

ELZIRA ELISABETH SAVIANI



# ESTUDO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS ENVOLVIDAS EM PROCESSOS DE TRANSDUÇÃO DE ENERGIA EM PLANTAS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Elzira Elisabeth Saviani e aprovada pela Comissão Julgadora.

04/11/98 Ione Salgado Martins

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado Martins

Campinas - SP

1998

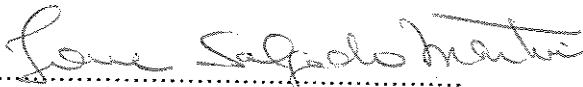
170065



Campinas, 04 de novembro de 1998.

## BANCA EXAMINADORA

### TITULARES:

Profa. Dra. Ione Salgado Martins (orientadora)..... 

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé..... 

Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvea..... 

Profa. Dra. Lúcia Pereira-da-Silva..... 

Profa. Dra. Márcia Regina Braga..... 

### SUPLENTE:

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo.....

Prof. Dr. Luíz Gonzaga Santoro.....

Ao meu marido, Kesler,

e a minha filha Thaís,

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ione Salgado Martins, pela valiosa orientação, amizade e apoio que fizeram resultar neste trabalho e que muito contribuíram para a minha vida profissional.

Aos professores Dra. Denise Vaz de Macedo, Dra. Lúcia Pereira-da-Silva e Dr. Luiz Gonzaga Santoro, pela revisão e sugestões dadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP (FAEP), pelo apoio financeiro.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Fisiologia Vegetal, pelo apoio e amizade, que tornaram a condução deste trabalho bastante agradável.

Aos meus pais Synesio e Elzira, à minha irmã Heloisa e às minhas tias Edith e Maíse, pelo apoio, carinho e pelo auxílio em todas as coisas do dia a dia, facilitando a minha vida, durante a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

Abreviaturas.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	v
1. Introdução.....	1
1.1. Proteína desacopladora do tecido adiposo marrom.....	1
1.2. A UCP pertence a uma família de carreadores mitocondriais.....	2
1.3. A expressão da UCP além do TAM.....	3
1.4. Efeito dos AGL no desacoplamento mitocondrial.....	6
1.5. A ATP sintetase mitocondrial.....	7
1.6. A oxidase alternativa.....	9
1.7. Identificação de sítios de ligação de nucleotídeos.....	11
2. Objetivos .....	14
3. Materiais e Métodos .....	15
3.1. Material vegetal .....	15
3.2. Meios utilizados para isolar mitocôndrias vegetais.....	15
3.3. Isolamento de mitocôndrias de batata .....	15
3.4. Isolamento de mitocôndrias de abacate .....	16
3.5. Purificação de mitocôndrias de abacate em gradiente de densidade de percoll .....	17
3.6. Preparo de membrana mitocondrial de abacate .....	18
3.7. Isolamento de mitocôndrias de fígado .....	18
3.8. Isolamento de mitocôndrias de tecido adiposo marrom .....	19
3.9. Dosagem de proteína .....	20

3.10. Meios de reação .....	20
3.11. Atividade respiratória.....	20
3.12. Identificação de proteínas mitocondriais por fotoafinidade.....	21
3.12.1. Ligação não covalente de 8-azido[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP a proteínas mitocondriais..	21
3.12.2. Marcação por fotoafinidade utilizando-se 8-azido[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP.....	22
3.12.3. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida das amostras fotomarcadas..	23
3.12.4. Auto-radiografia .....	24
3.13. Determinação do potencial elétrico de membrana.....	24
4. Resultados .....	26
4.1. Ligação não covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de tubérculo de batata e de fígado de rato .....	26
4.2. Ligação de 8-azido ATP, sensível ao GTP, em mitocôndrias de tubérculo de batata.....	28
4.3. Efeito do pH na ligação de 8-azido ATP em mitocôndrias de fígado e de batata.....	30
4.4. Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de batata .....	33
4.5. Efeito de palmitato e CAT na atividade respiratória de mitocôndrias de tubérculo de batata .....	35
4.6. Efeito de palmitato, CAT e oligomicina no potencial elétrico de mitocôndrias de batata .....	40
4.7. Caracterização de mitocôndrias de frutos de abacate pré- e pós-climatério..	40
4.8. Respiração resistente ao cianeto em mitocôndrias de abacate.....	45
4.9. Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de abacate.....	47
4.10. Efeito de BSA sobre o potencial de membrana de mitocôndrias de fruto de abacate .....	49

4.11. Efeito de inibidores de canais de $H^+$ sobre o $\Delta\Psi$ de mitocôndrias de frutos de abacate .....	53
5. Discussão e Conclusões.....	59
6. Literatura citada .....	66
7. Trabalhos publicados.....	81

**ABREVIATURAS**

ADP	Adenosina-5' -difosfato
AGL	Ácidos graxos livres
ATP	Adenosina-5' -trifosfato
BKA	Boncrecato
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Carboxiatractilosídeo
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EGTA	Ácido etileno glicol-bis-( $\beta$ -aminoetil eter)-NN'-tetra acético
FCCP	p-trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina
F <sub>o</sub>	Porção hidrofóbica da ATP-sintetase
F <sub>1</sub>	Porção hidrofílica da ATP-sintetase
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetano-sulfônico
MES	Ácido morfolino-etano-sulfônico
M.M.	Massa molecular
Oligo	Oligomicina
PAL	Palmitato
PUMP	Proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TAM	Tecido adiposo marrom
UCP	Proteína desacopladora
$\Delta\psi$	Potencial elétrico de membrana



## RESUMO

No presente trabalho foi utilizado 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP para identificar a proteína desacopladora (PUMP) presente em mitocôndrias de tubérculos de batata. Um sítio para a ligação de nucleotídeos, distinto daquele presente no translocador de ADP/ATP, foi caracterizado. Este sítio de ligação de nucleotídeos de adenina se mostrou sensível ao GTP, apresentando uma constante de dissociação para 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP de 21  $\mu$ M, com ligação máxima em pH baixo. A sensibilidade ao GTP e a dependência ao pH, do sítio de ligação para nucleotídeos de adenina, identificado em mitocôndrias de tubérculos de batata, não foi detectada em mitocôndrias de fígado de rato, mas se assemelha ao presente na proteína desacopladora de mitocôndrias do tecido adiposo marrom. O marcador 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP foi covalentemente incorporado em mitocôndrias de tubérculos de batata através de irradiação ultravioleta. Duas bandas principais de 30 e 32 KDa foram identificadas na auto-radiografia do gel eletroforético em SDS das proteínas mitocondriais. Estas bandas correspondem ao translocador de ADP/ATP e à PUMP, uma vez que não ocorreu na presença de carboxiatractilosídeo (CAT) ou GTP, respectivamente, que são ligantes destas proteínas.

O presente trabalho também verificou se o translocador de ADP/ATP, além da PUMP, participa do desacoplamento de mitocôndrias de batata, mediado por ácidos graxos livres (AGL). A respiração mitocondrial energizada por succinato foi estimulada por baixas concentrações de palmitato. Este desacoplamento pôde ser revertido por CAT e subsequentemente por BSA, um quelante de AGL. O decréscimo na diferença de potencial elétrico

transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) causado por palmitato foi suprimido por CAT e, em menor extensão, por boncrecato (BKA), inibidores específicos do translocador de ADP/ATP. GTP foi também capaz de reverter este decréscimo por um mecanismo CAT-independente. Estes resultados indicaram que o translocador de ADP/ATP, além da PUMP, participam da ação protonofórica do palmitato em mitocôndrias de tubérculos de batata.

As contribuições da  $F_1 F_0$  - ATP sintetase, do translocador de ADP/ATP e de uma possível proteína desacopladora como a PUMP, no disparo respiratório mitocondrial observado no amadurecimento de frutos climatéricos como o abacate, foram também analisadas. Foram comparados os conteúdos da subunidade  $\beta$  de  $F_1$  e do translocador de ADP/ATP, através de marcação por fotoafinidade com 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, bem como o  $\Delta\Psi$  estabelecido pela oxidação de succinato, em mitocôndrias isoladas de frutos de abacate pré- e pós-climatéricos. O conteúdo da subunidade  $\beta$  de  $F_1$  decresceu, enquanto que o do translocador de ADP/ATP não se alterou com amadurecimento dos frutos. O  $\Delta\Psi$  estabelecido pela oxidação de succinato em mitocôndrias de frutos pós-climatéricos foi bastante baixo e pôde ser substancialmente aumentado por oligomicina, que é capaz de inibir o transporte de  $\text{H}^+$  através da  $F_0$ , e pelos nucleotídeos purínicos, GTP ou ATP, que inibem o transporte de  $\text{H}^+$  pela proteína desacopladora presente em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de tubérculos de batata. Oligomicina e GTP não tiveram efeito no  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias de abacate pré-climatérico. CAT e BKA não tiveram efeito no  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias de abacate pré- ou pós-climatérico. Estes resultados sugerem que uma proteína do tipo PUMP possa existir em mitocôndrias de abacate, e que esta proteína, bem como a porção  $F_0$  de moléculas da ATP sintetase deficientes em

subunidades  $\beta$ , mas não o translocador de ADP/ATP, poderiam funcionar como vias de dissipação de energia em mitocôndrias de frutos de abacate pós-climatéricos.

## ABSTRACT

In the present work we used 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP to identify the uncoupling protein of potato tuber mitochondria (PUMP). An adenine nucleotide binding site is described which is distinct from the one present in the ADP/ATP translocator. This adenine nucleotide binding site is sensitive to GTP with a dissociation constant for 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP of 21  $\mu$ M and an optimum at acidic pH. The GTP sensitivity and pH dependence of the adenine nucleotide binding site, detected in potato tuber mitochondria, was not apparent in rat liver mitochondria, and closely corresponds to the uncoupling mitochondrial protein of brown adipose tissue mitochondria. The probe 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP was covalently incorporated into potato tuber mitochondria by near ultraviolet irradiation. Two major radioactive bands of 30 and 32 KDa were identified in the autoradiography of the SDS gel electrophoresis of potato mitochondrial proteins. These bands correspond to the ADP/ATP translocator and PUMP, since labelling was prevented by carboxyatractyloside (CAT) or GTP, ligands of these proteins, respectively.

The present work also examined whether the ADP/ATP translocator, other than PUMP, participates in free fatty acid (FFA)-mediated uncoupling of potato tuber mitochondria. The basal respiration rate of succinate-energized mitochondria was stimulated by a low concentration of palmitate. This uncoupling was reversed by CAT and by the subsequent addition of bovine serum albumin, an FFA scavenger. The decrease in the transmembrane electrical potential difference ( $\Delta\Psi$ ) caused by palmitate was suppressed by CAT and, to a lesser degree, by bongkrekate (BKA), specific inhibitors of the ADP/ATP translocator. GTP could also reversed this decrease via a CAT-independent mechanism.

These results indicate that the ADP/ATP translocator, along with the PUMP, participates in the protonophoric action of palmitate in potato tuber mitochondria.

The contribution of the  $F_1 F_0$  - ATP synthase, the ADP/ATP translocator and a putative uncoupling mitochondrial protein, such as PUMP, to the increased respiratory activity of ripened avocado fruits was also determined. We have compared the  $\beta$ -subunit content of  $F_1$  and ADP/ATP translocator, determined by photoaffinity labelling with 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP, and the  $\Delta\Psi$  established by substrate oxidation, in mitochondria isolated from pre- and postclimacteric avocado fruits. The  $\beta$ -subunit content of  $F_1$  decreased, while that of ADP/ATP translocator did not change, by ripening. The  $\Delta\Psi$  established by succinate oxidation of postclimacteric avocado mitochondria was very low and could be substantially increased by oligomycin, which inhibits  $H^+$  transport through  $F_0$ , and by the purine nucleotides GTP or ATP, which inhibit  $H^+$  transport through the uncoupling protein of brown adipose tissue and potato tuber mitochondria. Oligomycin and GTP had no effect on the  $\Delta\Psi$  of preclimacteric avocado mitochondria. CAT and BKA, had no effect on the  $\Delta\Psi$  of pre- or postclimacteric avocado mitochondria. These results suggest that a PUMP-like protein may exist in mitochondria of postclimacteric avocado fruits, and that this protein and  $F_0$  from  $\beta$ -detached ATP synthase, but not the ADP/ATP translocator, could provide pathways for energy dissipation in ripened avocado fruit mitochondria.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. 1. A proteína desacopladora do tecido adiposo marrom

A membrana interna das mitocôndrias do tecido adiposo marrom (TAM) de mamíferos apresenta uma alta condutividade a  $H^+$  (NICHOLLS, 1977). Como consequência, nestas mitocôndrias, a maior parte da energia liberada pela oxidação de substratos respiratórios é convertida em calor, ao invés de gerar ATP. Neste caso, os íons  $H^+$ , exportados pela cadeia respiratória, retornam à matriz, desviando-se da síntese de ATP, sem passar pela porção  $F_0$  da ATP sintetase. O característico desacoplamento observado neste tipo de mitocôndria (SMITH *et al.*, 1966, PEDERSEN, 1970) é portanto explicado por este curto-circuito na corrente de prótons, através da membrana interna (NICHOLLS, 1977, 1979; KLINGENBERG & LIN, 1986). Este é considerado um importante mecanismo termogênico desenvolvido pelos mamíferos para resistir ao frio e regular a temperatura corporal e está presente no tecido adiposo marrom de recém-nascidos humanos, roedores, assim como de animais que hibernam (NICHOLLS, 1979; NICHOLLS & LOCKE, 1984; KLINGERBERG & LIN, 1986).

A base molecular para explicar a alta condutância a  $H^+$  das mitocôndrias do TAM é uma proteína de 32 KDa, a proteína descopladora (UCP), presente na membrana interna destas mitocôndrias que é capaz de transportar  $H^+$  (ou  $OH^-$ ) e também  $Cl^-$  (NICHOLLS, 1977). A UCP é altamente regulada, sendo sua atividade diminuída por nucleosídeos di- ou trifosfatados e aumentada por ácidos graxos (NICHOLLS, 1977).

Estudos iniciais mostraram que a UCP presente nas mitocôndrias do TAM era intensamente induzida pela exposição ao frio. Sabe-se hoje que a expressão da UCP está sob controle central, assim, durante a exposição ao frio a norepinefrina é liberada por estímulo simpático e estimula a transcrição e acúmulo de RNAm, aumentando os níveis de UCP no TAM (HIMMS-HAGEN, 1990). A norepinefrina estimula, também, o aumento de triiodotironina no TAM, gerando sinais que induzem a máxima expressão do gene da UCP observando-se neste caso a máxima atividade termogênica do TAM (BIANCO *et al.*, 1988; TRAYHURN *et al.*, 1993).

## **1. 2. A UCP pertence a uma família de carreadores mitocondriais**

As similaridades entre a UCP e o translocador de ADP/ATP, também presente na membrana interna da mitocôndria, foram primeiramente sugeridas por apresentarem características comuns na ligação com nucleotídeos, além das massas moleculares muito próximas, 32 e 30 KDa, respectivamente (KLINGENBERG, 1989; 1990). Isto motivou LIN & KLINGENBERG (1982) a separarem a UCP de outras proteínas mitocondriais com método similar ao normalmente utilizado para isolar o carreador ADP/ATP, ou seja, usando-se detergente não iônico e cromatografia em hidroxiapatita. O processo de isolamento destas proteínas diferem quanto à temperatura (4°C para o carreador de ADP/ATP e temperatura ambiente para a UCP). A UCP apresenta ainda várias características estruturais e funcionais semelhantes às de outro translocador da membrana interna mitocondrial: o carreador de fosfato com massa molecular de 35 KDa (AQUILA *et al.*, 1987).

A similaridade estrutural entre a UCP e os carreadores mitocondriais ADP/ATP e fosfato foi confirmada com a determinação da estrutura primária da UCP (AQUILA *et al.*, 1985). As moléculas dos três carreadores mitocondriais contêm três domínios com cerca de 100 resíduos altamente conservados (NICHOLLS, 1976; AQUILA *et al.*, 1987), indicando a diversificação de um único gene que codifica estes domínios. Estas observações levaram o grupo de KLINGENBERG (AQUILA *et al.*, 1987) a propor que a UCP, o translocador de ADP/ATP e o carreador de fosfato fariam parte de uma família de proteínas homólogas, provavelmente derivadas de um gene ancestral comum. Sabe-se hoje que esta família inclui os carreadores de di- e tricarboxilatos (PALMIERI, 1994). Foi proposto que os carreadores de ADP/ATP e fosfato teriam surgido concomitantemente durante a evolução da célula eucariótica, enquanto que a UCP seria de desenvolvimento mais recente, uma vez que era observada apenas em mamíferos e em um único tecido, o adiposo marrom (KLINGENBERG, 1990).

### **1.3. A expressão da UCP além do TAM**

VERCESI e colaboradores (1995) observaram que a atividade respiratória de mitocôndrias de batata podia ser acoplada pela adição de ATP ou GTP, o que provocava também um concomitante aumento no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ) destas mitocôndrias. Estas respostas, características de mitocôndrias de TAM, sugeriram que as mitocôndrias de batata poderiam expressar uma proteína do tipo UCP. De fato, seguindo-se o mesmo procedimento, utilizado para isolar a UCP de TAM (LIN & KLINGENBERG, 1982), uma proteína de massa molecular em torno de 32 KDa foi isolada de mitocôndrias



de tubérculo de batata. Esta proteína isolada, quando incorporada em vesículas lipídicas, foi capaz de estimular o transporte de  $H^+$  pelas vesículas, transporte este que foi inibido por nucleotídeos de purina. Esta proteína foi denominada de proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) (VERCESI *et al.*, 1995) e pode ser fisiologicamente relevante na produção de calor em plantas.

A descoberta, em mitocôndrias de batata, de uma proteína com similaridades funcionais e estruturais à UCP de TAM, sugeriu que a idéia sobre a evolução desta proteína na natureza deveria ser reconsiderada. Realmente, duas novas proteínas, expressas em mamíferos, relacionadas à UCP de TAM foram recentemente clonadas. Estas novas proteínas foram denominadas de UCP2 (FLEURY *et al.*, 1997) e UCP3 (BOSS *et al.*, 1997; GONG *et al.*, 1997) enquanto que a UCP original passou a ser designada de UCP1. A UCP2 apresenta 59% de identidade de aminoácidos com a UCP1 (FLEURY *et al.*, 1997), enquanto que a UCP3 apresenta 71% de identidade com a UCP2 e 57% de identidade com a UCP1 (VIDAL-PUIG *et al.*, 1997).

Em contraste com a UCP1 que é expressa apenas no TAM, a UCP2 está amplamente expressa em tecidos humanos adultos como coração, pulmão, músculo esquelético, rim, etc. O gene para esta proteína foi mapeado em regiões do cromossoma 11 de humanos e do cromossoma 7 de camundongos, regiões estas que tem sido relacionadas com a hiperinsulinemia e a obesidade. Estes resultados sugeriram que a UCP2 teria um papel importante na regulação do peso corporal e no controle do balanço energético. Ainda, a participação desta proteína na resposta termoregulatória à infecção (febre) foi sugerida, uma vez que ela também é expressa nas células do sistema imune (FLEURY *et al.*, 1997).

A UCP3 em humanos foi encontrada preferencialmente expressa em músculo esquelético, sendo em roedores também expressa no TAM além do músculo esquelético. Como estes tecidos são considerados sítios importantes para o controle do balanço energético em humanos e roedores, respectivamente, foi sugerido que a UCP3 deva ser um importante mediador na termogênese adaptativa, principalmente em adultos humanos onde a massa de tecido adiposo marrom é limitada (VIDAL-PUIG *et al.*, 1997).

As recentes descobertas de proteínas desacopladoras em outros tecidos de mamíferos, além do TAM, definitivamente confirmaram as observações em batata (VERCESI *et al.*, 1995) de que estas proteínas estão mais amplamente distribuídas na natureza do que previamente se acreditava. Corroborando com esta proposição, LALOI e colaboradores (1997) identificaram o DNA de batata que codifica a proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas, que foi denominada por estes autores de StUCP. A previsão da sequência de aminoácidos indicou que a StUCP apresenta 44% e 47% de homologia com a UCP1 e a UCP2 humanas, respectivamente. O gene para a proteína desacopladora de plantas foi também recentemente encontrado em *Arabidopsis thaliana* (MAIA *et al.*, 1998). Tanto em batata quanto em *Arabidopsis*, foi observado que o gene para esta proteína é induzido quando a planta é exposta ao frio, o que sugere seu envolvimento com a termogênese. Ainda, intensa expressão da StUCP foi encontrada em flores e frutos indicando que a proteína desacopladora de plantas pode contribuir em fenômenos termogênicos, até então atribuídos à oxidase alternativa (LALOI *et al.*, 1997).

