione V & Lofrumento NE (2005) Porin and cytochrome oxidase containing contact sites involved in the oxidation of cytosolic NADH. *Arch Biochem Biophys*. 436(1):91-100.

Lasunción MA, Bonet B & Knopp RH (1991) Mechanism of the HDL₂ stimulation of progesterone secretion in culture placental trophoblast. *J Lipid Res*. 32: 1073-1086.

Lehoux JG, Mathieu A, Lavigne P & Fleury A (2003) Adrenocorticotropin Regulation of steroidogenic Acute Regulatory Protein. *Microscopy Res Techn*. 61:288-299.

Li H, Papadopoulos, V. (1998) Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinol*. 139 (12): 4991-4997.

Li H, Yao ZX, Degenhardt B, Teper G & Papadopoulos V (2001) Cholesterol Binding at the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by and HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 1267-1272

Liu ZX & Stocco MD (1997) Heat Shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinol*. 138(7): 2722-2728.

Liscum L & Underwood WK. (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem*. 270(26): 15443-15445.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275.

Lutter M, Perkins AG & Wang X (2001) The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol*. 2: 22-29

Manna PR, Pakarinen P, El-Hefnawy T & Huhtaniemi IT (1999) Functional assessment of the calcium messenger system in cultured mouse Leydig tumor cells: regulation of human chorionic gonadotropin-induced expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinol*. 140: 1739-1751.

McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR & Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89: 3170-3174.

Martínez F, Chávez E & Echegoyen S (1987) Decrease exchange of adenine nucleotides in human term placental mitochondria. *Int J Biochem*. 19: 275-279.

Martínez F, Echegoyen S, Briones R & Cuellar A. (1988) Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J Lipid Res*. 29: 1005-1011.

- Martínez F, Pardo JP, Flores-Herrera O & Espinosa-García MT (1995) The effect of osmolarity on human placental mitochondria function. *Int J Biochem Cell Biol.* 27: 795-803.
- Martínez F, Kiriakidou M & Strauss JF III (1997) Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. *Endocrinol.* 138: 2172-2183.
- Martínez F & Strauss III JF (1997) Regulation of mitochondrial cholesterol metabolism. In *subcellular Biochemistry. Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine.* Vol 28, pp 205-234. Ed. R Bittman. New York: Plenum Press.
- Matouscheck A, Pfanner N & Voos W (2000) Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO reports.* 1 (5): 404-410.
- Maxfield RF & Wüstner D (2002) Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest.* 110 (7): 891-898.
- Mertz LM & Pedersen RC (1989) The kinetics of steroidogenesis activator polypeptide in the rat adrenal cortex. *J Biol Chem.* 264: 15274-15279
- Mihara K & Omura T (1996) Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol.* 6: 104-108.
- Miller WL (1995) Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 55 (5-6): 607-616
- Mokranjac D, Popov-Celeketic D, Hell K & Neupert W (2005) Role of tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem.* 280(25): 23437-23440.
- Moog-Lutz C, Tomasetto C, Regneir CH, Wendlig C, Lutz Y, Muller D, Chenard MP, Basset P & Rio MC (1997) MNL64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer.* 71: 183-191.
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES & Mann M (2003) *Cell.* 115: 629-640
- Mori M & Terada K (1998) Mitochondrial protein import in animals. *Biochim Biophys Acta.* 1403: 12-27.
- Morimoto RI, Tissieres A & Georgopoulos C (1994) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Murphy DB, Lalli E, Walsh PL, Liu Z, Soh J, Stocco MD & Sassone-Corsi P (2001) Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol.* 15(8): 1255-1263
- Thomson M (2003) Does Cholesterol use the mitochondrial contact sites as conduit to the steroidogenic pathway? *BioEssays.* 25: 252-258.

- Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A & Martínez F (1999) Differences in cholesterol incorporation into mitochondria from hepatoma AS-30D and human term placenta. *Placenta*. 20: 285-291.
- Newmeyer DD & Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: Releasing power for life and Unleashing the machineries of death. *Cell*. 112: 481-490.
- Nicolay K, Rojo M, Wallimann T, Demel R & Hovius R (1990) The role of contact sites between inner and outer mitochondrial membrane in energy transfer. *Biochim Biophys Acta*. 1018: 229-233.
- Niswender D. (2002) Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*. 123: 333-339.
- Ochoa S (1955) In *Methods in Enzymology*. S. Colowick y N. Kaplan. Editors. Academic Press, Inc. New York. 1, 735-748
- Orme-Johnson NH (1990) Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1020: 213-231.
- Papadopoulos V, Mari H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM & Drieu K (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroid*. 62: 21-28
- Papadopoulos V (1998) Structure and fuction of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 217: 130-142.
- Papadopoulos V (2002) Peripheral benzodiazepine receptor: structure and fuction in health and disease. *Ann Pharm Fr*. 61(1): 30-50
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E & Garrido C (2003) Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 304(3): 505-512.
- Pastorino JG & Hoek JB (2003) Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem*. 10(16): 1535-1551.
- Pfaller R, Kleene R & Neupert W (1990) Biogenesis of mitochondrial porin: The import pathway. *Experientia*. 46: 153-161.
- Pfanner N & Craig EA Hönlinger (1997) Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13: 25-51
- Pfanner N & Geissler A (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 339-349
- Pfeifer SM, Furth EE, Ohba T, Chang YJ, Rennert H, Sarukagi N, Billheimer JT & Strauss JFIII (1993) Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 47: 167-172.

Podrow C, Roe MS, O'Brien R, Ladbury EJ, Piper WP & Pearl HL (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the hsp90 molecular chaperone. *Cell*. 90:65-75

Pollack S, Furth E, Kallen B, Arakane F, Kiriakidou M, Kozarsky F & Strauss JF III (1997) Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 82 (12): 4243-4251.

Pon AL & Orme-Johnson NR (1986) Acute stimulation of steroidogenesis in corpus luteum and adrenal cortex by peptide hormones. *J Biol Chem* 261(14): 6594-6599.

Popp B, Schmid A & Benz R (1995). Role of sterols in the functional reconstitution of water-soluble mitochondrial porins from different organism. *Biochemistry* 34, 3351-3261.

Poting CP y Aravind L (1999a). StART: a lipid-binding domain in StAR, HD-218 and signalling proteins. *Trends in Biochemical Science*. 24: 130-132.

Poting CP, Schultz J, Milpetz F & Bork P (1999b) SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Research*. 27: 229-232.

Pratt BW & Toft OD (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and Immunophilin chaperones. *Endocrine Rev*. 18 (3): 306-360.

Pratt WB & Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med*. 228(2): 111-133.

Privalle CT, Crivello JF & Jefcoate CR (1983) Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P450 in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci. USA* 80: 702-706.

Quinn SJ & Williams GH (1988) Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol*. 50: 409-426.

Ramnath HI, Peterson S, Michael AE, Stocco DM & Cooke BA (1997) Modulation of steroidogenesis by chloride ions in MA-10 mouse tumor leydig cells: roles of calcium, protein synthesis and the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinol*. 138: 2308-2314.

Rapaport D (2002) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *TRENDS Biochem Sci*. 27(4): 190-198.

Rassow J, Dekker PJT, Van Wilpe S, Meijer M & Soll J (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: Function and Evolution . *J Mol Biol*. 286: 105-120.

Reichert SA & Neupert W (2002) Contact Sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta*. 1592:41-49

Ridgway ND (2000) Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta*. 1484: 129-141.

Ringler GE, Kao LC, Miller WL & Strauss III JF (1989) Effects of 8-bromo-AMPC on expression of endocrine functions by culture human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Mol Cell Endocrinol.* 61: 13-21.

Rojo M, Hovius R, Demel RA, Nicolay K & Walliman T (1991) Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem.* 266(30): 20290-20295.

Rüdiger S, Buchberger A & Bukau B (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol.* 4: 432-349.

Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endo Rev.* 15: 574-626.

Sato H, Ashida N, Suhara K, Itagaki E, Takemori S & Katagiri M (1978) Properties of and adrenal cytochrome P-450 (P-450_{11β}) for the hydroxylations of corticosteroids. *Arch Biochem Biophys.* 190(1):307-314.

Seedorf U, Ellinghaus P & Nofer RJ (2000). Sterol carrier protein-2. *Biochim Biophys Acta.* 1486, 42-54

Seki H, Zosmer A, Elder MG, Sullivan MHF (1997) The regulation of progesterone and hCG production from placental cells by interleukin-1 β . *Biochim Biophys Acta.* 1336: 342-348.

Sewer BM & Waterman R M (2003) ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microscopy Res Technique.* 61: 300-307.

Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N & Meisinger C (2003) *Proc Natl Acad Sci. USA.* 100: 13207-13212.