#### 1. 4. Efeito dos AGL no desacoplamento mitocondrial

Há muito tem sido observado o efeito desacoplador dos ácidos graxos livres (AGL) sobre a fosforilação oxidativa de mitocôndrias animais (PRESSMAN & LARDY, 1956). A ação desacopladora dos AGL tem sido explicada pela sua habilidade em aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial a  $H^+$  (WOJTCZAK & SCHONFELD, 1993). Entretanto, o mecanismo de desacoplamento induzido por AGL difere do mecanismo clássico apresentado pelos protonóforos onde a espécie não dissociada (protonada) atravessa livremente a bicamada lipídica, enquanto que a espécie dissociada (aniônica) não é capaz de penetrar na membrana. Para explicar o desacoplamento mitocondrial induzido por AGL, ANDREYEV e colaboradores (1988) propuseram que componentes proteicos da membrana interna mitocondrial estariam envolvidos no desacoplamento promovido pelos AGL, à semelhança de sua conhecida ação no estímulo da atividade da UCP do TAM (LOCKE *et al.*, 1982b; RIAL *et al.*, 1983). Em tecidos onde a UCP não é expressa observou-se que o aumento de permeabilidade da membrana interna mitocondrial a  $H^+$ , induzido por AGL, era inibido por CAT, um inibidor potente e específico do translocador de ADP/ATP (ANDREYEV *et al.*, 1988). Sendo assim, foi proposto que esta proteína também poderia participar do desacoplamento mitocondrial, além da sua função de transportar nucleotídeos de adenina (ANDREYEV *et al.*, 1989). SCHÖNFELD (1990) mostrou que a sensibilidade ao desacoplamento promovido pelos AGL depende do tipo de mitocôndria, de acordo com o seu conteúdo de translocase de nucleotídeos de adenina.

Dois mecanismos foram sugeridos para explicar o desacoplamento mitocondrial induzido por AGL, através da UCP ou do translocador de ADP/ATP. Os ácidos graxos estimulariam alostericamente a passagem de prótons pela UCP (WINKLER & KLINGENBERG, 1994) ou pelo translocador de ADP/ATP (BRUSTOVETSKY & KLINGENBERG, 1994) ou, ânions de AGL seriam transportados por estas proteínas enquanto que a forma protonada atravessaria livremente a membrana interna da mitocôndria (SKULACHEV, 1991; GARLID *et al.*, 1996), dissipando assim o potencial eletroquímico de  $H^+$ .

### 1. 5. A ATP sintetase mitocondrial

O complexo enzimático denominado  $F_0F_1$  - ATP sintetase ou ATP sintase é encontrado na membrana interna das mitocôndrias, na membrana tilacoide dos cloroplastos e na membrana plasmática das bactérias. Estruturalmente esta enzima apresenta dois componentes: um hidrofóbico ( $F_0$ ), constituído por um complexo proteico integral de membrana e envolvido no movimento transmembranar de prótons, bloqueável pela oligomicina (ALTHOFF *et al.*, 1989; KAIM & DIMROTH, 1993) e outro hidrofílico ( $F_1$ ) podendo ser destacado da membrana como um complexo solúvel onde se encontra o sítio para a síntese ou hidrólise de ATP. (SENIOR, 1988; FUTAI *et al.*, 1989; PENEFSKY & CROSS, 1991; HATEFI, 1993).

A ATP sintase é responsável pela síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico, utilizando o gradiente eletroquímico de prótons gerado pelo transporte de elétrons nas membranas transdutoras de energia (MITCHELL, 1961; 1969). A síntese de ATP no sítio catalítico da enzima é espontânea,

entretanto, o ATP sintetizado permanece firmemente ligado à enzima (PENEFSKY, 1985). A liberação do ATP deste sítio para o meio aquoso ocorre quando a passagem de  $H^+$  através de  $F_o$  provoca uma mudança conformacional em  $F_1$ , diminuindo a afinidade da enzima pelo ATP (BOYER & KOHLBRENNER, 1981).

A porção  $F_1$ , tanto de eucariotos como de procariotos, é similar quanto à composição de subunidades, com uma estequiometria de  $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$ , em ordem decrescente de massa molecular, enquanto que a  $F_o$  contém as subunidades a, b e c com uma estequiometria variável, que vai depender do organismo (WALKER *et al.*, 1991; PENEFSKY & CROSS, 1991). Outras subunidades menores estão presentes na enzima mitocondrial, como a proteína que confere sensibilidade à oligomicina (OSCP), que tem a função de ajustar  $F_1$  à  $F_o$  para que a passagem de  $H^+$  seja eficientemente aproveitada para impulsionar a síntese de ATP (GAUTHERON & GODINOT, 1988).

Vários grupos registraram que cada molécula de  $F_1$  contém seis sítios de ligação para nucleotídeos de adenina (HARRIS, 1977; YOSHIDA & ALLISON, 1986; ISSARTEL *et al.*, 1986). A localização destes sítios de ligação foi possível a partir de alguns estudos, tais como: ligação de nucleotídeos de adenina utilizando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas, alteração química da enzima e fotoincorporação usando análogos de nucleotídeos (FUTAI & KANAZAWA, 1983; GROMET-ELHANAN & KHANASHVILI, 1984; KHANASHVILLI & GROMET-ELHANAN, 1985; GARIN, *et al.*, 1986; BULLOUGH & ALLISON, 1986; CROSS *et al.*, 1987; XUE *et al.*, 1987; BULLOUGH *et al.*, 1988). Os sítios de ligação foram classificados em catalíticos ou não catalíticos, de acordo com a capacidade que têm de trocar nucleotídeos durante a hidrólise de Mg-ATP (CROSS & NALIN,

1982). Os resultados obtidos mostraram que os sítios catalíticos residem na subunidade  $\beta$  e trocam nucleotídeo ligado por nucleotídeo do meio durante a catálise (CROSS & NALIN, 1982), enquanto que os sítios não catalíticos estão presentes na interface das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e não trocam prontamente o nucleotídeo ligado durante a hidrólise (CROSS & NALIN, 1982) ou síntese (WISE & SENIOR, 1985) de Mg-ATP.

### 1. 6. A oxidase alternativa

Em plantas superiores existem duas vias de transporte mitocondrial de elétrons (DAY *et al.*, 1991; MOORE & SIEDOW, 1991). Uma delas é a cadeia respiratória, que acontece também em animais e leveduras, e consiste fundamentalmente de quatro complexos proteicos: o Complexo I responsável pela transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona; o Complexo II que efetua a transferência de elétrons do succinato para a ubiquinona; o Complexo III (também chamado de complexo citocromo b-c<sub>1</sub> ou citocromo redutase), responsável pela transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c e o Complexo IV (ou citocromo c oxidase), que efetua a transferência de elétrons do citocromo c para o O<sub>2</sub> e é inibido por cianeto. A segunda é a via adicional de transporte de elétrons, envolvendo o mesmo conjunto de desidrogenases da cadeia respiratória, entretanto, os elétrons desviam-se dos citocromos para uma oxidase terminal denominada alternativa por ser insensível ao cianeto e à antimicina A (BENDALL & BONNER, 1971). No entanto, essa oxidase é inibida por ácidos benzohidroxâmicos substituídos, tais como o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM) ou o n-propil galato (SIEDOW & BICKETT, 1981; HENRIKA-WAGNER *et*

*al.*, 1986; DOUCE & NEUBURGER, 1989). A oxidase alternativa é encontrada em muitas algas e em alguns fungos, mas ela é melhor caracterizada em plantas (ELTHON & McINTOSH, 1987; LAMBOWITZ *et al.*, 1988; DAY *et al.*, 1991; CLARKSON *et al.*, 1989).

Como os elétrons se ramificam a partir da ubiquinona para a oxidase alternativa, eles não passam por dois sítios de conservação de energia, aqueles ao nível dos complexos III e IV. Desta forma, a maior parte da energia liberada, durante a transferência de elétrons, é perdida como calor, ao invés de produzir um gradiente eletroquímico de prótons para posterior síntese de ATP (SIEDOW & BERTHOLD, 1986).

O papel da oxidase alternativa está bem definido em plantas que apresentam processo de floração termogênico (MEEUSE & BUGGELN, 1969; MEEUSE, 1975). Nas *Araceae*, por exemplo, a produção de calor por intermédio do fluxo de elétrons através da via alternativa, é usada para volatilizar substâncias odoríferas que atraem insetos, facilitando a polinização (MEEUSE, 1975). No dia do florescimento, a via alternativa torna-se operante, e o amido que havia sido acumulado até este estágio é queimado em poucas horas, como consequência de uma taxa extremamente elevada de glicólise e respiração (AP REES *et al.*, 1977; LATIES, 1982; LANCE *et al.*, 1985). No climax, em *Arum maculatum*, este fenômeno pode gerar temperaturas localizadas superiores em 15°C em relação à temperatura ambiente, ou ainda maiores em *Alocasia pubera* (MEEUSE, 1975; DOUCE *et al.*, 1985). Em plantas não termogênicas o papel desta oxidase ainda não é claro, embora todas as plantas já estudadas apresentem alguma atividade que varia dependendo do tecido (MOORE & SIEDOW, 1991; DAY *et al.*, 1991; KEARNS *et al.*, 1992).

PALMER (1976) e LAMBERS (1980) propuseram que a via alternativa só receberia elétrons que não pudessem ser acomodados na via dos citocromos. Assim, em condições de excedente energético, as plantas poderiam fazer uso deste curto circuito, como meio de continuar transformando esqueletos carbônicos, mesmo em presença de níveis elevados de ATP. Contudo, estudos posteriores feitos por DRY e colaboradores (1989) mostraram não haver relação entre o "pool" de quinona reduzida e o fluxo de elétrons através da via não fosforilativa.

### **1. 7. Identificação de sítios de ligação de nucleotídeos**

A identificação de sítios de ligação de nucleotídeos em proteínas pode ser feita através de marcação por fotoafinidade com azido-nucleotídeos (HALEY & HOFFMAN, 1974). KNOLESS (1972, citado por CZARNECKI *et al.*, 1979) estabeleceu os critérios para a marcação: os análogos devem se ligar especificamente à proteína, como um substrato natural; a fotomarcação deve ser feita em um comprimento de luz que não danifique a proteína; o produto fotomarcado não deve ser rapidamente convertido em um composto menos reativo, perdendo assim sua capacidade de marcar o sítio de ligação da proteína.

Análogos azídicos têm sido utilizados com sucesso para marcar sítios de ligação de nucleotídeos em proteínas mitocondriais (CZARNECKI, 1984; CROSS *et al.*, 1987; DALBON *et al.*, 1988; MARTINS & PENEFSKY, 1994). A incorporação covalente de azido-nucleotídeos radioativos em proteínas mitocondriais ligantes deste análogo pode ser identificada analisando-se as bandas radioativas de proteínas marcadas em condições específicas.



Através de marcação por fotoafinidade com 8-azido[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, HEATON e colaboradores (1978) mostraram que a UCP aparece em grande quantidade em mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom. Na auto-radiografia obtida através do gel de SDS-poliacrilamida destas mitocôndrias, uma proteína fotomarcada com M.M. aparente de 32 KDa, correspondente à UCP, pode ser diferenciada do translocador de ADP/ATP, com M.M. aparente de 30 KDa. A marcação da proteína desacopladora foi prevenida na presença do seu ligante específico, o GTP (RAFAEL & HELDT, 1976), enquanto que a incorporação do análogo no translocador não ocorreu na presença de actractilosídeo, um ligante desta proteína (VIGNAIS *et al.*, 1985).

O grupo de KLINGENBERG utilizou estes análogos para identificar os sítios de ligação de nucleotídeos na UCP purificada e obter informações detalhadas sobre a estrutura da proteína (MAYINGER & KLINGENBERG, 1992; WINKLER & KLINGENBERG, 1992). O 8-azido ATP é incorporado na UCP em um domínio distinto do translocador de ADP/ATP, uma vez que a interação entre nucleotídeo-proteína é totalmente diferente. Na UCP, o ATP é um inibidor do transporte de  $H^+/OH^-$ , enquanto que no carreador de ADP/ATP o nucleotídeo ativa o seu transporte por causar uma alteração conformacional associada com a sua translocação (KLINGENBERG, 1986; MAYINGER & KLINGENBERG, 1992). Assim, na UCP o nucleotídeo fecha a estrutura, enquanto no translocador ADP/ATP ele abre e mobiliza a estrutura (WINKLER & KLINGENBERG, 1992).

WANGENVOORD *et al.* (1977) sintetizaram 8-azido ATP, marcando seu anel de adenina e o utilizaram para marcar a porção  $F_1$  da ATPase de mitocôndrias de coração de boi. O 8-azido ATP foi hidrolisado pela  $F_1$ , no escuro, mostrando que ele se ligou especificamente no sítio de ligação do ATP.

Quando as mitocôndrias foram irradiadas em presença de 8-azido ATP a atividade da porção  $F_1$  da ATPase foi inibida irreversivelmente. Esta inibição foi fortemente diminuída em presença de ATP, durante a irradiação, sugerindo uma competição entre o 8-azido ATP e o ATP pelo sítio de ligação. Estes resultados mostraram que a caracterização dos sítios de ligação de nucleotídeos na  $F_1$  podia ser feita através de marcação por fotoafinidade com azido-nucleotídeos.

## 2. OBJETIVOS

Com o objetivo de caracterizar a PUMP presente em mitocôndrias de batata, o presente trabalho utilizou o análogo fotorreativo de ATP, o 8-azido-ATP, e comparou as propriedades desta proteína com as da UCP do TAM. A incorporação covalente de 8-azido-ATP em mitocôndrias de batata foi também utilizada para distinguir a PUMP do translocador de ADP/ATP, uma proteína da mesma família. Ainda, foi analisada a participação do translocador de ADP/ATP, além da PUMP, no desacoplamento de mitocôndrias de batata, induzido por AGL.

Com o objetivo de se encontrar um papel fisiológico para a PUMP de plantas, os estudos se estenderam a outra espécie, o abacate. O processo de amadurecimento de frutos climatéricos como o abacate, é caracterizado por um disparo na respiração e conseqüente aumento na temperatura do fruto. Embora esta característica tenha sido explicada pelo desenvolvimento de uma via de respiração alternativa, até hoje não estão esclarecidas as conexões metabólicas entre a atividade mitocondrial e a respiração climatérica. Este trabalho procurou verificar se a expressão de uma proteína desacopladora como a PUMP poderia participar deste processo. A participação do translocador de ADP/ATP e da porção  $F_o$  da ATP sintetase na respiração climatérica de frutos de abacate também foi analisada.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Mitocôndrias foram isoladas a partir de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*, L.) e frutos de abacate (*Persea americana*, M.), comprados em mercado. As batatas foram mantidas em sacos plásticos, sob refrigeração (4 a 10°C) até o momento do uso, enquanto que os frutos de abacate, pré- (verde) ou pós-climatéricos (maduro), foram utilizados logo após a compra.

#### 3.2. Meios utilizados para isolar mitocôndrias vegetais

Os meios utilizados para o isolamento das mitocôndrias foram: "Meio de Extração" composto de sacarose 400mM, tampão HEPES 10mM, EGTA 1mM, BSA 0,1%, cisteína 3mM e o pH ajustado para 7,6 com NaOH e "Meio de Lavagem" composto de sacarose 250mM, tampão HEPES 10mM, pH 7,2 e BSA 0,1%.

#### 3.3. Isolamento de mitocôndrias de batata

As mitocôndrias de tubérculos de batata foram isoladas segundo método descrito por MARTINS & VERCESI (1985), com algumas modificações.

Após serem descascadas, as batatas foram cortadas em pedaços alongados e passados através de um ralo de um extrator doméstico de sucos (centrífuga Walita). O rompimento dos tecidos foi feito sob a adição simultânea

de “Meio de Extração” gelado (4°C). Para cada 3g de tecido foi utilizado 1mL de meio. Os resíduos foram descartados e o extrato filtrado através de duas camadas de tecido (tipo algodão). Após o ajuste do pH do filtrado para 7,1, foi feita uma primeira centrifugação a 1.500xg, por 5 minutos, no sentido de eliminar o amido. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação a 9.000xg, por 15 minutos, e o sedimento contendo mitocôndrias, assim obtido, foi ressuspenso em “Meio de Lavagem”.

A suspensão mitocondrial foi purificada através de uma centrifugação a 1.100xg, por 5 minutos, para a sedimentação de resíduos. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 9.000xg, por 15 minutos. O sedimento obtido apresentou em média uma concentração de 70mg de proteína por mL. Todo o procedimento foi desenvolvido entre 0 e 4°C.

Em alguns isolamentos o BSA foi omitido dos meios de extração e lavagem. Estes casos são especificados na descrição dos resultados.

### **3.4. Isolamento de mitocôndrias de abacate**

A obtenção de mitocôndrias de abacate foi feita de modo semelhante ao descrito para batata, com algumas modificações.

O fruto foi cortado em cubos e suspenso na proporção de 4mL de “Meio de Extração” para 1g de tecido. O rompimento dos tecidos foi feito em liquidificador, velocidade média, com pulsos de 10 segundos. A suspensão obtida foi filtrada através de quatro camadas de gaze, contendo entre elas uma camada de algodão, para a retenção das fibras e gordura. Após o ajuste do pH do filtrado para 7,1, foi feita uma primeira centrifugação a 1.500xg, por 5 minutos, para

descartar o material sólido, que continha células não quebradas e núcleos, e para eliminar a gordura que permanece na parte superior do sobrenadante e cuja proporção aumenta à medida que o abacate amadurece. O sobrenadante resultante foi centrifugado, novamente, a 16.500xg, por 15 minutos e o sedimento, contendo as mitocôndrias, ressuspenso em "Meio de Lavagem".

A suspensão mitocondrial foi submetida a uma centrifugação de 1.100xg, por 5 minutos, para a sedimentação de possíveis resíduos. Procedeu-se a nova centrifugação do sobrenadante a 12.500xg, por 15 minutos, para a obtenção da fração mitocondrial. Todo procedimento foi conduzido entre 0 e 4°C.

### **3.5. Purificação de mitocôndrias de abacate em gradiente de densidade de percoll**

A purificação da fração mitocondrial de frutos de abacate em gradiente de Percoll foi feita com base no método descrito por MOREAU & ROMANI (1982).

Um volume de suspensão mitocondrial de 1mL foi cuidadosamente colocado sobre um meio contendo sacarose 250mM, tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,5 e Percoll 22,5% (v/v). Após centrifugação a 35.000xg, por 30 minutos, em um rotor de ângulo móvel (BECKMAN, SW41) a banda mitocondrial foi coletada com uma pipeta Pasteur e diluída 10x em "Meio de Lavagem" (o mesmo utilizado para isolar mitocôndrias) e imediatamente centrifugada a 12.500xg, por 15 minutos, para a remoção do Percoll e obtenção de mitocôndrias purificadas. O sedimento obtido, contendo as mitocôndrias, foi ressuspenso (a uma concentração proteica de cerca de 30mg/mL) e utilizado imediatamente para realização dos experimentos, com excessão das suspensões utilizadas para o preparo de membranas mitocondriais que foram armazenadas à -70°C.

### **3.6. Preparo de membrana mitocondrial de abacate**

A suspensão mitocondrial de abacate armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Biofreezer, Forma Scientific, Inc., modelo 8438) por 30 a 60 dias, foi descongelada e ressuspensa em um meio contendo sacarose 250mM e tampão HEPES 10mM, pH 7,2. A fim de separar a membrana dos componentes de matriz, a suspensão mitocondrial foi congelada em  $\text{N}_2$  líquido e descongelada, por três vezes, de acordo com McCORMAK & DENTON (1979). A suspensão resultante foi centrifugada a 14.000xg, por 20 minutos e o sedimento ressuspensa no meio descrito acima. Todo o procedimento foi feito entre 0 e  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.7. Isolamento de mitocôndrias de fígado**

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo CANNON & LINDBERG (1979), utilizando-se ratos adultos Wistar pesando 180 a 250g, mantidos em jejum por 12 horas.

Após a morte do animal por destroncamento cervical, o fígado foi lavado em solução contendo sacarose 250mM, tampão HEPES 2mM, pH 7,2 e EGTA 0,5mM. Em seguida foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. Este material foi então centrifugado a 2.500xg, por 5 minutos, o sobrenadante mantido em banho de gelo e o sedimento novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados durante 10 minutos a 11.500xg, sendo a fase lipídica superior e o sobrenadante descartados com uma pipeta Pasteur. O sedimento foi ressuspensa em sacarose 250mM, tampão

HEPES 1mM, pH 7,2, EGTA 0,3mM e novamente centrifugado nas condições anteriores. A seguir, as mitocôndrias foram ressuspensas em sacarose 250mM, tampão HEPES 1mM, pH 7,2, a uma concentração de cerca de 100mg de proteína por mL. Todo este procedimento foi feito mantendo-se a temperatura entre 0 e 4°C.

### **3.8. Isolamento de mitocôndrias de tecido adiposo marrom**

Mitocôndrias de tecido adiposo marrom foram isoladas como descrito por CANNON & LINDBERG (1979). Para tanto, utilizaram-se dez ratos adultos Wistar pesando cada um 180 a 250g. Os animais foram colocados em câmara fria (8 a 10°C) com água e ração. Decorridos 8 a 10 dias os ratos foram mortos por destroncamento cervical e o tecido adiposo marrom, que posiciona-se na região cervical posterior, foi removido.

O tecido adiposo marrom foi picado com tesoura e suspenso em "Meio de Extração" contendo sacarose 250mM, tampão HEPES 10mM, pH 7,2 e EGTA 0,5mM. O rompimento dos tecidos foi feito usando-se um homogeneizador Potter-Elvehjem. A suspensão obtida foi centrifugada a 2.500xg, por 8 minutos, seguindo-se, a partir de então, o mesmo procedimento utilizado para o isolamento de mitocôndrias de fígado. A suspensão mitocondrial obtida apresentou em média uma concentração de cerca de 50mg de proteína por mL.



### **3.9. Dosagem de proteína**

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais de tubérculo de batata, fígado e tecido adiposo marrom de rato foi determinada pelo método de Biureto modificado (KAPLAN & PEDERSON, 1983) e como solução padrão foi utilizada BSA 1%. Para mitocôndrias purificadas de frutos de abacate, cuja suspensão era sempre mais diluída, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977) utilizando-se como padrão BSA 0,1%.

### **3.10. Meios de reação**

A avaliação das diversas características funcionais das mitocôndrias isoladas de plantas foi feita, em geral, no seguinte "Meio Básico de Reação": sacarose 250mM, tampão HEPES 10mM, pH 7,2 e BSA 0,1%. Nos experimentos em que se pretendia avaliar o efeito de BSA sobre as taxas respiratórias, o BSA foi retirado do "Meio Básico de Reação".

### **3.11. Atividade respiratória**

A atividade respiratória mitocondrial, em batata e abacate, foi medida através do consumo de oxigênio, determinado polarograficamente com eletrodo específico, tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), ligado a um oxígrafo Gilson. Neste caso, utilizou-se o "Meio Básico de Reação", descrito no item 3.10,

acrescido de succinato 10mM, rotenona 5 $\mu$ M e MgCl<sub>2</sub> 2mM. Outras adições, feitas durante os experimentos, estão especificadas nas legendas de cada figura.

O registro do consumo de oxigênio permitiu a determinação do controle respiratório e dos efeitos de BSA, palmitato, CAT e cianeto na respiração mitocondrial.

### **3.12. Identificação de proteínas mitocondriais por fotoafinidade**

Uma das maneiras de se marcar a presença de proteínas mitocondriais ligantes de nucleotídeos é através da utilização de análogos azídicos, como o 8-azido ATP. Este composto é um análogo fotorreativo do ATP que, em presença de luz ultravioleta, se liga covalentemente à proteína.

#### **3.12.1. Ligação não covalente de 8-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP a proteínas mitocondriais**

Medidas de ligação não covalente foram feitas adicionando-se 1mg de proteína mitocondrial de batata ou de fígado a 50 $\mu$ L de "Meio de Reação 1" contendo: sacarose 250mM, tampão 20mM (MES para os pH 6,0 e 6,4 e HEPES para os pH 6,8 e 7,2) e EDTA 1mM. Quando não se tratava do controle, acrescentou-se GTP 1mM e/ou CAT 10 $\mu$ M. Após 10 minutos de pré-incubação, no escuro e à temperatura ambiente, foi acrescentado à suspensão 50 $\mu$ L de "Meio de Reação 2" contendo: sacarose 250mM, EDTA 1mM e 8-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP com atividade específica de 5 x 10<sup>4</sup>dpm/nmol. A concentração de 8-azido ATP, o pH e outras adições estão especificadas nas legendas das figuras. Decorridos 10 minutos de incubação a suspensão foi centrifugada em uma centrífuga

Eppendorf, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1mL de “Meio de Lavagem” contendo sacarose 250mM, tampão HEPES 10mM, pH7,2 e EDTA 1mM. Uma nova centrifugação por 10 minutos foi feita, sendo o sedimento ressuspense em 250 $\mu$ L de “Meio de Lavagem”. Cada amostra foi colocada em frascos de cintilação e foram adicionados 5mL de água. A avaliação da radioatividade foi feita em contador de cintilação BECKMAN (modelo LS 6000) acoplado a um registrador da mesma marca. Os valores de ligação não covalente de 8-azido ATP por mg de proteína mitocondrial, apresentados nos resultados, representam as médias obtidas de pelo menos três preparações mitocondriais diferentes, com duas repetições em cada.

### **3.12.2. Marcação por fotoafinidade utilizando-se 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP**

Mitocôndrias de batata, abacate, fígado ou tecido adiposo marrom e membranas mitocondriais de abacate foram pré-incubadas (0,5mg/200 $\mu$ L) em 100 $\mu$ L de “Meio de Reação 1”, contendo sacarose 250mM, tampão 20mM (MES para pH 6,0 e HEPES para pH 7,2) e EDTA 1mM. Quando não se tratava do controle, acrescentou-se GTP 2mM ou CAT 20–40 $\mu$ M. Após 10 minutos de incubação no escuro adicionou-se 100 $\mu$ L do “Meio de Reação 2” contendo: sacarose 250mM, EDTA 1mM e 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP com uma atividade específica de  $5 \times 10^4$ dpm/nmol. As concentrações de 8-azido ATP e o pH variaram conforme o experimento e estão especificados nas legendas das figuras. Decorridos 10 minutos de incubação no escuro, com meio radioativo, duas alíquotas de cada amostra (100 $\mu$ L cada) foram colocadas sobre bandejinhas plásticas, a 4°C, e irradiadas por 2 minutos com luz ultravioleta (MINERALIGHT MULTIBAND,

modelo UV SL-25), comprimento de onda curto. Após a irradiação, a suspensão mitocondrial foi centrifugada por 10 minutos, em uma centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 $\mu$ L de ATP 4mM a fim de deslocar as moléculas de 8-azido ATP ligadas não covalentemente às proteínas. Após a lavagem, as amostras foram concentradas em centrífuga Eppendorf, por 10 minutos.

### **3.12.3. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida das amostras fotomarcadas**

Os experimentos de eletroforese foram realizados de acordo com LAEMMLI (1970). Foram montadas placas de gel de SDS-poliacrilamida, num sistema descontínuo, onde a concentração de poliacrilamida era de 10% no gel de resolução e de 3,5% no de empacotamento.

As amostras de mitocôndrias fotomarcadas foram ressuspensas em 25 $\mu$ L de "Meio de Lavagem" descrito no ítem 3.6.1. e a suspensão resultante misturada a 25 $\mu$ L de solução de dissolução de membrana contendo SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, tampão Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,002%. A mistura foi fervida em banho-maria por 3 minutos. Amostras de 20 a 50 $\mu$ g de proteína foram aplicadas em cada poço e a corrida eletroforética feita por cerca de 4 horas, à temperatura ambiente, aplicando-se uma diferença de potencial de 20mA.

Para determinação da massa molecular foram utilizados os padrões da Sigma contendo, miosina (205 KDa);  $\beta$ -galactosidase (116 KDa); Fosforilase-b (97,4 KDa); BSA (66 KDa); albumina de ovo (45 KDa); desidrogenase láctica (36,5 KDa) e anidrase carbônica (29 KDa). Utilizou-se, também, um padrão da

Gibco contendo uma mistura de polímeros sintéticos com pesos moleculares na faixa de 10 a 120 KDa, com incrementos de 10 KDa.

Os géis foram corados, por 30 minutos, em ácido acético, metanol e água (1:4:5, v/v/v) contendo azul de coomassie 0,25% (p/v) e descorados em ácido acético, metanol, água (1:4:5, v/v/v). Após a coloração o gel foi colocado entre uma folha de papel celofane e outra de papel de filtro e levado para o secador de gel da Bio-Rad (modelo 543), por 30 minutos, a 90°C.

Os resultados apresentados, com as respectivas auto-radiografias, são representativos de pelo menos quatro diferentes preparações.

#### **3.12.4. Auto-radiografia**

A auto-radiografia é um processo de revelação onde substâncias radioativas são visualizadas em placas fotográficas. Para tanto, o filme de raio-X foi exposto ao gel seco de SDS-poliacrilamida, colocado no intensificador e guardado no Biofreezer a -70°C. Após 24 a 72 horas o filme foi revelado, usando para isto o kit Polymax RT da KODAK.

#### **3.13. Determinação do potencial elétrico de membrana**

A medida do potencial elétrico de membrana de mitocôndrias de batata e abacate foi feita utilizando-se o corante catiônico, safranina, que apresenta um deslocamento no espectro visível quando se liga às membranas de mitocôndrias energizadas (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976). Este deslocamento está linearmente relacionado com o potencial produzido por gradientes de prótons ou

de íons potássio. Suspensões mitocondriais (0,3-1mg/mL) recém isoladas foram incubadas à temperatura ambiente, em um “Meio de Reação” contendo sacarose 250mM, tampão HEPES 10mM, pH 7,2, acrescido de rotenona 5 $\mu$ M, fosfato de sódio 0,5mM, safranina 10 $\mu$ M e succinato 2mM. Outras adições peculiares a cada experimento, encontram-se especificadas nas legendas das figuras. As diferenças de absorbância  $A_{511} - A_{533}$  nm foram determinadas em espectrofotômetro de duplo feixe (DW-2000, SLM Instruments, Inc.) acoplado a um registrador potenciométrico (Hewlett Packard). A partir da comparação dos valores obtidos com os de uma curva de calibração  $\Delta A = f(\Delta\Psi)$  obteve-se o valor do potencial em cada caso. Na obtenção da curva de calibração, a partir de adições sucessivas de quantidades conhecidas de KCl, o potencial foi calculado através da relação:  $\Delta\Psi = 60 \log [K^{+int}] / [K^{+ext}]$ , onde  $[K^{+int}]$  é a concentração do íon no interior da mitocôndria, assumida como sendo 120mM (ROSSI & AZZONE, 1969) e  $[K^{+ext}]$  é a concentração do íon no meio de incubação.

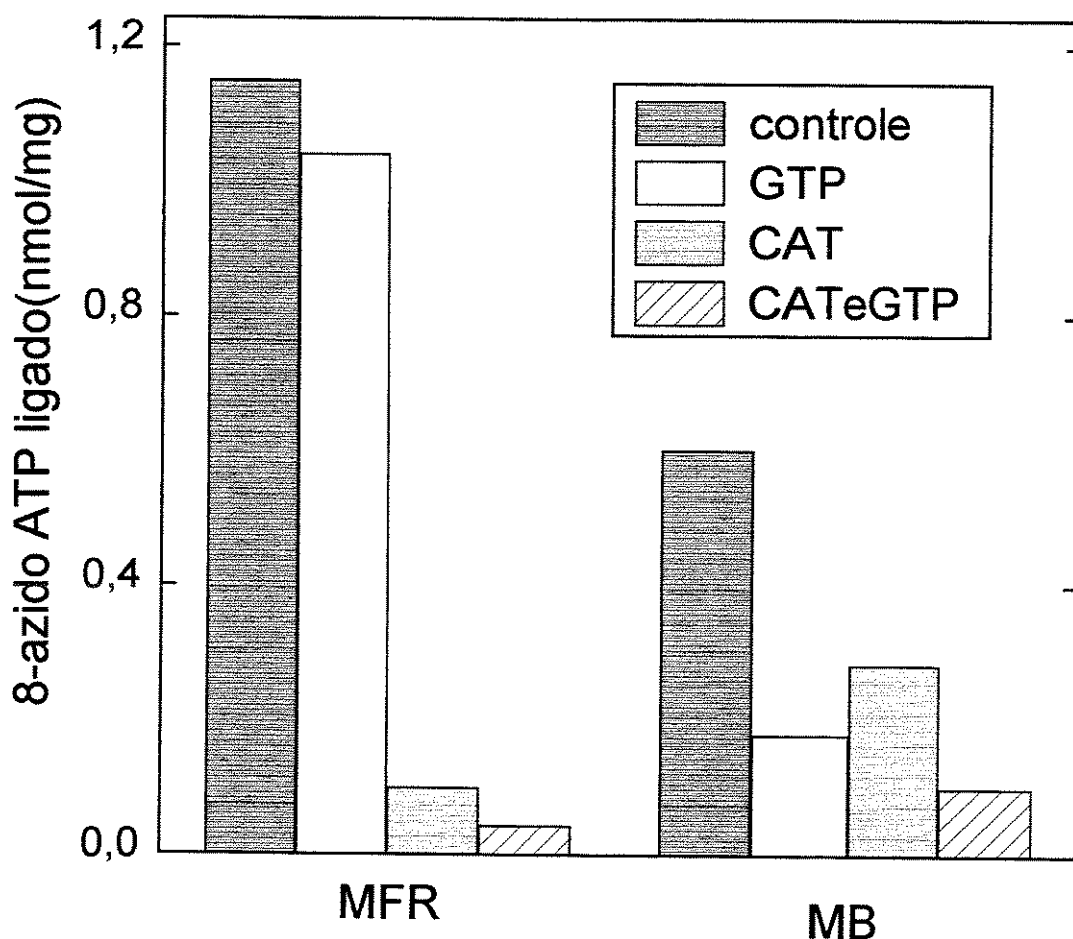
Os resultados apresentados são representativos de pelo menos quatro preparações mitocondriais diferentes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ligação não covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de tubérculo de batata e de fígado de rato

A identificação de proteínas (ou outras moléculas) através de marcação por fotoafinidade requer que o análogo azídico se ligue com uma boa afinidade e seletividade no mesmo sítio que os ligantes naturais. Assim, a ligação não covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata foi primeiramente testada. Como os compostos azídicos são ativados pela luz, esses estudos de ligação foram feitos no escuro. As propriedades de ligação não covalente do 8-azido ATP em mitocôndrias de tubérculos de batata foram comparadas com as de mitocôndrias de fígado de rato.

A Figura 1 mostra que mitocôndrias de fígado de rato intactas acumularam 1,15nmol de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP/mg de proteína. O valor obtido, neste caso, pode ser resultado da ligação no translocador de ADP/ATP, da troca com nucleotídeos de adenina endógenos através do translocador e devido à ligação em sítios inespecíficos da membrana mitocondrial (WEIDEMANN *et al.*, 1970). Para confirmar esta possibilidade as mitocôndrias de fígado de rato foram pré-incubadas com CAT, que compete com nucleotídeos de adenina para se ligar ao translocador de ADP/ATP (VIGNAIS *et al.*, 1973). A interferência de GTP, que é um conhecido ligante para a UCP (WEIDEMANN *et al.*, 1970; NICHOLLS, 1976; RAFAEL & HELDT, 1976), na ligação de 8-azido-ATP, também foi analisada. O total de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP acumulado na presença de GTP, CAT ou ambos decresceu para 1,04; 0,1 e 0,05nmol/mg de proteína, respectivamente (Figura 1).



**FIGURA 1.** Especificidade da ligação não covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de tubérculo de batata (MB) e mitocôndrias de fígado de rato (MFR). As suspensões mitocondriais (0,5mg/100 $\mu$ L) foram pré-incubadas por 10 minutos em "Meio de Reação 1" (conforme descrito em Materiais e Métodos) acrescido de GTP (1mM); CAT (10 $\mu$ M); ambos ou sem nenhum acréscimo (controle) e então incubadas na presença de 100 $\mu$ M de 8 azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP a pH 6,8, por mais 10 minutos.

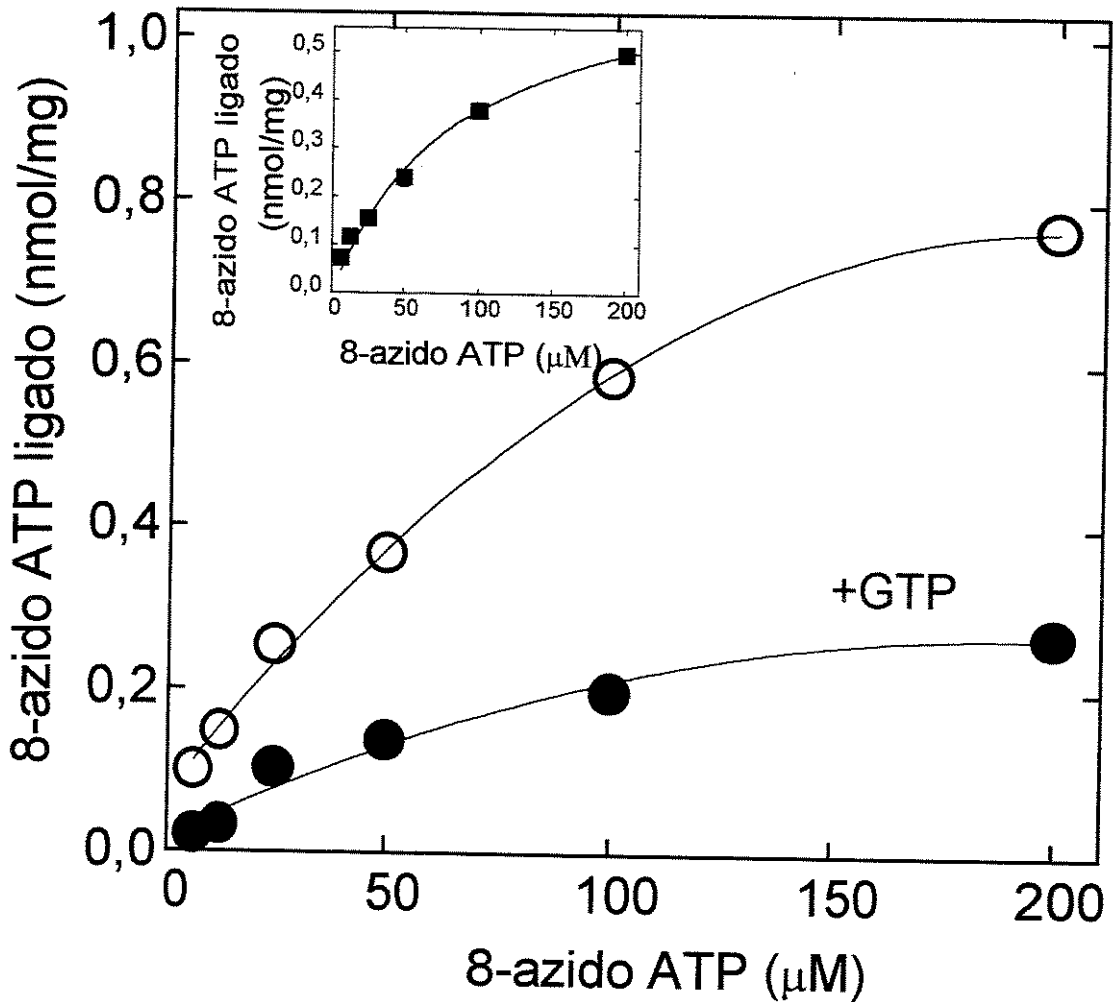


Estes resultados indicaram que 93% do total acumulado de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP em mitocôndrias de fígado de rato resultou da ligação e translocação do análogo de ATP através do translocador de ADP/ATP. O GTP deslocou 10% da acumulação total de 8-azido ATP indicando que, em mitocôndrias de fígado de rato não existe um sítio de ligação significativa para este nucleotídeo. Ligações inespecíficas de 8-azido ATP (obtidas na presença de CAT e GTP) representaram somente 3,8% do total do análogo acumulado em mitocôndrias de fígado de rato.

Diferentemente do observado em mitocôndrias de fígado, o total de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP acumulado por mitocôndrias de batata (0,6nmol/mg proteína) mostrou um decréscimo de 50% quando estas foram pré-incubadas com CAT (0,28nmol/mg). O total de 8-azido ATP acumulado na presença de GTP decresceu para 0,18nmol/mg ou para 0,10nmol/mg quando CAT também estava presente (Figura 1). Assim, o GTP inibiu cerca de 70% do acúmulo de 8-azido ATP e o CAT não alterou este nível de inibição. Estes resultados indicaram que mitocôndrias de tubérculo de batata possuem outro sítio de ligação para nucleotídeos de adenina, o qual é distinto do translocador de ADP/ATP. Este sítio de ligação não é detectado em mitocôndrias de fígado de rato e aparentemente assemelha-se ao existente em TAM (NICHOLLS, 1976; RAFAEL & HELDT, 1976).