Sierra A (2004) Neurosteroids: The StAR Protein in the Brain. *J Neuroendocrinol.* 16:787-793.

Schatz G (1996) The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem.* 271 (50): 31763-31766.

Schatz G & Dobberstein B (1996) Common principles of protein traslocation across membranes. *Science.* 271: 1519-1526.

Schlattner U, Dolder M, Walliman T & Schlattner T (2001) Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem.* 276(61): 48027-48030.

Schnaitman C & Greenwalt J (1969) Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol.* 38: 158-175

Shanker YG & Rao AJ (1997) Regulation of progesterone biosynthesis in the human placenta by estradiol 17 β and progesterone. *Biochem Molec Biol Int.* 43: 591-599.

Shen W J, Patel S, Natu V, Hong R, Wang J, Azhar S & Kraemer BF (2003) Interaction of hormone-sensitive lipase with steroidogenic acute regulatory protein. Facilitation of cholesterol transfer in adrenal. *J Biol Chem.* 278(44): 43870-43876.

Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y & Tsujimoto Y (2001) Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol.* 152: 237-250.

Shoshan-Barmatz V, Zalk R, Gincel D & Vardi N (2004) Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. *Biochim Biophys Acta.* 1657 (2-3): 105-114

Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387: 569-572.

Simpson ER, McCarthy JL & Peterson JA (1979) Evidence that the cycloheximide-sensitive site of ACTH action is in the mitochondrion. *J Biol Chem.* 253: 3135-3139.

Soccio RE & Breslow JL (2003) StAR-related Lipid Transfer (START) Proteins: Mediators of Intracellular Lipid Metabolism. *J Biol Chem.* 278 (25): 22183-22186

Soccio RE, Adams RM, Maxwell KN & Breslow JL (2005) Differential gene regulation of StarD4 and StarD5 cholesterol transfer proteins: Activation of StarD4 by SREBP-2 and StarD5 by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.*

Soundar S & Colman RF (1993) Identification of metal-isocitrate binding site of pig heart NADP-specific isocitrate dehydrogenase by affinity cleavage of the enzyme by Fe²⁺-isocitrate. *J Biol Chem.* 268: 5264-5271.

Speer O, Back N, Buerklen T, Brdiczka D, Koretsky A, Wallimann T & Eriksson O (2005) Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J.* 385(Pt 2): 445-450.

Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss JF III, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ & Stocco DM (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 4778-4782.

Sumner JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science.* 100: 413-414.

Stocco DM (2000) Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1486: 184-197.

Stocco DM (2000) StARTing understand cholesterol transfer. *Nature Struct Biol.* 7(6): 445-447

Stocco DM (2001a) Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol.* 15: 1245-1254.

Stocco DM (2001b) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* 63: 193-213.

Stuart RA, Gruhler ., van der Klei I, Guiard B, Koll H & Neupert W (1994) The requirement of matrix ATP for the import of precursor proteins into the mitochondrial matrix and intermembrane space. *Eur J Biochem.* 220: 9-18

Stuart RA, Cyr MD & Neupert W (1994) Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia.* 50: 1002-1011.

Schlattner U, Dolder M, Walliman T & Tokarska-Schlattner M (2001) Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem.* 276(51): 48027-48030.

Schneider JJ & Hood AD (2000) Effect of thyroid hormone on mtHsp70 expression, mitochondrial import and processing in cardiac muscle. *J Endocrinol.* 165: 9-17.

Strauss JF III, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N & Gafvels ME (1992) The AMPc signalling system and human trophoblast function. *Placenta.* 13: 389-403.

Strauss JF III & Kallen C (1994) The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): A window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Progress in Hormone Research.* 54: 369-394.

Strauss JF III, Martínez F & Kiriakidou M (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod.* 54:303-311.

Strauss JF III, Christenson LK, Devoto L & Martinez F (2000) Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J Reprod Fertil Suppl.* 55: 3-12

trauss JF III, Kishida T, Christenson LK, Fujimoto T & Hiroi H (2003) StAR domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Mol Cell Endocrinol.* 202(1-2): 59-65.

Sumner JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science.* 100: 413-414.

Suzuki KC, Rep M, Van Dijl MT, Suda K, Grivell AL, Schatz G (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *TIBS* 22:118-123.

Swierczynski J, Scislowski P, Aleksandrowicz Z & Zelewski L (1982) NAD(P)-dependent malic enzyme in human term placental mitochondria. *Biochem Med.* 28: 247-255.

Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Wamock DE, Wiley S, Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW & Ghosh SS (2003) *Nat Biotechnol.* 21: 281-286.

Thomson M, Lim G, Hall PF & Kuyznierewicz I (1998) Overlay blot identification of GTP-binding proteins in mitochondria from human placenta. *Placenta.* 19: 209-215.

Thomson M (2003) Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a conduit to the steroidogenic pathway? *BioEssays.* 25: 252-258.

Tokatlidis K, Junne T, Moes S, Schatz G, Glick BS & Kronidou N (1996) Translocation arrest of an intramitochondrial sorting signal next to Tim11 at the inner-membrane import site. *Nature*. 384: 585-588.

Tokatlidis K & Schatz G (1999) Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. *J Biol Chem*. 274(50): 35285-35288.

Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.

Trzeciak WH & Boyd GS (1973) The effects of stress induced by ether anaesthesia on cholesterol content and cholesteryl esterase activity in the adrenal cortex. *Eur J Biochem*. 37: 327-333

Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV & Waterman MR (1987) Studies on the synthesis of SCP-2 in rat adrenal cortical cells in monolayer culture. *J Biol Chem*. 262:3713-3720.

Tsujiyama Y & Hurley JH (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol*. 7(5): 408-414.

Tuckey RC, Kostadinovic Z & Cameron KJ (1994) Cytochrome P-450_{scc} activity and Substrate supply in human placental trophoblast. *Mol Cell Endocrinol*. 105: 103-109

Tuckey RC, McKinley AJ & Headlam MJ (2001) Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450_{scc} in mitochondria from the human placenta. *Eur J Biochem*. 268: 2338-2343.

Tuckey RC, Woods ST & Tajbakhsh M (1997) Electron transfer to cytochrome P450_{scc} limits cholesterol side chain cleavage activity in the human placenta. *Eur J Biochem*. 244: 835-839.

Tuckey RC, Headlam MJ, Bose HS & Miller WL (2002) Transfer of cholesterol between phospholipids vesicles mediated by the Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*. 277(49): 47123-47128.

Voos W, Martin H, Krimmer T & Pfanner N (1999) Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1422: 235-254

Vyssokikh MY, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jurgensmeier JJ & Brdiczka D (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect. *Mol Biol Rep*. 29(1-2): 93-96.

Vyssokikh YM & Brdiczka D (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Polonica*. 50(2): 389-404.

Vyssokikh M & Brdiczka D (2004) VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease. *Mol Cell Biochem*. 256-257 (1-2): 117-126.

Wang X, Liu Z, Eimerl S, Timberg R, Weiss MA, Orly J & Stocco MD (1998) Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer. *Endocrinol.* 139 (9): 3903-3912.

Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, Rio MC, Baker ME & Strauss JF III (1997) MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 94: 8462-8467.

Wiedemann N, Frazier EA & Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem.* 279(15): 14473-14476.

Weizman R & Gavish M (1993) Molecular Cellular and behavioural aspects of peripheral-type benzodiazepine receptors. *Clin Neuropharmacol.* 16(5): 401-417

West LA, Horvat RD, Roess DA, Barisas BG, Juengel JL & Niswender GD (2001) Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associated at the mitochondrial membrane. *Endocrinology.* 142: 502-505.

Wunsh DM, Anderson LD, Pepe GJ & Albrecht ED (1986) Regulation of progesterone formation by human placental cells in culture. *Endocrinology.* 119: 998-1003.

Xu X, Xu T, Robertson DG & Lambeth JD (1989) GTP stimulates pregnenolone generation in isolated rat adrenal mitochondria. *J Biol Chem.* 264: 17674-17680.

Xu TS, Bowman EP, Glass DB & Lamberth JD (1997). Stimulation of adrenal mitochondria cholesterol side-chain cleavage by GTP, steroidogenesis activator polypeptide (SAP), and sterol carrier protein 2. GTP and SAP act synergistically. *J Biol Chem.* 266 (11): 6801-6807.

Zhang M, Liu P, Dwyer NK, Christenson LK, Fujimoto T, Martinez F, Comly M, Hanover JA, Blanchette-Mackie EJ & Strauss JF III (2002) MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem.* 277: 33300-33310.

Zhao Q, Wang J, Levichkin VI, Stasinopoulus S, Ryan TM & Hoogenraad JN (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* 21(17): 4411-4419.

Zhiming L & Stocco MD (1997) Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinol.* 138(7): 2722-2728.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**