#### **4.2 Ligação de 8-azido ATP, sensível ao GTP, em mitocôndrias de tubérculo de batata**

A cinética de ligação do 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP em mitocôndrias de batata é mostrada na Figura 2. A ligação do 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP, sensível ao GTP, não



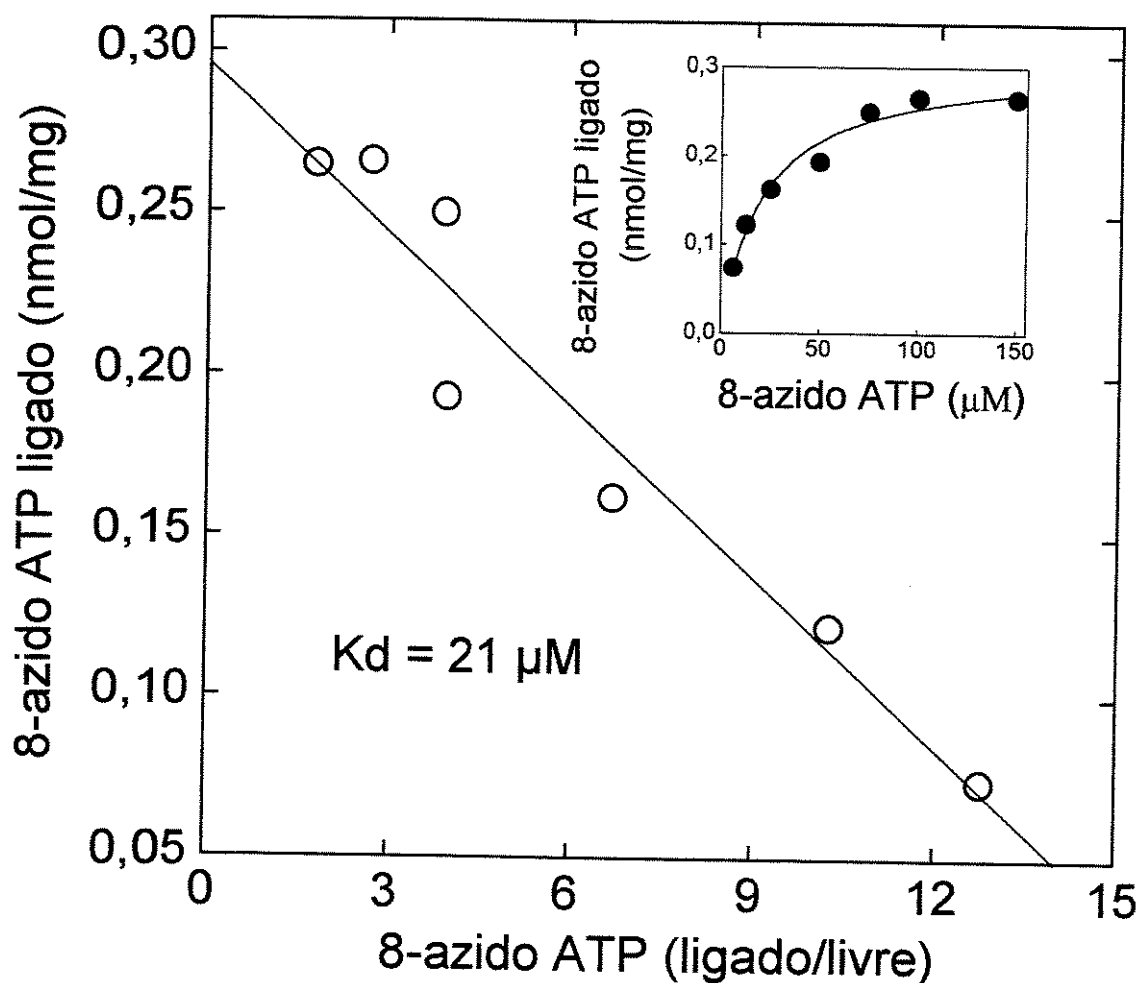
**FIGURA 2.** Cinética da ligação não covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de tubérculos de batata sobre o efeito do GTP. As suspensões mitocondriais (0,5mg/100 $\mu\text{L}$ ) foram pré-incubadas na presença de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP em diferentes concentrações (6,25-200 $\mu\text{M}$ ) em pH 6,0. (○) controle; (●) GTP (2mM). O gráfico inserido mostra a diferença entre a ligação não covalente total e a obtida em presença de GTP.

atingiu a saturação na faixa de concentração de 6,25 a 200 $\mu$ M (inserção da Figura 2), provavelmente devido a um aumento de atividade do translocador de ADP/ATP em altas concentrações do análogo. Para facilitar a avaliação dos parâmetros cinéticos de ligação do 8-azido ATP, sensível ao GTP, os experimentos foram repetidos na presença de CAT, com a finalidade de inibir qualquer translocação do análogo com nucleotídeos de adenina endógenos. Nestas condições, a curva de saturação da ligação de 8-azido ATP foi obtida, com um máximo de ligação de 0,29nmol/mg (inserção da Figura 3), e o gráfico linear Scatchard indicou a presença de um único sítio de ligação para 8-azido ATP, sensível ao GTP, com uma  $K_d$  de 21 $\mu$ M (Figura 3).

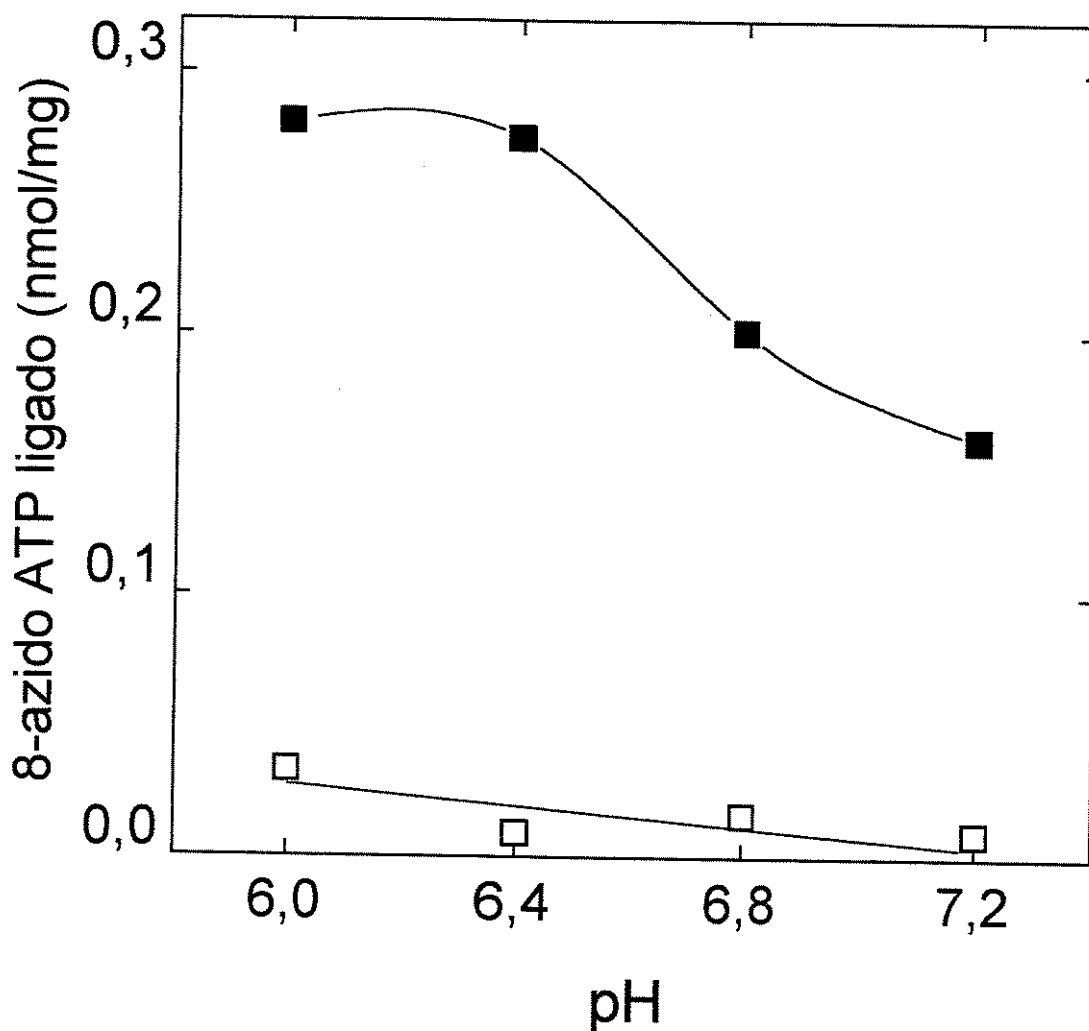
#### **4.3. Efeito do pH na ligação de 8-azido ATP em mitocôndrias de fígado e de batata**

Já está bem estabelecido que a ligação de nucleotídeos de purina na UCP, presente em mitocôndrias de TAM, é favorecida em valores de pH mais baixos. NICHOLLS (1976) evidenciou que em meio ácido o controle da condutância de prótons por nucleosídeos de purina di- e trifosfatados era favorecido devido à maior afinidade da UCP por GTP. Estudos posteriores com UCP incorporada em bicamada lipídica confirmaram que a inibição do transporte de  $H^+$  por nucleotídeos de purina era dependente do pH (KLINGENBERG & WINKLER, 1985).

O efeito do pH na ligação de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP em mitocôndrias de fígado e batata é apresentado na Figura 4. A ligação de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP em mitocôndrias de fígado manteve-se em níveis sempre muito inferiores aos



**FIGURA 3.** Avaliação da ligação não covalente de 8-azido ATP, sensível ao GTP (Gráfico de Scatchard), em mitocôndrias de tubérculo de batata. As condições experimentais são as mesmas da Figura 2, exceto que as mitocôndrias foram pré-incubadas em presença de CAT ( $20\mu\text{M}$ ) para prevenir ligação e translocação de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP através do translocador de ADP/ATP. O gráfico inserido mostra a diferença entre a ligação não covalente total e a obtida em presença de GTP.



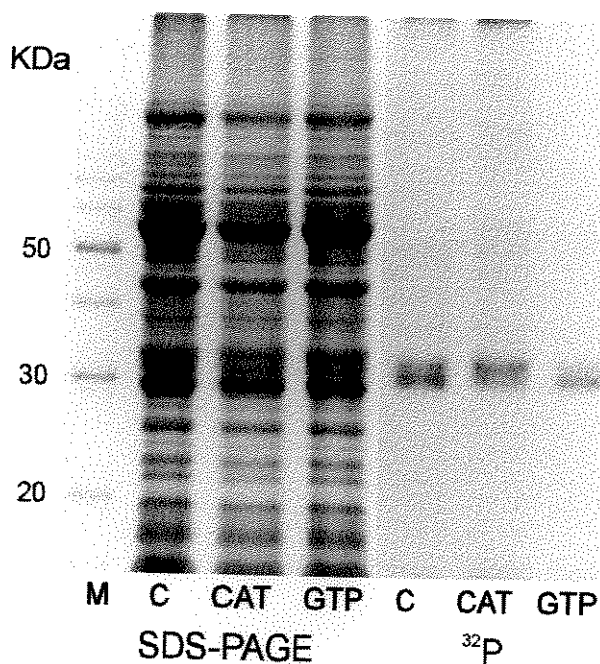
**FIGURA 4.** Ligação não covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (■) e fígado de rato (□) em função do pH. As suspensões mitocondriais (0,5mg/100 $\mu$ L) foram pré-incubadas em "Meio de Reação 1" acrescido de CAT (20 $\mu$ M) ou CAT e GTP (2mM) por 10 minutos e então incubadas na presença de 200 $\mu$ M de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP por 20 minutos. Os dados representam a diferença entre a ligação na presença de CAT e a ligação na presença de CAT e GTP.

observados com as organelas de batata. Além disso, a ligação em fígado mostrou-se independente do pH, ao contrário do observado em batata, onde a ligação foi maior em pH mais baixo. Deve ser ressaltado que, nestes experimentos, o meio de reação era acrescido de CAT (no sentido de evitar a ligação do análogo ao translocador de ADP/ATP) e portanto não se esperava ligação alguma do análogo em mitocôndrias de fígado de rato. Os níveis mais elevados e a dependência do pH na ligação do análogo em mitocôndrias de batata, indicam que os valores obtidos correspondem à ligação efetiva e não a ligações inespecíficas na membrana mitocondrial.

#### **4.4. Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de batata**

Os experimentos de marcação por fotoafinidade com 8-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP, em mitocôndrias de tubérculo de batata, resultaram na incorporação do análogo a uma proteína com uma M.M. aparente de 32 KDa, que foi inibida quando as mitocôndrias foram pré-incubadas com GTP. Também, uma segunda proteína com uma M.M. aparente de 30 KDa foi marcada neste experimento, e esta incorporação foi sensível ao CAT (Figura 5).

Quando mitocôndrias de fígado de rato, que normalmente não contém UCP (NICHOLLS & LOCKE, 1984) foram tratadas nas mesmas condições experimentais utilizadas para mitocôndrias de batata, nenhuma proteína de 32 KDa foi marcada. Apesar disto, ocorreu fotoincorporação desse análogo a uma proteína de 30 KDa nas mitocôndrias de fígado e esta incorporação foi



**FIGURA 5.** Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de tubérculo de batata. As suspensões mitocondriais (0,5mg/200 $\mu$ L) foram irradiadas em presença de 200 $\mu$ M 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, pH 6,0, como descrito em Materiais e Métodos. Foram adicionados, onde indicado: CAT (20 $\mu$ M) ou GTP (1mM). SDS-PAGE, gel de eletroforese com 20 $\mu$ g de proteína em cada coluna;  $^{32}\text{P}$ , autoradiografia correspondente; M, padrão de massa molecular.

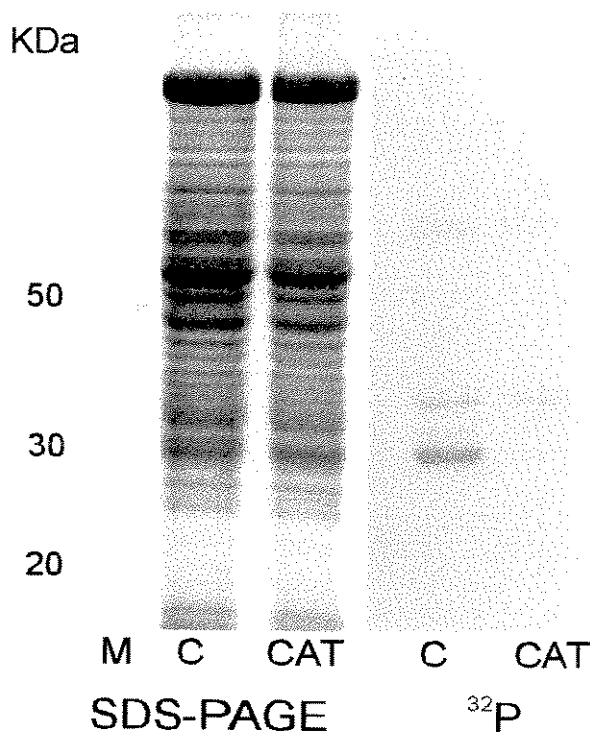
inibida por CAT (Figura 6). Como esperado, a presença de GTP (1mM) não influenciou a incorporação de 8-azido ATP em mitocôndrias de fígado de rato (dado não mostrado).

Mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom de ratos adaptados ao frio, apresentaram um padrão de incorporação de 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP semelhante ao obtido para mitocôndrias de batata. De acordo com os dados de literatura (HEATON *et al.*, 1978), duas proteínas foram fotomarcadas em mitocôndrias de tecido adiposo marrom, sendo a incorporação da proteína de 30 KDa prevenida pelo CAT e a incorporação da proteína de 32 KDa prevenida pelo GTP (Figura 7). Estes resultados confirmam os dados de ligação do 8-azido ATP em mitocôndrias de batata e mostram que o sítio de ligação para nucleotídeos de adenina, sensível ao GTP, em mitocôndrias de batata é distinto do sítio de ligação para nucleotídeos de adenina sensível ao CAT.

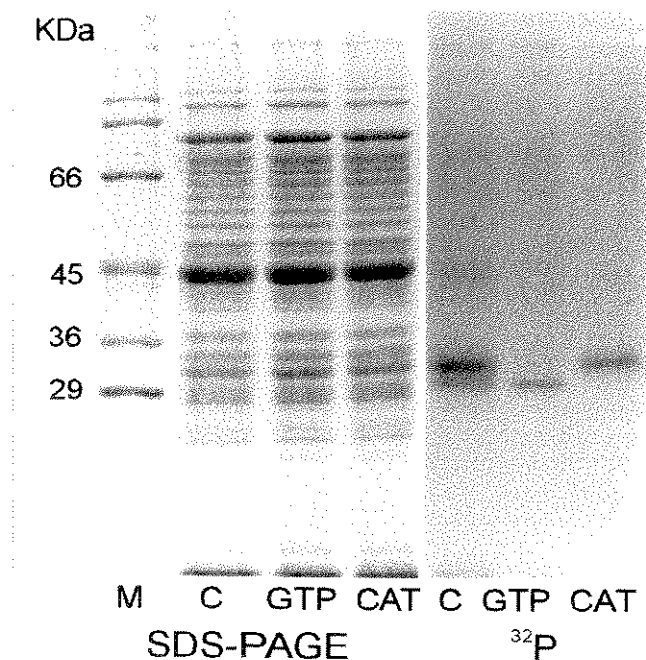
#### **4.5. Efeito de palmitato e CAT na atividade respiratória de mitocôndrias de tubérculo de batata**

Uma das primeiras observações que levaram sugerir a existência de uma proteína desacopladora em mitocôndrias de planta foi o importante efeito acoplador do BSA, um quelante de ácidos graxos livres, na velocidade de consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de batata (VERCESI *et al.*, 1995). Entretanto, a ação desacopladora dos AGL tem sido atribuída não só pela ação destes na UCP (LOCKE *et al.*, 1982a, b, Rial *et al.*, 1983) mas também no translocador de ADP/ATP (ANDREYEV *et al.*, 1989). Assim, com o objetivo de se determinar se o efeito acoplador do BSA em mitocôndrias de batata seria apenas





**FIGURA 6.** Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de fígado de rato. As suspensões mitocondriais (0,5mg/200 $\mu\text{L}$ ) foram irradiadas em presença de 200 $\mu\text{M}$  8-azido[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, pH 6,0, como descrito em Materiais e Métodos. CAT (10 $\mu\text{M}$ ) foi adicionado onde indicado. SDS-PAGE, gel de eletroforese com 50 $\mu\text{g}$  de proteína em cada coluna;  $^{32}\text{P}$ , auto-radiografia correspondente; M, padrão de massa molecular.



**FIGURA 7.** Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitocôndrias de tecido adiposo marrom. As suspensões mitocondriais (0,5mg/200 $\mu$ L) foram irradiadas em presença de 200 $\mu$ M 8-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP, pH 6,0, como descrito em Materiais e Métodos. Foram adicionados, onde indicado: GTP (1mM) ou CAT (10 $\mu$ M). SDS-PAGE, gel de eletroforese com 20 $\mu$ g de proteína em cada coluna; <sup>32</sup>P, autoradiografia correspondente; M, padrão de massa molecular.

devido à sua habilidade em prevenir a atuação de AGL na PUMP ou, se o translocador de ADP/ATP também estaria envolvido, foi analisado o efeito de ligantes destas proteínas em reverter a ação desacopladora de AGL em mitocôndrias de batata.

A Tabela 1 mostra que a velocidade inicial de consumo de  $O_2$  por mitocôndrias de tubérculos de batata, energizadas com succinato, decresceu de  $197 \pm 5,7$  para  $127 \pm 5,8$  ng átomos  $O$ /min.mg, quando BSA foi acrescentado ao meio de reação (Experimento 1). Palmitato foi capaz de aumentar a velocidade de respiração em meio de reação sem BSA (Experimento 2). Observou-se ainda, que a adição de CAT, um inibidor específico do translocador de ADP/ATP, inibiu o consumo de  $O_2$  (Experimentos 2 e 3), mas não previniu o efeito desacoplador do palmitato (Experimento 3). Estes resultados mostram que a velocidade máxima de consumo de  $O_2$  por mitocôndrias de batata energizadas com succinato foi de 197 ng átomos  $O$ /min.mg e que a adição de BSA (uma condição onde o transporte de  $H^+$  pela PUMP e/ou pelo translocador de ADP/ATP seria inibido), resultou numa velocidade de consumo de  $O_2$  de 127 ng átomos  $O$ /min.mg. O reacoplamento causado pelo CAT na respiração de mitocôndrias de batata sugere que o translocador compete pelo transporte de prótons nestas mitocôndrias. Entretanto, a velocidade do consumo de  $O_2$  atingido em presença de CAT (161 ng átomos  $O$ /min.mg) foi maior que a observada em presença de BSA (127 ng átomos  $O$ /min.mg) sugerindo outro sítio de desacoplamento nestas mitocôndrias, que deve ser através da PUMP, como anteriormente demonstrado (VERCESI *et al.*, 1995).

**TABELA 1.** Alterações no consumo de O<sub>2</sub> por mitocôndrias de tubérculos de batata, isoladas na ausência de BSA: efeito do palmitato, CAT e BSA. A 1,7mL do “Meio Básico de Reação” (como descrito em Materiais e Métodos) sem BSA, acrescido de succinato (2mM) e rotenona (5μM), foram adicionados, onde indicado: BSA (0,1%); CAT (20μM) ou PAL (20μM). Os valores representam a média ± o desvio padrão de três experimentos realizados com preparações mitocondriais diferentes.

Experimento	Adições	Respiração (ng átomos O/min.mg)
1	–	197±5,7
	+BSA	127±5,8
2	–	197±5,7
	+PAL	223±8,7
	+CAT	161±3,4
3	–	197±5,7
	+CAT	151±11,5
	+PAL	188±15,8

#### **4.6. Efeito de palmitato, CAT e oligomicina no potencial elétrico de mitocôndrias de batata**

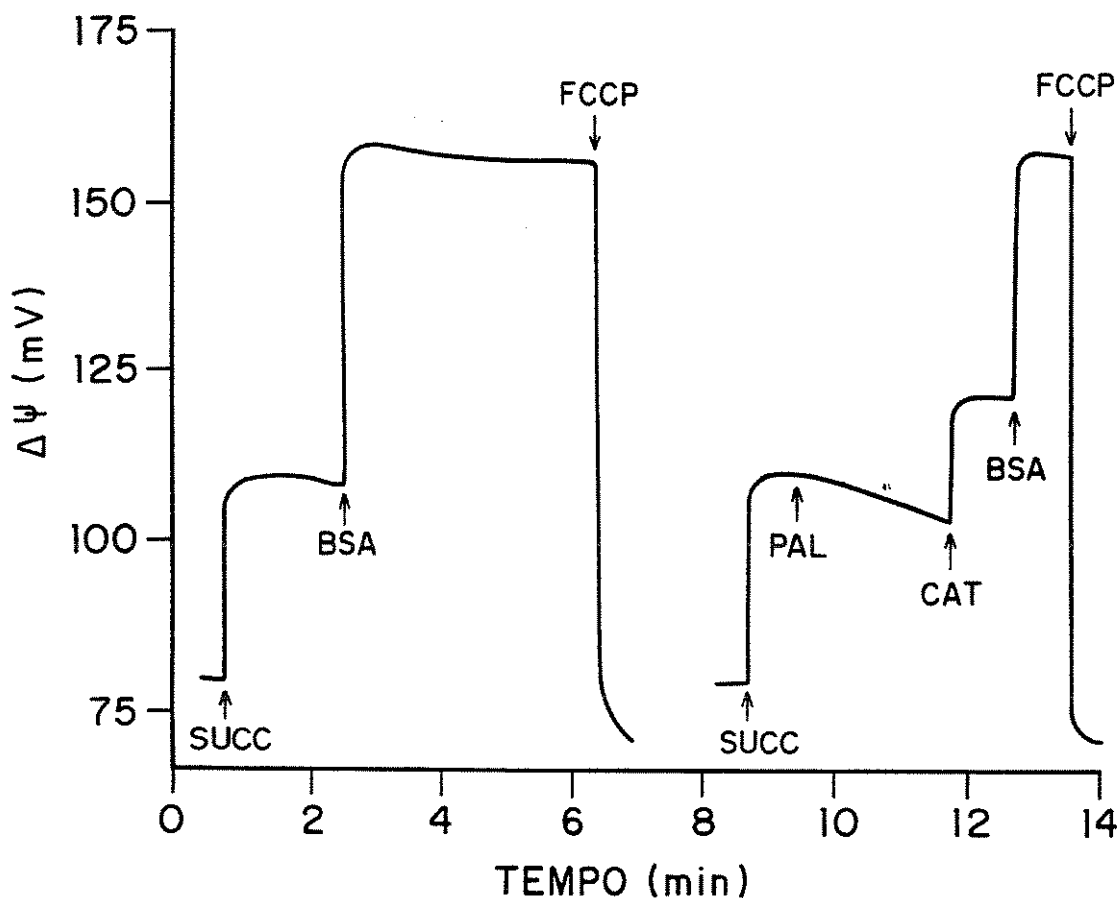
A Figura 8, mostra que mitocôndrias de batata incubadas na ausência de BSA estabeleceram um  $\Delta\Psi$  em torno de 110mV. Nesta condição, a adição de palmitato provocou uma queda no valor de  $\Delta\Psi$  que foi restabelecido parcialmente pelo CAT. Quando subsequentemente BSA foi adicionado, o  $\Delta\Psi$  foi totalmente restabelecido.

O desacoplamento ocasionado pelo palmitato também pôde ser revertido pelo GTP (Figura 9), um ligante da PUMP, como mostrado nos experimentos anteriores. A Figura 9 também mostra que, após a adição de GTP, CAT foi ainda capaz de aumentar o  $\Delta\Psi$ , sugerindo que, cada um destes compostos agem em sítios diferentes. Ainda, após o desacoplamento induzido por palmitato e parcialmente restabelecido por GTP, o boncrecato (BKA), outro inibidor do translocador de ADP/ATP, foi capaz de elevar o  $\Delta\Psi$  das mitocôndrias de batata energizadas com succinato (Figura 10).

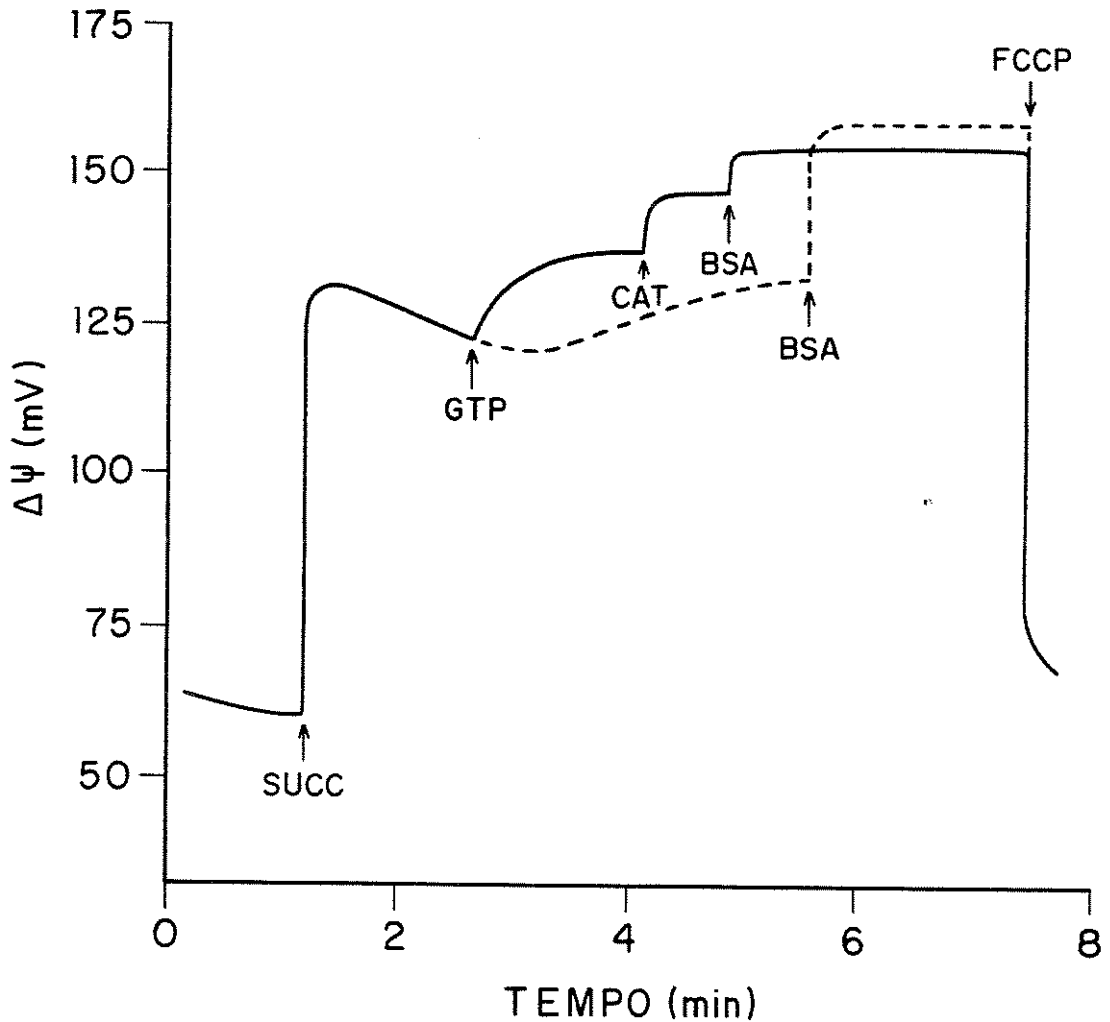
Estes resultados confirmaram as indicações de que, além da PUMP, o translocador de nucleotídeos de adenina também participa do desacoplamento de mitocôndrias de batata induzido por ácidos graxos livres.

#### **4.7. Caracterização de mitocôndrias de frutos de abacate pré- e pós-climatério**

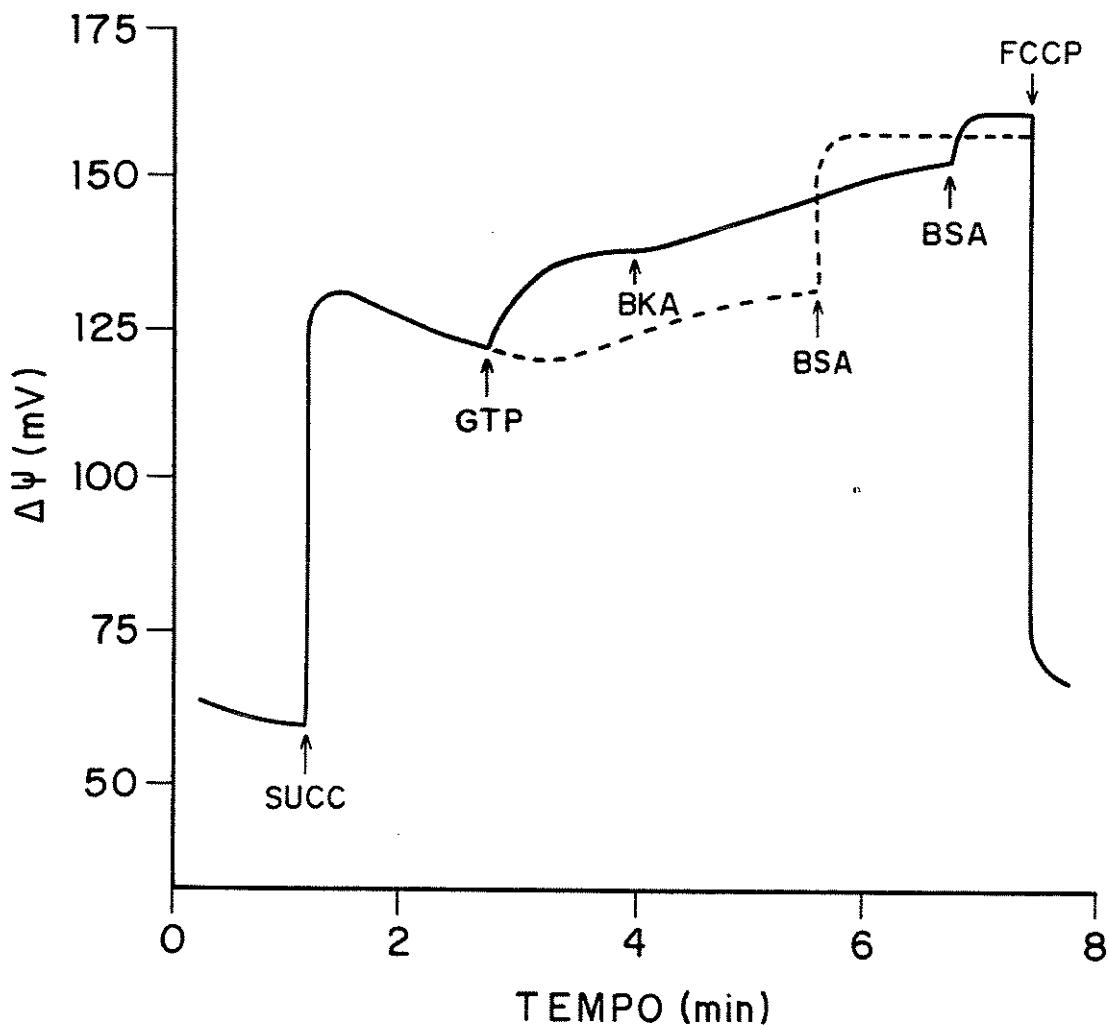
A obtenção de mitocôndrias acopladas em tecidos vegetais é uma tarefa que apresenta dificuldades devido à necessidade de métodos drásticos para



**FIGURA 8.** Efeito de BSA, palmitato (PAL) e CAT no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de tubérculos de batata. A 1mL do “Meio Básico de Reação” sem BSA (conforme descrito em Materiais e Métodos), acrescido de mitocôndrias de batata (1mg/mL), fosfato (0,5mM), rotenona (5 $\mu$ M) e safranina (10 $\mu$ M) foram adicionados, onde indicado: succinato (2mM), BSA (0,1%), PAL (10 $\mu$ M), CAT (1 $\mu$ M) e FCCP (2 $\mu$ M).



**FIGURA 9.** Efeito de GTP e CAT no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de tubérculos de batata. A 1mL do “Meio Básico de Reação” sem BSA, acrescido de palmitato ( $10\mu\text{M}$ ), fosfato ( $0,5\text{mM}$ ), rotenona ( $5\mu\text{M}$ ), safranina ( $10\mu\text{M}$ ) e mitocôndrias de batata ( $0,6\text{mg/mL}$ ) foram adicionados, onde indicado: succinato ( $2\text{mM}$ ), GTP ( $1\text{mM}$ ), CAT ( $1\mu\text{M}$ ), BSA ( $0,2\%$ ) e FCCP ( $2\mu\text{M}$ ). A linha tracejada representa o controle, onde GTP e CAT não foram adicionados.



**FIGURA 10.** Efeito de GTP e BKA no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de tubérculo de batata. As condições experimentais são as mesmas da Figura 9. Foram adicionados, onde indicado: succinato (2mM), GTP (1mM), BKA (20 $\mu$ M), BSA (0,2%) e FCCP(2 $\mu$ M). A linha tracejada representa o controle onde GTP e BKA não foram adicionados.



rompimento da parede celular, a existência de vacúolos ácidos, que liberam substâncias capazes de comprometer a integridade da organela, e devido também ao efeito de ácidos graxos de cadeia longa que, em altas concentrações funcionam como permeabilizadores de membrana (PRESSMAN & LARDY, 1956). Sendo assim, a obtenção de mitocôndrias vegetais que apresentem controle respiratório é uma tarefa mais difícil que em animais.

No caso do abacate o método usado para isolar mitocôndrias de tubérculo de batata teve que sofrer modificações na tentativa de obter mitocôndrias acopladas, conforme descrito em Materiais e Métodos. Mesmo assim, estas mitocôndrias eram muito desacopladas apresentando um controle respiratório muito baixo ou inexistente. O uso de gradiente de densidade de Percoll (MOREAU & ROMANI, 1982) permitiu o isolamento de mitocôndrias de frutos de abacate extremamente purificadas. Através deste método as mitocôndrias intactas se agrupam em uma faixa separando-se de mitocôndrias quebradas ou outras impurezas, por diferença de densidade. MOREAU & ROMANI (1982) notaram que durante o climatério ocorre uma mudança no tamanho e na densidade das mitocôndrias ocorrendo o aparecimento de uma faixa de mitocôndrias mais pesadas que ocupam uma região inferior no tubo e predominam na fase pós-climatério, enquanto que em frutos pré-climatério há um predomínio de mitocôndrias mais leves. Mitocôndrias com este perfil também foram observadas quando utilizamos este método em nossas preparações.

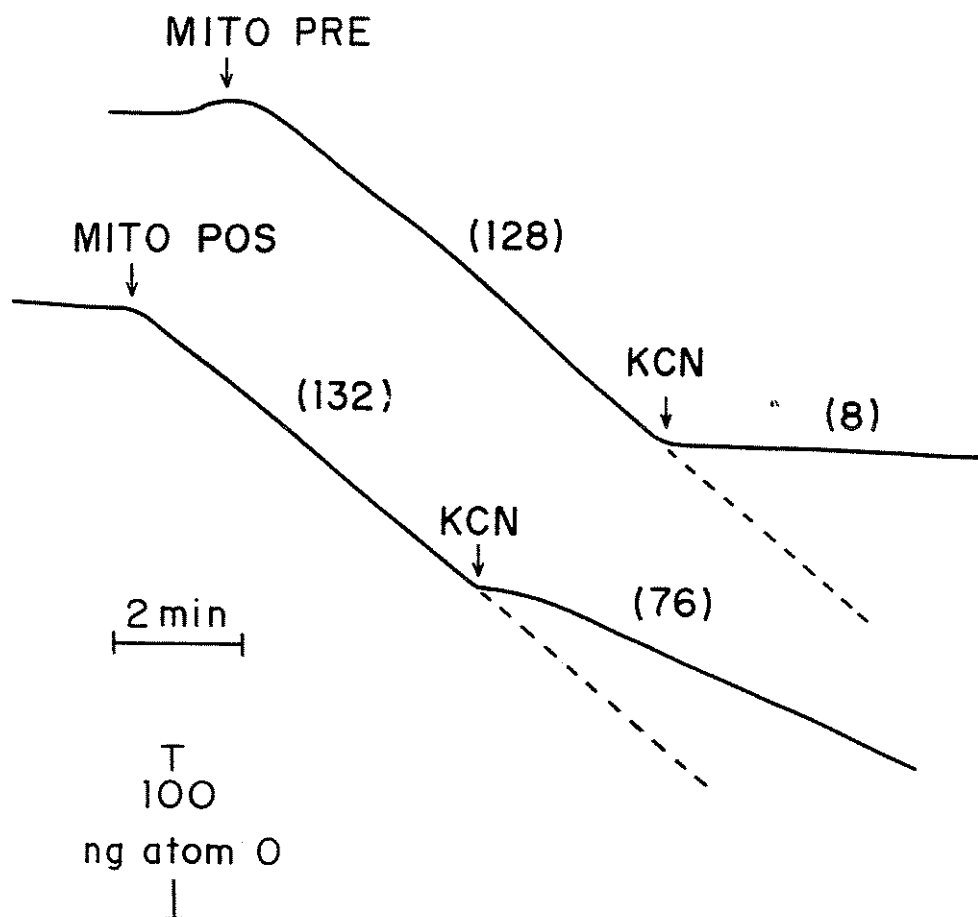
A purificação em gradiente de densidade de Percoll aumentou o controle respiratório para valores próximos a 1,5, tanto em mitocôndrias de frutos no período pré- quanto no período pós-climatério.

#### 4.8. Respiração resistente ao cianeto em mitocôndrias de abacate

Embora o dramático aumento na atividade respiratória que acompanha o amadurecimento de abacate e outros frutos climatéricos não esteja ainda elucidado, alguns autores tentam correlacionar esta alteração com o engajamento da oxidase alternativa (SOLOMOS,1977; SOLOMOS & LATIES, 1976). Assim, atividade da oxidase alternativa, que é resistente ao cianeto (DOUCE, 1985), foi determinada nas mitocôndrias de frutos de abacate purificadas em gradiente de Percoll.

A Figura 11 ilustra as diferenças nas taxas de respiração resistente ao cianeto de mitocôndrias de abacate, em função do estado de amadurecimento do fruto. A velocidade de consumo de  $O_2$  pela energização com succinato, em mitocôndrias isoladas de frutos pré-climatéricos, decresceu de 128 para 8 ng átomos  $O$ /min.mg em resposta à adição de KCN (1mM). Este resultado mostra que nesta preparação apenas 6,2% do fluxo de elétrons na cadeia respiratória ocorre através da oxidase alternativa. Diferentemente, o cianeto diminuiu o consumo de  $O_2$  de mitocôndrias de frutos pós-climatéricos de 132 ng átomos  $O$ /min.mg para 76 ng átomos  $O$ /min.mg, indicando que 57,6% do consumo de  $O_2$  por estas preparações pode ocorrer pela via alternativa.

A diferença de sensibilidade da respiração mitocondrial ao cianeto foi utilizada para identificar o estado respiratório-enzimático entre mitocôndrias pré- e pós-climatério, isoladas por gradiente de Percoll. Assim, os experimentos descritos a seguir foram realizados utilizando-se mitocôndrias de abacate pré-climatério que apresentaram 0-10% de insensibilidade ao cianeto e por



**FIGURA 11.** Respiração resistente ao cianeto em mitocôndrias de abacate pré (MITO PRE) e pós-climatério (MITO POS). A 1,7mL do "Meio Básico de Reação", acrescido de succinato (2mM) e rotenona (5 $\mu$ M), foram adicionados, onde indicado: 0,5mg/mL de mitocôndrias de abacate e KCN (1mM). Os números entre parênteses indicam o consumo de O<sub>2</sub> em ng átomos O/min.mg.

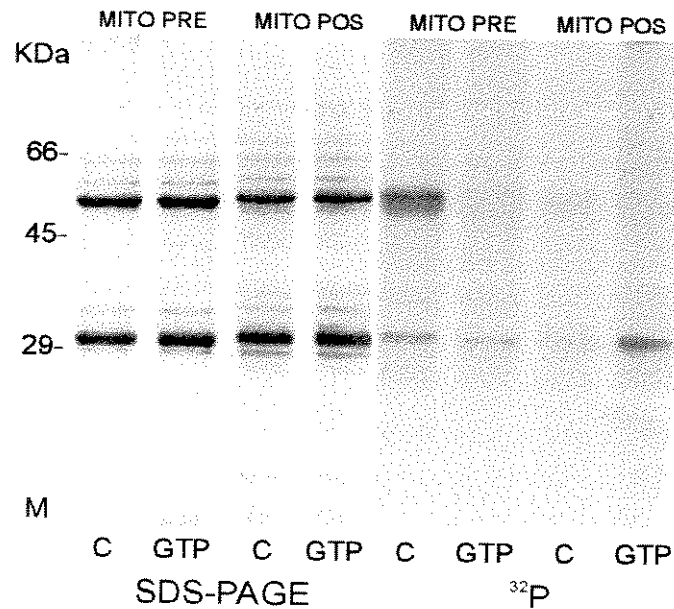
mitocôndrias isoladas de frutos pós-climatéricos com uma alta respiração insensível ao cianeto (50-80%).

#### **4.9. Incorporação covalente de 8-azido ATP em mitôcondrias de abacate**

Sob condições experimentais específicas e através de marcação por fotoafinidade com 8-azido ATP foram detectadas, em mitocôndrias de abacate pré- e pós-climatério, diferentes proteínas mitocondriais ligantes de ATP.

Para a marcação da subunidade  $\beta$  da ATP sintetase, que tem massa molecular de 50 KDa, e é a principal subunidade ligante de ATP desta proteína, as mitocôndrias foram rompidas, através de sucessivos congelamentos e descongelamentos da suspensão mitocondrial em  $N_2$  líquido, uma vez que esta subunidade da ATP sintetase está voltada para a matriz mitocondrial.

Membranas mitocondriais assim preparadas foram incubadas com  $50\mu M$  de 8-azido $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP, pH 7,2. Este tratamento resultou na marcação da subunidade  $\beta$  da porção  $F_1$  da ATP sintetase. Esta incorporação foi inibida, por competição, na presença de GTP, que é um ligante natural desta subunidade (Figura 12). O análogo fotorreativo provavelmente se incorporou nos sítios catalíticos das subunidades  $\beta$ , uma vez que, como já foi demonstrado anteriormente, utilizando-se as mesmas condições para fotomarcção, a porção  $F_1$  da ATPase mitocondrial de coração bovino incorpora 2-azido-ATP no fragmento peptídico pertencente à porção catalítica da subunidade  $\beta$  (MARTINS & PENEFSKY, 1994). A Figura 12 também mostra que não foi detectada incorporação do 8-azido  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP em membranas mitocondriais de frutos pós-



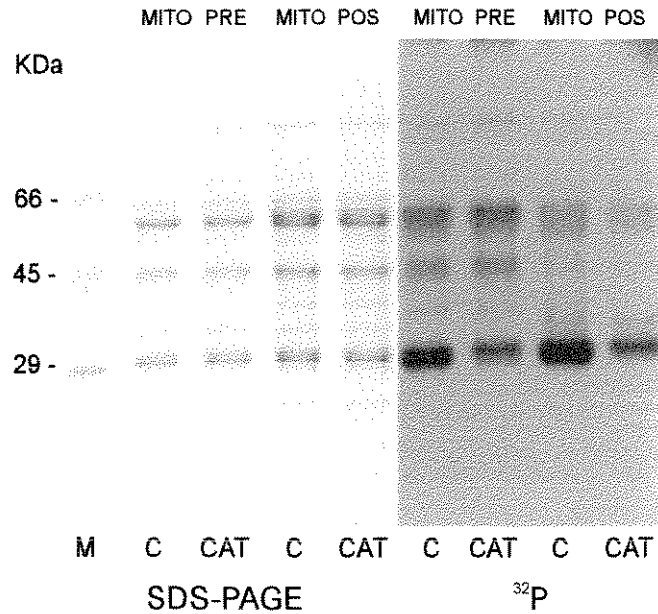
**FIGURA 12.** Incorporação covalente de 8-azido ATP na porção  $F_1$  de mitocôndrias de frutos de abacate pré- (MITO PRE) e pós-climatério (MITO POS). Membranas mitocondriais lavadas ( $0,5\text{mg}/200\mu\text{L}$ ) foram irradiadas em presença de  $50\mu\text{M}$  de 8-azido $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , pH 7,2 como descrito em Materiais e Métodos. GTP ( $1\text{mM}$ ) foi adicionado onde indicado. SDS-PAGE, gel de eletroforese com  $20\mu\text{g}$  de proteína em cada coluna;  $^{32}\text{P}$ , auto-radiografia correspondente; M, padrão de massa molecular.

climatéricos sugerindo um decréscimo no conteúdo da subunidade  $\beta$  durante o climatério.

Repetindo-se as condições anteriores porém, utilizando-se mitocôndrias intactas, foram marcadas proteínas ligantes de ATP, que estão expostas na face citosólica da membrana mitocondrial. Este procedimento resultou na incorporação de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP à uma proteína de 30 KDa (Figura 13) que foi inibida na presença de CAT o que indica se tratar do translocador de ADP/ATP. Pode-se também observar que o conteúdo desta proteína não sofre alteração significativa durante o climatério. Além disso, a Figura 13 mostra que, mesmo na presença de CAT, existe ainda certa incorporação de 8-azido-ATP em mitocôndrias de abacate. Esta observação nos levou a verificar se a marcação remanescente poderia resultar da incorporação do análogo fotorreativo em uma proteína do tipo desacopladora, que pôde ser distinguida do translocador de ADP/ATP nos experimentos com batata (Figura 5) e tecido adiposo marrom (Figura 7). Entretanto, a proximidade em massa molecular, dificultou a identificação desta proteína através desta metodologia, o que não elimina a possibilidade que esta proteína possa existir em mitocôndrias de frutos de abacate.

#### **4.10. Efeito de BSA sobre o potencial de membrana de mitocôndrias de fruto de abacate**

A literatura registra amplamente que para se obter mitocôndrias de plantas acopladas, é necessário o uso de BSA no meio de reação (DUCET, 1979; DIOLEZ & MOREAU, 1983; 1985). O BSA agiria por se ligar a ácidos graxos livres que são conhecidos como desacopladores da fosforilação oxidativa

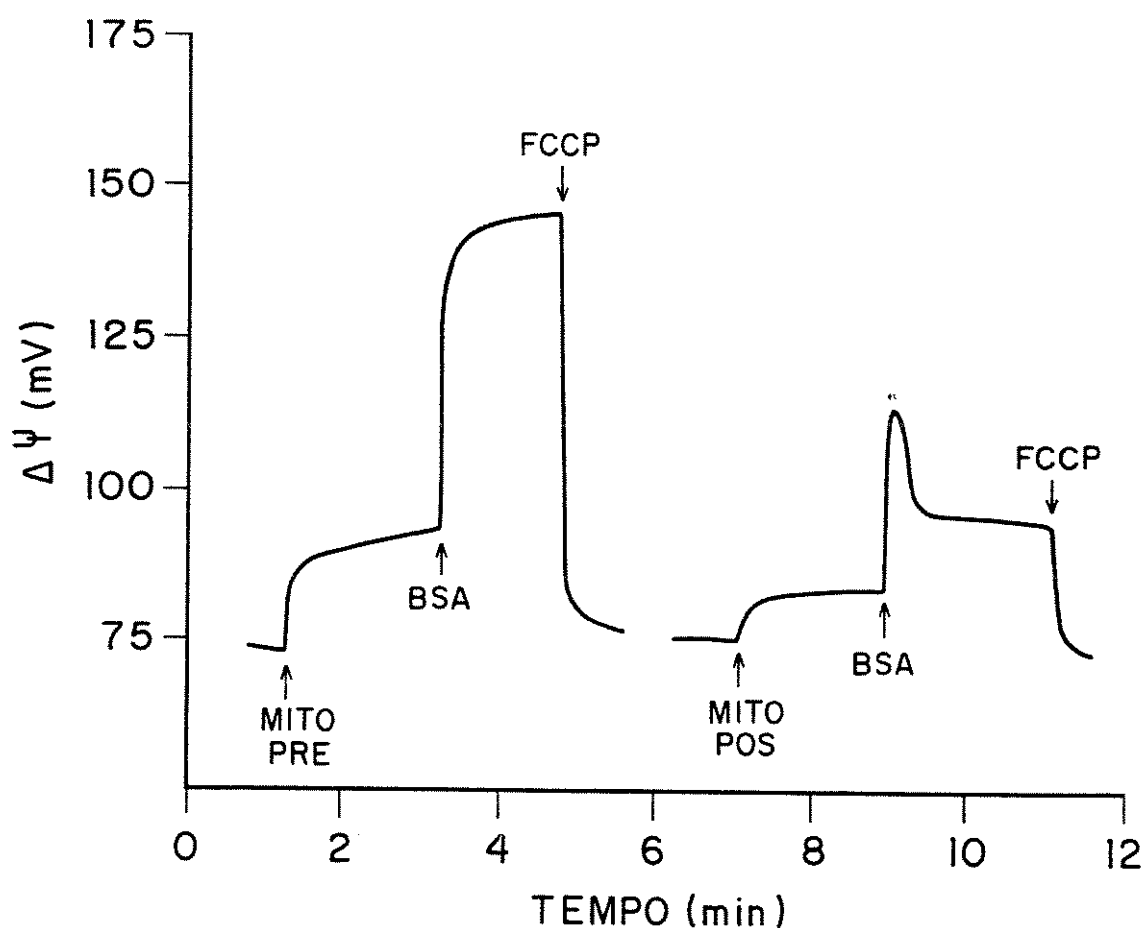


**FIGURA 13.** Incorporação covalente de 8-azido ATP no translocador de ADP/ATP de mitocôndrias de frutos de abacate pré- (MITO PRE) e pós-climatério (MITO POS). As suspensões mitocondriais (0,5mg/200 $\mu\text{L}$ ) foram irradiadas em presença de 50 $\mu\text{M}$  de 8-azido[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, pH 7,2 como descrito em Materiais e Métodos. CAT (20 $\mu\text{M}$ ) foi adicionado onde indicado. SDS-PAGE, gel de eletroforese com 20 $\mu\text{g}$  de proteína em cada coluna;  $^{32}\text{P}$ , auto-radiografia correspondente; M, padrão de massa molecular.

(PRESSMAN & LARDY,1956). Como as mitocôndrias de frutos de abacate apresentam um grande conteúdo de lipídios, seu isolamento foi feito em presença de BSA. O efeito da presença de BSA no meio de reação, sobre o  $\Delta\Psi$  estabelecido pela oxidação do succinato, foi examinado em mitocôndrias isoladas de frutos de abacate pré- e pós-climatério. Na Figura 14 observa-se que, o  $\Delta\Psi$  inicialmente construído por mitocôndrias de abacate pré-climatério é muito baixo (em torno de 93mV) e que seu valor aumenta para 145mV, quando 0,1% BSA é adicionado ao meio de reação. Em mitocôndrias pós-climatério o potencial inicialmente também é baixo (96mV), mas aumenta momentaneamente para 120mV, com o acréscimo de 0,1% BSA e rapidamente retorna a um valor baixo (96mV), mostrando que estas mitocôndrias não são capazes de manter o  $\Delta\Psi$  nas mesmas condições. A Figura 14 mostra ainda que a adição do desacoplador FCCP colapsou o potencial de membrana de ambos os tipos de mitocôndrias.

Como as duas categorias de mitocôndrias foram isoladas e purificadas na presença de BSA era esperado que o conteúdo de ácidos graxos contaminantes nos dois tipos de mitocôndrias deveriam se equivaler. O reduzido efeito do BSA no acoplamento da respiração de mitocôndrias extraídas de frutos pós-climatéricos sugeriu que estas mitocôndrias devam apresentar uma maior condutância a  $H^+$  que mitocôndrias de frutos pré-climatéricos.



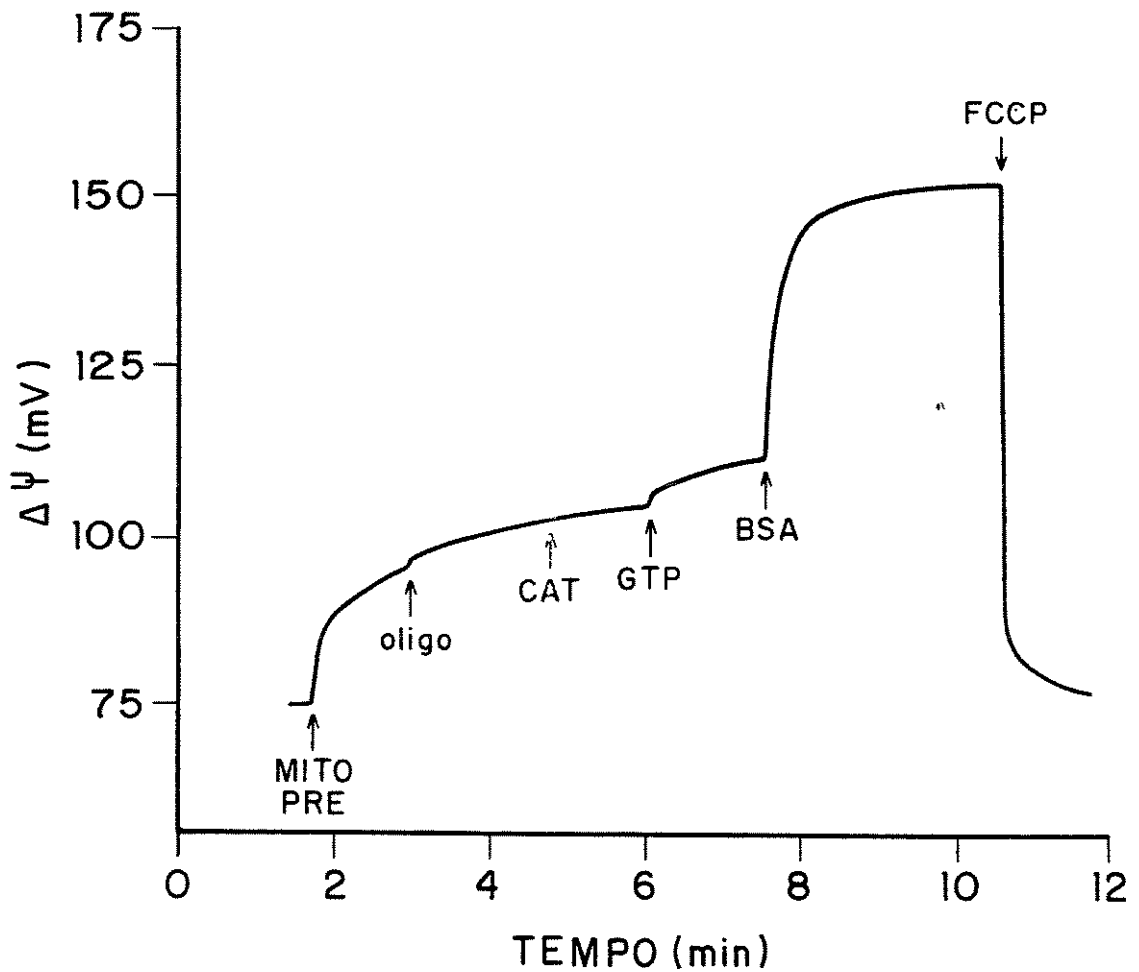


**FIGURA 14.** Efeito de BSA no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de abacate pré- (MITO PRE) e pós-climatério (MITO POS). A 1mL do “Meio Básico de Reação”, acrescido de succinato (2mM); rotenona (5 $\mu$ M) e safranina (10 $\mu$ M), foram adicionados onde indicado: mitocôndrias de abacate (0,5mg/mL), BSA (0,1%) e FCCP (2 $\mu$ M).

#### 4.11. Efeito de inibidores de canais de H<sup>+</sup> sobre o $\Delta\Psi$ de mitocôndrias de frutos de abacate

Diante dos resultados descritos no item anterior, onde um alto desacoplamento foi observado em mitocôndrias de abacate pós-climatério (Figura 14), procurou-se avaliar o efeito de alguns ligantes conhecidos por inibir o transporte de prótons através de proteínas específicas da membrana mitocondrial. Na tentativa de esclarecer estes aspectos, lançou-se mão de inibidores do translocador de ADP/ATP, como o CAT (KLINGENBERG *et al.*, 1978) e o BKA (HENDERSON & LARDY, 1970; HENDERSON *et al.*, 1970); para inibir o transporte de H<sup>+</sup> pela ATP sintetase, utilizou-se a oligomicina (HATEFI, 1985; GAUTHERON & GODINOT, 1988; PENEFSKY & CROSS, 1991). Ainda, com o objetivo de se verificar a possível atuação de uma proteína do tipo desacopladora nestas mitocôndrias, utilizou-se ATP e GTP que, como mostrado nos experimentos anteriores, são ligantes da PUMP de batata e conhecidos inibidores do transporte de H<sup>+</sup> pela UCP de TAM (RIAL *et al.*, 1983).

Os experimentos desenvolvidos na presença destes inibidores com mitocôndrias de abacate pré-climatério encontram-se representados na Figura 15. O potencial de membrana estabelecido pela energização das mitocôndrias com succinato foi de cerca de 93mV e, a adição de oligo, CAT ou GTP não alterou este valor, independentemente da ordem em que foram adicionados. Quando 0,1% de BSA foi adicionado, houve uma elevação imediata na magnitude do potencial de membrana para um valor próximo de 155mV. Estes resultados sugeriram que o aumento promovido pelo BSA foi devido a inibição do transporte

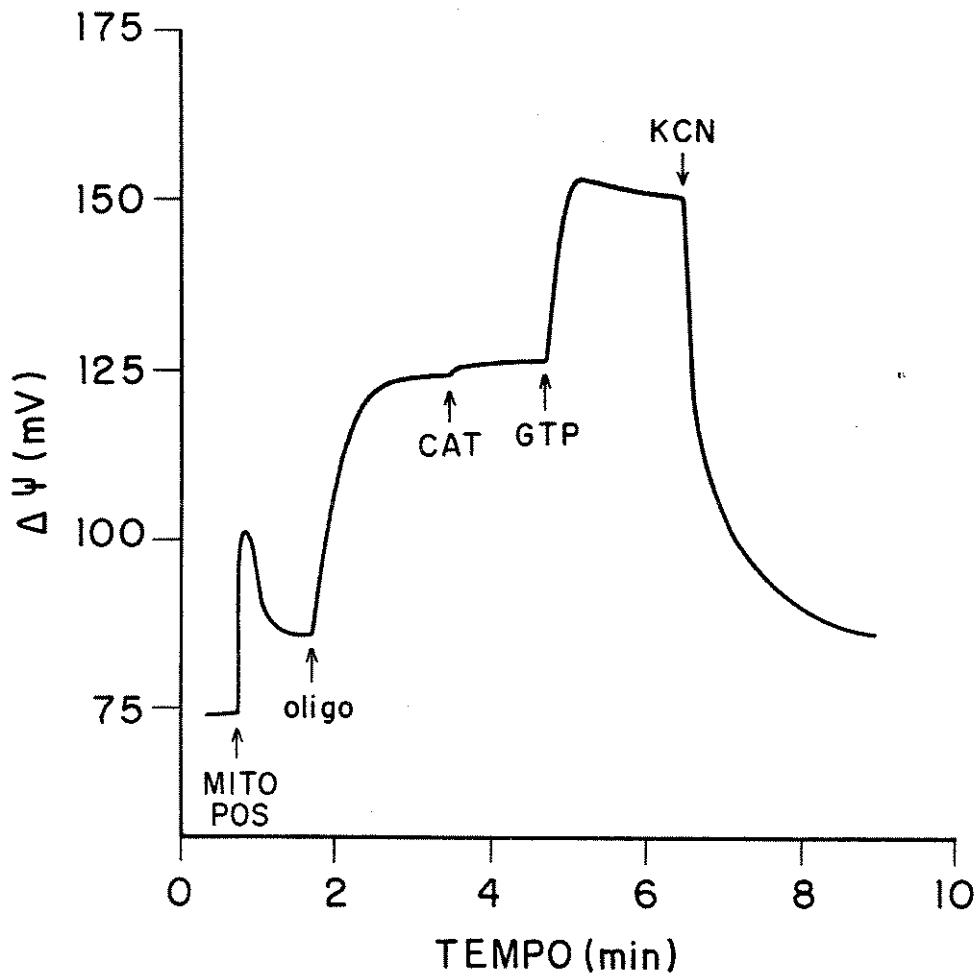


**FIGURA 15.** Efeito de oligomicina, CAT e GTP no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de abacate pré-climatério (MITO PRE). As condições são idênticas às da Figura 14. Foram adicionados, onde indicado: MITO PRE (0,5mg/mL), oligo (2 $\mu$ g/mL), CAT (1 $\mu$ M), GTP (1mM), BSA (0,1%) e FCCP (2 $\mu$ M).

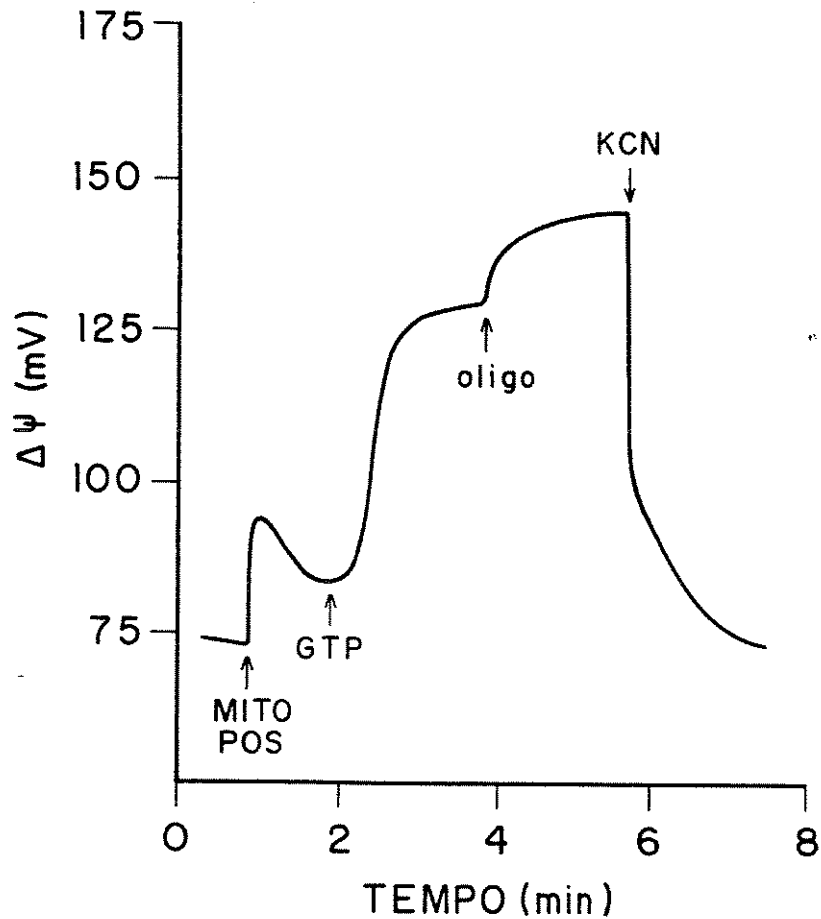
inespecífico de  $H^+$  por contaminação com ácidos graxos endógenos, sem a participação de um mediador protéico específico.

Em seguida, foi investigado o efeito dos mesmos inibidores, utilizando-se mitocôndrias isoladas de abacate pós-climatério onde o BSA não conseguiu manter o  $\Delta\Psi$  (Figura 14). Na Figura 16 observa-se que a oligomicina aumentou o  $\Delta\Psi$  de 86mV para 127mV e a subsequente adição de GTP causou um aumento adicional para 151mV. A Figura 16 também mostra que o CAT não alterou o potencial de membrana e que a adição de KCN colapsou por completo este potencial. Quando o GTP foi adicionado antes da oligomicina o  $\Delta\Psi$  aumentou de 83mV para 128mV e a posterior adição de oligo elevou este valor para 144mV (Figura 17). Ainda, a adição prévia de CAT não alterou o  $\Delta\Psi$  destas mitocôndrias (dados não mostrados). Os resultados das Figuras 16 e 17 indicam que o efeito do GTP e da oligo são aditivos e independentes da ordem em que são acrescentados ao meio de reação. Ainda, sugerem que a elevada condutância a  $H^+$  destas mitocôndrias ocorre através da porção  $F_o$  da ATP sintetase e de um provável canal de  $H^+$  sensível ao GTP.

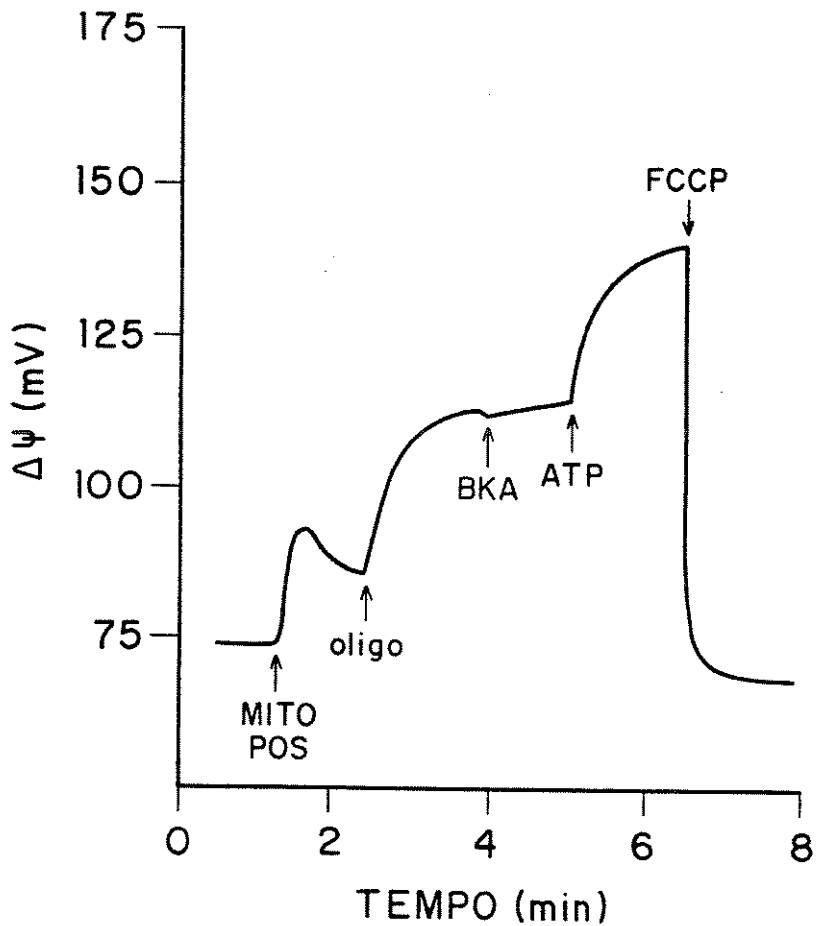
A Figura 18 mostra que o BKA não tem efeito no  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias de abacate pós-climatério. Ainda nesta figura pode ser visto que, mesmo em presença de oligomicina, a adição de ATP acarretou aumento no potencial de membrana, eliminando a possibilidade de que o incremento do potencial elétrico das mitocôndrias teria ocorrido às custas da hidrólise de ATP. Embora nucleotídeos de adenina possam também se ligar no translocador de ADP/ATP, o aumento induzido no  $\Delta\Psi$  pelo ATP provavelmente resultou da sua ação sobre um sítio diferente, uma vez que os inibidores do translocador não tiveram efeito nestas mitocôndrias, independentemente da ordem em que foram adicionados.



**FIGURA 16.** Efeito de oligomicina, CAT e GTP no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de abacate pós-climatério (MITO POS). As condições são idênticas às da Figura 14. Foram adicionados, onde indicado: MITO POS (0,5mg/mL), oligo (2 $\mu$ g/mL), CAT (1 $\mu$ M), GTP (1mM) e KCN (1mM).



**FIGURA 17.** Efeito de GTP e oligomicina no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de abacate pós-climatério (MITO POS). As condições são idênticas às da Figura 14. Foram adicionados, onde indicado: MITO POS (0,5mg/mL), GTP (1mM), oligo (2 $\mu$ g/mL) e KCN (1mM).



**FIGURA 18.** Efeito de oligomicina, BKA e ATP no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) em mitocôndrias de abacate pós-climatério (MITO POS). As condições são idênticas às da Figura 14. Foram adicionados, onde indicado: MITO POS (0,5mg/mL), oligo (2 $\mu$ g/mL), BKA (5 $\mu$ M), ATP (1mM) e FCCP (2 $\mu$ L).

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente trabalho utilizou a marcação por fotoafinidade com 8-azido ATP para identificar a presença à PUMP em mitocôndrias de tubérculos de batata e mostrar que esta apresenta propriedades similares à UCP de mitocôndrias de TAM. A marcação por fotoafinidade com 8-azido ATP em mitocôndrias de batata resultou na incorporação de duas proteínas: uma delas com uma M.M. aparente de 32 KDa e a outra com uma M.M. aparente de 30 KDa. Estas proteínas devem corresponder à PUMP e ao translocador de ADP/ATP, uma vez que a incorporação do análogo fotorreativo foi inibida pela adição de GTP e CAT, respectivamente, como observado na Figura 5. A confirmação destas conclusões está baseada em resultados obtidos com outros tipos de mitocôndrias, em condições experimentais comparáveis. O padrão de incorporação de 8-azido-ATP em mitocôndrias de batata foi semelhante ao obtido com mitocôndrias de TAM (Figura 7) que contém UCP, mas não com o de mitocôndrias de fígado de rato (Figura 6) que não expressam esta proteína (NICHOLLS, 1976; RAFAEL & HELDT, 1976).

Evidências adicionais de que mitocôndrias de tubérculos de batata possuem uma proteína desacopladora com propriedades de ligação para nucleotídeos similares à UCP de TAM, são mostradas pela curva de saturação da ligação do 8-azido ATP nestas mitocôndrias (Figuras 2 e 3). Em mitocôndrias de fígado de rato a ligação do 8-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP não foi deslocada pelo GTP, um significativo inibidor deste processo, como foi observado em mitocôndrias de batata. Estes resultados indicaram que as mitocôndrias de batata possuem um sítio de ligação para nucleotídeos, sensível ao GTP, que não é observado em



mitocôndrias de fígado. A participação do translocador de ADP/ATP deve ser descartada, uma vez que a presença de CAT não interferiu na ligação dos nucleotídeos. O menor acúmulo de 8-azido ATP em mitocôndrias de batata, em comparação ao de mitocôndrias de fígado de rato, deve ser resultado do menor conteúdo de nucleotídeos endógenos destas mitocôndrias (DOUCE, 1985).

A cinética de ligação de 8-azido ATP em sítios de mitocôndrias de batata, sensíveis ao GTP, pôde ser melhor avaliada quando a atividade do translocador de ADP/ATP foi inibida pelo CAT. O alto valor obtido para a constante de dissociação ( $21\mu\text{M}$ ) está de acordo com resultados anteriores mostrando que a inibição no transporte de prótons pela PUMP, incorporada em lipossomos, foi alcançada apenas utilizando-se altas concentrações de ATP (VERCESI *et al.*, 1995).

Comparando-se o efeito do pH na ligação de 8-azido-ATP, sensível ao GTP, em mitocôndrias de batata e fígado, os dados da Figura 4 também indicam a participação desta outra proteína. Apenas as mitocôndrias de batata mostraram ligação dependente do pH. Em pH 6,0, a ligação de 8-azido-ATP em mitocôndrias de batata foi bastante superior à obtida para as organelas de fígado. Quando se lembra que estes experimentos foram realizados em presença de CAT, percebe-se novamente que, apenas em mitocôndrias de batata devem existir sítios adicionais de ligação de nucleotídeos de adenina, além do translocador de ADP/ATP. Considerando-se os níveis mais baixos como correspondentes a ligação inespecífica, os dados indicaram que apenas em batata devem existir sítios de ligação para GTP.

No presente trabalho foi possível também demonstrar que o translocador de ADP/ATP, além da PUMP, participa do fenômeno de desacoplamento de

mitocôndrias de tubérculos de batata, induzido por AGL. Isto porque, inibidores destas proteínas foram capazes de reverter de maneira independente e aditiva, tanto o aumento na velocidade de respiração (Tabela 1), como a dissipação do  $\Delta\Psi$  (Figuras 8 e 9), induzido pelo palmitato.

Recentemente, o grupo de SKULACHEV demonstrou o envolvimento do carreador glutamato/aspartato (BODROVA *et al.*, 1995; SMARTSEV *et al.*, 1997), assim como do carreador dicarboxilato (WIECKOWSKI & WOJTZAK, 1997) na ação protonofórica dos ácidos graxos de cadeia longa em mitocôndrias de mamíferos, que não sejam aquelas de tecido adiposo marrom. A observação de que o BSA pôde reverter o efeito do palmitato no desacoplamento de mitocôndrias de tubérculo de batata, mesmo após o tratamento com CAT e GTP (Figura 9), sugere que os carreadores di- ou tricarboxilatos poderiam também participar do controle da permeabilidade à  $H^+$  nestas mitocôndrias.

Em mamíferos, a temperatura do corpo pode aumentar pela ação da UCP do TAM, a qual dissipa o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna, gerando calor ao invés de sintetizar ATP (NICHOLLS & LOCKE, 1984). Em plantas, mecanismos termogênicos similares ainda não são bem entendidos. A produção de calor associada com o disparo na respiração em plantas é observada em processos como a floração e no amadurecimento de frutos climatéricos (MEEUSE, 1975; MEEUSE *et al.*, 1988; KUMAR *et al.*, 1990; KUMAR & SINHA, 1992).

O climatério é um processo de diferenciação tecidual envolvendo mudanças biológicas e fisiológicas levando ao desenvolvimento de um fruto de textura suave e saborosa (BRANDY, 1987; FISHER & BENNET, 1991). Durante este processo ocorre um disparo na respiração e em seguida um decréscimo, que

muitas vezes está associado a uma maior produção do fitohormônio etileno (KNEISSL & DEIKMAN, 1996).

Estudos iniciais sobre o climatério associavam o aumento da atividade respiratória mitocondrial com a oxidase alternativa como sendo responsável pela respiração desacoplada (SOLOMOS & LATIES, 1976; SOLOMOS, 1977). Entretanto, estudos posteriores realizados pelo mesmo grupo mostravam que não havia uma participação obrigatória da oxidase alternativa durante o climatério (THEOLOGIS & LATIES, 1978). Até hoje não há uma explicação plausível da relação metabólica entre o aumento respiratório e a atividade mitocondrial durante o processo de amadurecimento de frutos climatéricos. Um aumento no vazamento de prótons através da membrana mitocondrial poderia pelo menos em parte explicar a respiração climatérica uma vez que, a velocidade de transporte de elétrons e, conseqüentemente, a velocidade de consumo de oxigênio mitocondrial, são controlados pelo gradiente eletroquímico de  $H^+$ . Um possível mecanismo desacoplador poderia ocorrer pela ativação do transporte de  $H^+$  através de proteínas específicas da membrana interna mitocondrial, como a PUMP e o translocador de ADP/ATP, à semelhança do que foi observado no presente trabalho com mitocôndrias de batata. Ainda, a porção  $F_o$  da ATP sintetase, sendo um canal para  $H^+$ , pode provocar o desacoplamento mitocondrial quando a  $F_1$  não está perfeitamente ajustada. Assim, procurou-se investigar se a atividade respiratória desacoplada de frutos de abacate climatéricos poderia resultar de uma facilitação do transporte de  $H^+$  através destas proteínas.

Embora não tenha sido possível identificar uma proteína do tipo PUMP em mitocôndrias isoladas de frutos de abacate, através de marcação por fotoafinidade com 8-azido-ATP, a observação de que o GTP apresentou um

efeito substancial no  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias isoladas de frutos de abacate pós-climatéricos (Figuras 16 e 17), sugere que uma proteína como a PUMP estaria ativa nestas mitocôndrias.

A ligação de nucleotídeos de purina em mitocôndrias isoladas de TAM foi amplamente utilizada nos estudos iniciais como uma medida do conteúdo de UCP nestes tecidos. Entretanto, estudos posteriores mostraram que alterações agudas na ligação de GDP poderia ocorrer sem uma aparente alteração no conteúdo de UCP (MILNER & TRAYHUM, 1988). Atualmente é aceito que a estequiometria da ligação de nucleotídeos à UCP corresponde à atividade termogênica do TAM e assim à atividade da UCP. FEIL & RAFAEL (1994) sugeriram que a variação na ligação de GDP reflete a atividade funcional da UCP, em função de diferentes conformações da proteína. Estas características poderiam explicar os resultados obtidos com mitocôndrias de abacate onde a atividade e não o conteúdo de uma proteína como a PUMP estaria aumentada nas mitocôndrias de frutos pós-climatéricos, caso contrário acredita-se que esta proteína teria sido identificada pela incorporação de 8-azido-ATP.

As observações de que o conteúdo do translocador de ADP/ATP não se alterou com o climatério (Figura 13), bem como o estabelecimento e a manutenção do  $\Delta\Psi$  não apresentaram nenhuma dependência dos ligantes do translocador (em mitocôndrias de abacates pré- (Figura 15) ou pós-climatério (Figuras 16 e 18), mostram que esta proteína não participa do processo de desacoplamento destas mitocôndrias. SCHÖNFELD (1990) mostrou que o efeito do CAT em reverter o desacoplamento mitocondrial induzido por AGL é proporcional ao conteúdo do translocador de ADP/ATP em mitocôndrias de diferentes mamíferos, uma observação também já relatada para mitocôndrias de

plantas (VIANELLO *et al.*, 1994). Embora não tenha sido comparado o conteúdo do translocador de ADP/ATP de mitocôndrias de frutos de abacate com o de mitocôndrias de batata, tal relação poderia explicar a não dependência dos ligantes do translocador no estabelecimento do  $\Delta\Psi$  em mitocôndrias de abacate.

Diferentemente dos resultados obtidos para o translocador de ADP/ATP, o substancial efeito que a oligomicina apresentou no  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias de frutos pós-climatéricos (Figuras 16 a 18) indicou que a porção  $F_0$  da ATP sintetase destas mitocôndrias é bastante permeável a  $H^+$ , uma característica não observada em mitocôndrias isoladas de frutos pré-climatéricos (Figura 15). Está bem estabelecido que membranas mitocondriais depletadas de  $F_1$  são bastante permeáveis a  $H^+$  e que, nestas membranas depletadas, a oligomicina é capaz de selar a porção  $F_0$ , mesmo na ausência de  $F_1$  e OSCP (PENIN, *et al.*, 1985). Assim, nossos resultados sugerem que um maior vazamento de prótons através da porção  $F_0$  da ATP sintetase mitocondrial, resultante de um decréscimo no conteúdo de  $F_1$ , poderia contribuir para o disparo na respiração observado durante o amadurecimento de frutos de abacate. Corroborando esta interpretação, a marcação por fotoafinidade com 8-azido-ATP mostrou que mitocôndrias isoladas de frutos de abacate pós-climatéricos não apresentaram incorporação do análogo fotorreativo na subunidade  $\beta$  (Figura 12).

Estudos recentes sobre a oxidase alternativa em mitocôndrias de plantas tem levantado a idéia de que a partição de elétrons entre a via alternativa e a via do citocromo está sob complexa regulação e pode ser determinada por múltiplos mecanismos (MOORE & SIEDOW, 1991; VANLERBERGHE *et al.*, 1995; VANLERBERGHE, 1997). Com base nos resultados deste trabalho, um possível mecanismo para tal regulação seria que, em mitocôndrias de frutos pós-

climatéricos o gradiente eletroquímico de  $H^+$  gerado pela respiração seria dissipado pela volta dos  $H^+$  através da porção  $F_o$  da ATP sintetase e por uma possível proteína desacopladora do tipo PUMP. Nestas condições, de baixo gradiente eletroquímico de  $H^+$ , o engajamento da oxidase alternativa, que tem uma expressão acentuada nos frutos pós-climatéricos (Figura 11), resultaria no disparo da respiração mitocondrial. Estudos futuros sobre o amadurecimento de frutos climatéricos buscando entender as relações entre o aumento do fluxo de  $H^+$  através de proteínas específicas da membrana mitocondrial e o engajamento da oxidase alternativa poderiam contribuir para o esclarecimento deste processo termogênico. Também fica para elucidar porque plantas usariam a via da oxidase alternativa sob condições de baixo  $\Delta\Psi$ , ao invés da via do citocromo, como ocorre nas mitocôndrias de TAM (NICHOLLS, 1977; 1979).

## 6. LITERATURA CITADA

- ÅKERMAN, K. E. O. & WIKSTRÖM, M. K. F., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potencial. **FEBS Lett.**, 68 (2): 191-197.
- ALTHOFF, G.; LILL, H. & JUNGE, W., 1989. Proton channel of the chloroplast ATP synthase, CF<sub>o</sub>: its time-averaged single-channel conductance as function of pH, temperature, isotopic and ionic medium composition. **J. Membr. Biol.**, 108: 263-271.
- ANDREYEV, A. YU.; BONDAREVA, T. O.; DEDUKHOVA, V. I.; MOKHOVA, E. N.; SKULACHEV, V. P. & VOLKOV, N. I. , 1988. Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. **FEBS Lett.**, 226 (2): 265-269.
- ANDREYEV, A. YU.; BONDAREVA, T. O.; DEDUKHOVA, V. I.; MOKHOVA, E. N.; SKULACHEV, V. P.; VOLKOV, N. I. & VYGODINA, T. V., 1989. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on the mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, 1182: 585-592.
- AP REES, T.; FULLER, W. A. & WRIGHT, B., 1977. Measurements of glycolytic intermediates during the onset of thermogenesis in the spadix of *Arum maculatum*. **Biochim. Biophys. Acta**, 461: 274-282.
- AQUILA, H.; LINK, T. A. & KLINGENBERG, M., 1985. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier: analysis of sequence homologies and folding of the protein in the membrane. **EMBO J.**, 4: 2369-2376.
- AQUILA, H.; LINK, T. A. & KLINGENBERG, M., 1987. Solute carries involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. **FEBS Lett.**, 212 (1): 1-9.

- BENDALL, D. S. & BONNER, W. D., 1971. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. **Plant Physiol.**, 47: 236-245.
- BIANCO, A. C.; SHENG, X. & SILVA, J. E., 1988. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. **J. Biol. Chem.**, 263: 18168-18175.
- BODROVA, M. E.; MARKOVA, O. V.; MOKHOVA, E. N. & SMARTSEV, V. N., 1995. Involvement of ATP/ADP-antiporter in fatty acid-induced uncoupling in rat liver mitochondria. **Biochemistry (Moscow)**, 60: 1027-1033.
- BOSS, O.; SAMES, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P. & GIACOBINO, J. P., 1997. Uncoupling protein-3: a new member of mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett.**, 408: 39-42.
- BOYER, P. D. & KOHLBRENNER, W. E., 1981. The present status of the binding-change mechanism and the relation to ATP formation by chloroplasts. IN: **Energy Coupling in Photosynthesis** (B. R. Selman & S. Selman-reimer, eds) Elsevier, North Holland, New York, pp. 231-241.
- BRANDY, C. J., 1987. Fruit ripening. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 38: 155-178.
- BRUSTOVETSKY, N. & KLINGENBERG, M., 1994. The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H<sup>+</sup> transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. **J. Biol. Chem.**, 269: 27329-27336.
- BULLOUGH, D. A. & ALLISON, W. S., 1986. Three copies of the  $\beta$  subunit must be modified to achieve complete inactivation of the bovine mitochondria F<sub>1</sub>-ATPase by 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenine. **J. Biol. Chem.**, 261: 5722-5730.



- BULLOUGH, D. A.; BROWN, E. L.; SAARIO, J. D. & ALLISON, W. S., 1988. On the location and function of the noncatalytic sites on the bovine heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. **J. Biol. Chem.**, 263: 14053-14060.
- CANNON, B. & LINDBERG, O., 1979. Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. **Methods Enzymol.**, 55: 65-78.
- CLARKSON, A. B.; BIENEN, E. J.; POLLAKIS, G. & GRADY, R. W., 1989. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. **J. Biol. Chem.**, 264: 17770-17776.
- CROSS, R. L. & NALIN, C. M., 1982. Adenine nucleotide binding sites on beef heart F<sub>1</sub>-ATPase. **J. Biol. Chem.**, 257: 2874-2881.
- CROSS, R. L.; CUNNINGHAM, D.; MILLER, C. G.; XUE, Z.; ZHOU, J. M. & BOYER, P. D., 1987. Adenine nucleotide binding sites on beef heart F<sub>1</sub>-ATPase: photoaffinity labeling of  $\beta$ -subunit Tyr-368 at a non catalytic site and  $\beta$  Tyr-345 at a catalytic site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 5715-5719.
- CZARNECKI, J. J., 1984. Tautomerism of 2-azido adenine nucleotides, effects on enzyme kinetics and photoaffinity labeling. **Biochim. Biophys. Acta**, 800: 41-51.
- CZARNECKI, J.; GEAHLEN, R. & HALEY, B., 1979. Synthesis and use of azido photoaffinity analogs of adenine and guanine nucleotides. **Methods Enzymol.**, LVI: 642-653.
- DALBON, P.; BRANDOLIN, G.; BOULAY, F.; HOPPE, J. & VIGNAIS, P. V., 1988. Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef

- heart mitochondria by photolabeling with 2-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P] adenosine diphosphate. **Biochemistry**, 27: 5141-5149.
- DAY, D. A.; DRY, I. B.; SOOLE, K. L.; WISKICH, J. T. & MOORE, A. L., 1991. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: derivations of NADH and quinols. **Plant Physiol.**, 95: 948-953.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F., 1983. Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. **Physiol. Plant.**, 59: 177-182.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F., 1985. Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 806: 56-63.
- DOUCE, R., 1985. **Mitochondria in Higher Plants: structure, function, and biogenesis**. Academic Press, London, 327p.
- DOUCE, R. & NEUBURGER, M., 1989. The uniqueness of plant mitochondria. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 40: 371-414.
- DRY, I. B.; MOORE, A. L.; DAY, D. A. & WISKICH, J. T., 1989. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. **Arch. Biochem. Biophys.**, 273: 148-157.
- DUCET, G. 1979. Influence of bovine serum albumine on the proton conductance of potato mitochondria membranes. **Planta**, 147: 122-126.
- ELTHON, T. E. & McINTOSH, L. 1987. Identification of alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 8399-8403.

- FEIL, S. & RAFAEL, J., 1994. Effect of acclimation temperature on the concentration of uncoupling protein and GDP binding in rat brown fat mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, 219: 681-690.
- FISHER, R. L. & BENNETT, A. B., 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 42: 675-703.
- FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPINGNY, O.; LEVI-MEYRVEIS, C.; BOULLAUD, F.; SELDIN, M. F.; SURWIT, R. S.; RICQUIER, D. & WARDEN, C., 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature Genetics**, 15: 269-272.
- FUTAI, M. & KANAZAWA, H., 1983. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase ( $F_0F_1$ ): biochemical and molecular biological approaches. **Microbiol. Rev.**, 47: 285-312.
- FUTAI, M.; NOUMI, T. & MAEDA, M., 1989. ATP synthase ( $H^+$  - ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. **Annu. Rev. Biochem.**, 58: 111-136.
- GARIN, J.; BOULAY, F.; ISSARTEL, J. P.; LUNARDI, J. & VIGNAIS, P. V., 1986. Identification of amino acid residues photolabeled with 2-azido[ $\alpha$ - $^{32}P$ ] adenosine diphosphate in the  $\beta$  subunit of beef heart mitochondrial  $F_1$ -ATPase. **Biochemistry**, 25: 4431-4437.
- GARLID, K. D.; OROSZ, D. E.; MONDRIANSKY, M.; VASSANELLI, S & JEZEK, P., 1996. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J. Biol. Chem.**, 271: 2615-2620.
- GAUTHERON, D. C. & GODINOT, C., 1988. Evidence from immunological studies of structure-mechanism relationship of  $F_1$  and  $F_1F_0$ . **J. Bionerg. Biomembr.**, 20: 451-468.

- GONG, D.; HE, Y.; KARAS, M. & REITMAN, M., 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone,  $\beta$ 3-adrenergic agonists, and leptin. **J. Biol. Chem.**, 272(39): 24129-24132.
- GROMET-ELHANAN, Z. & KHANANSHVILI, D., 1984. Characterization of two nucleotide binding sites on the isolated reconstitutively active  $\beta$  subunit of the  $F_0$ - $F_1$  ATP synthase. **Biochemistry**, 23: 1022-1028.
- HALEY, B. E. & HOFFMAN, J. F., 1974. Interactions of photo-affinity ATP analog with cation-stimulated adenosine triphosphatase of human red cell membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 71:3367-3371.
- HARRIS, D. A., 1977. The interactions of coupling ATPases with nucleotides. **Biochim. Biophys. Acta**, 463: 245-273.
- HATEFI, Y., 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu. Rev. Biochem.**, 54: 1015-1069.
- HATEFI, Y., 1993. ATP Synthesis in mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, 218: 759-767.
- HEATON, G. M.; WAGENVOORD, R. J.; KEMP, A. JR. & NICHOLLS, D. G., 1978. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. **Eur. J. Biochem.**, 82, 515-521.
- HENDENSON, P. J. F. & LARDY, H. A., 1970. Bongkrekic acid. **J. Biol. Chem.**, 245: 1319-1326.
- HENDENSON, P. J. F.; LARDY, H. A. & DORSCHNER, E., 1970. Factors affecting the inhibition of adenine nucleotide translocase by bongkrekic acid. **Biochemistry**, 9: 3453-3457.

- HENRIKA-WAGNER, A. M.; GUDE, H.; MARISSSEN, N.; VANDER PLAS, L. H. W. & VERLEUR, J. D., 1986. Compartmentation of alternative oxidase in plant mitochondria. **Plant Cell Physiol.**, 27(3): 499-503.
- HIMMS-HANGEN, J., 1990. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. **FASEB J.**, 4: 2890-2898.
- ISSARTEL, J. P.; LUNARDI, J. & VIGNAIS, P. V., 1986. Characterization of exchangeable and nonexchangeable bound adenine nucleotides in F<sub>1</sub>-ATPase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, 261: 895-901.
- KAIM, G. & DIMROTH, P., 1993. Formation of a functionally active sodium-translocating hybrid F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATPase in *Escherichia coli* by homologous recombination. **Eur. J. Biochem.**, 218: 937-944.
- KAPLAN, R. S. & PEDERSEN, P. L., 1983. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, 212: 279-283.
- KEARNS, A.; WHELAN, J.; YOUNG, S.; ELTHON, T. E. & DAY, D. A., 1992. Tissue-specific expression of the alternative oxidase in soybean and siratro. **Plant Physiol.**, 99: 712-717.
- KHANANSHVILI, D. & GORMET-ELHANAN, Z., 1985. Evidence that the Mg-dependent low-affinity binding site for ATP and Pi demonstrated on the isolated  $\beta$  subunit of F<sub>o</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase is a catalytic site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 1886-1890.
- KLINGENBERG, M., 1986. Fluorescent nucleotide analogs as active site probe for the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. **Methods Enzymol.**, 125: 618-630.
- KLINGENBERG, M., 1989. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, 270: 1-14.

- KLINGENBERG, M., 1990. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. **Trends Biochem. Sci.**, 15: 108-112.
- KLINGENBERG, M. & LIN, C., 1986. Isolation and hydrodynamic characterization of uncoupling protein from brown adipose tissue. **Methods Enzymol.**, 126: 490-498.
- KLINGENBERG, M. & WINKLER, E., 1985. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H<sup>+</sup> translocator. **EMBO J.**, 4: 3087-3092.
- KLINGENBERG, M.; RICCIO, P. & AQUILA, H., 1978. Isolation of the ADP, ATP carrier as the carboxyatractylate-protein complex from mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 503: 193-210.
- KNEISSL M. L. & DEIKMAN J., 1996. The tomato E<sub>8</sub> gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers. **Plant Physiol.**, 112: 537-547.
- KUMAR, S. & SINHA, S. K., 1992. Alternative respiration and heat production in ripening banana fruits (*Musa paradisiaca* var. *Mysore Kadali*). **J. Exp. Bot.**, 43: 1639-1642.
- KUMAR, S.; PATH, B. C. & SINHA, S. K., 1990. Cyanide-resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 168: 818-822.
- LAEMMLI, U. L., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, 227: 680-685.
- LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J. W.; MÜLLER-RÖBER, B., 1997. A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, 389(11): 135-136.
- LAMBERS, H. 1980. The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plant. **Plant Cell Physiol.**, 3: 293-303.

- LAMBOWITZ, A. M.; SABOURIN, J. R.; BERTRAND, H.; NICKELS, R. & McINTOSH, L., 1988. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Mol. Cell. Biol.**, 9: 1362-1364.
- LANCE, C.; CHAUVEAU, M. & DIZENGREMEL, P., 1985. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. IN: **Encyclopedia of Plant Physiology** (R. Douce & D. A. Day, eds.), Vol. 18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 207-247.
- LATIES, G. G., 1982. The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 33: 519-555.
- LIN, C. S. & KLINGENBERG, M., 1982. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. **Biochemistry**, 21: 2950-2956.
- LOCKE, R. M.; RIAL, E. & NICHOLLS, D. G., 1982a. The acute regulation of mitochondrial conductance in cell and mitochondria from the brown fat of cold- and warm-adapted guinea-pigs. **Eur. J. Biochem.**, 129: 381-387.
- LOCKE, R. M.; RIAL, E. & NICHOLLS, D. G., 1982b. Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown fat mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, 129: 373-380.
- MAIA, I. G.; BENEDETTI, C. E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S. R.; VERCESI, A. E. & ARRUDA, P., 1998. AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Lett.**, 429(3): 403-406.
- MARTINS, I. S. & PENEFSKY, H. S., 1994. Covalent modification of catalytic sites on membrane-bound beef heart mitochondria ATPase by 2-azido-adenine nucleotides. **Eur. J. Biochem.**, 224: 1057-1065.
- MARTINS, I. S. & VERCESI, A. E., 1985. Some characteristics of Ca<sup>+</sup> transport in plant mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 129 (3): 943-948.

- MAYINGER, P. & KLINGENBERG, M., 1992. Labeling of two different regions of the nucleotide binding site of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria with two ATP analogs. **Biochemistry**, 31: 10536-10543.
- McCORMAK, J. G. & DENTON, R. M., 1979. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. **Biochem. J.**, 180: 533-544.
- MEEUSE, B. J. D., 1975. Thermogenic respiration in aroids. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 26: 117-126.
- MEEUSE, B. J. D. & BUGGELN, R. G., 1969. Time space, light and darkness in the metabolic flare-up of the *Sauromatum* appendix. **Acta Bot. Neerl.**, 18: 159-172.
- MEEUSE, B. J. D. & RASKIN, I., 1988. Sexual reproduction in the arum lily family, with emphasis on thermogenicity. **Sex Plant Reprod.**, 1: 3-15.
- MILNER, R. E. & TRAYHURN, P., 1988. Evidence that the acute unmasking of GDP-binding sites in brown adipose tissue mitochondria is not dependent on mitochondrial swelling. **Biochem. Cell Biol.**, 66: 1226-1230.
- MITCHELL, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, 191: 144-148.
- MITCHELL, P., 1969. Chemiosmotic coupling and energy transduction. IN: **Theoretical and Experimental Biophysics** (A. Cole, ed), Dekker, New York, pp. 160-216.
- MOORE, A. L. & SIEDOW, J. N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of the plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 1059: 121-140.



- MOREAU, F. & ROMANI, R., 1982. Preparation of avocado mitochondria using self-generated percoll density gradients and changes in buoyant density during ripening. **Plant Physiol.**, 70: 1380-1384.
- NICHOLLS D. G., 1976. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. **Eur. J. Biochem.**, 62: 223-228.
- NICHOLLS, D. G., 1977. The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue: dependency of proton electrochemical gradient. **Eur. J. Biochem.**, 77: 349-356.
- NICHOLLS, D. G., 1979. Brown adipose tissue mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 549: 1-29.
- NICHOLLS, D. G. & LOCKE, R. M., 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiol. Rev.**, 64: 1-64.
- PALMER, J. M., 1976. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 27: 133-157.
- PALMIERI, F., 1994. Mitochondrial carrier proteins. **FEBS Lett.**, 346: 48-54.
- PEDERSEN, J. I., 1970. Coupled endogenous respiration in brown adipose tissue mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, 16: 12-18.
- PENEFSKY, H. S., 1985. Energy-dependent dissociation of ATP from high affinity catalytic sites of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, 260: 13735-13741.
- PENEFSKY, H. S. & CROSS, R. L., 1991. Structure and mechanism of  $F_0F_1$  - type ATP synthases and ATPases. **Adv. Enzymol.**, 64: 173-214.
- PENIN, F.; ARCHINARD, P.; MORADI-AMÉLI, M. & GODINOT, C., 1985. Stoichiometry of the oligomycin-sensitivity-conferring protein (OSCP) in the

- mitochondrial  $F_0F_1$ -ATPase determined by an immunoelectrotransfer blot technique. **Biochim. Biophys. Acta**, 810: 346-353.
- PRESSMAN, B. C. & LARDY, H. A., 1956. Effects of surface-active agents on latent ATPase of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 21: 458-466.
- PETERSON, G. L., 1977. A simplification of protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, 83: 346-356.
- RAFAEL, J. & HELDT, H. W., 1976. Binding of guanine nucleotides to the outer surface of the inner membrane of guinea pig brown fat mitochondria in correlation with the thermogenic activity of the tissue. **FEBS Lett.**, 63: 304-308.
- RIAL, E.; POUSTIE, A. & NICHOLLS D. G., 1983. Brown adipose tissue mitochondria: the regulation of the 32,000 Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. **Eur. J. Biochem.**, 137: 197-203.
- ROSSI, E. & AZZONE, F., 1969. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic  $K^+$  translocation. **Eur. J. Biochem.**, 7: 418-426.
- SCHÖNFELD, P., 1990. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? **FEBS Lett.**, 264: 246-248.
- SENIOR, A. E., 1988. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. **Physiol. Rev.**, 68: 177-231.
- SIEDOW, J. N. & BERTHOLD, D. A., 1986. The alternative oxidase: A cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. **Physiol. Plant.**, 66: 569-573.

- SIEDOW, J. N. & BICKETT, D. M.; 1981. Structural features required for inhibition of cyanide-insensitive electron transfer by propyl gallate. **Arch. Biochem. Biophys.**, 207: 32-39.
- SKULACHEV, V. P., 1991. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Lett.**, 294: 158-162.
- SMARTSEV, V. N.; SMIRNOV, A. V.; ZELDI, I. P.; MARKOVA, O. V.; MOKHOVA, E. N. & SKULACHEV, V. P., 1997. Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 1319: 251-257.
- SMITH, R. E.; ROBERTS, J. C. & HITTELMAN, K. J., 1966. Non-phosphorylation respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. **Science**, 154: 653-654.
- SOLOMOS, T., 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 28: 663-671.
- SOLOMOS, T. & LATIES, G. G., 1976. Induction by ethylene of cyanide-resistant respiration. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 70: 663-671.
- THEOLOGIS, A. & LATIES, C. G., 1978. Antimycin-insensitive cytochrome mediated respiration in fresh and age potato slices. **Plant Physiol.**, 62: 238-242.
- TRAYHURN, P.; THOMAS, M. E. A. & KEITH, J. S., 1993. Postnatal development of uncoupling protein, uncoupling protein mRNA and GLUT4 in adipose tissue of goats. **Am. J. Physiol.**, 265: R676-R682.
- VANLERBERGHE, G. C., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 48: 703-734.

- VANLERBERGHE, G. G.; DAY, D. A.; WISKICH, J. T.; VANLERBERGHE, A. E. & McINTOSH, L., 1995. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. **Plant Physiol.**, 109: 353-361.
- VERCESI, A. E.; MARTINS, I. S.; SILVA, M. A. P.; LEITE, H. M. F.; CUCCOVIA, I. & CHAIMOVICH, H., 1995. PUMPing plants. **Nature**, 375: 24.
- VIANELLO, A.; PETRUSSA, E. & MACRI, F., 1994. ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate. **FEBS Lett.**, 349: 407-410.
- VIDAL-PUIG, A.; SOLANE, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J. S. & LOWELL, B. B., 1997. UCP3: An uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 235: 79-82.
- VIGNAIS, P. V.; VIGNAIS, P. M. & DEFAYE, G., 1973. Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of receptor site for carboxyatractyloside (gummferin). **Biochemistry**, 12: 1508-1518.
- VIGNAIS, P. V.; BLOCK, M. R.; BOULAY, F.; BRANDOLIN, G. & LAUQUIN, G. J. M., 1985. IN: **Structure and Properties of Cell Membranes** (G. Bengha, ed.). Vol. II, , CRC, Boca Raton, FL., pp.139-179.
- WALKER, J. E.; LUTTER, R.; DUPUIS, A. & RUNISWICK, M. J., 1991. Identification of the subunits of  $F_1F_0$ -ATPase from bovine heart mitochondria. **Biochemistry**, 30: 5369-5378.
- WANGENVOORD, R. J.; VAN der KRAAN, I. & KEMP, A., 1977. Specific photolabelling of beef-heart mitochondrial ATPase by 8-azido-ATP. **Biochim. Biophys. Acta**, 460: 17-24.

- WEIDEMANN, M. J.; ERDELT, H. & KLINGENBERG, M., 1970. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Identification of carrier sites. **Eur. J. Biochem.**, 16: 313-335.
- WIECKOWSKI, M. R. & WOJTCZAK, L., 1997. Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 232: 414-417.
- WINKLER, E. & KLINGENBERG, M., 1992. Photoaffinity labeling of the nucleotide-binding site of the uncoupling protein from hamster brown adipose tissue. **Eur. J. Biochem.**, 203: 295-304.
- WINKLER, E. & KLINGENBERG, M., 1994. Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. **J. Biol. Chem.**, 269: 2508-2515.
- WISE, J. G. & SENIOR, A. E., 1985. Catalytic properties of the *Escherichia coli* proton adenosine triphosphatase: evidence that nucleotide bound at noncatalytic sites is not involved in regulation of oxidative phosphorylation. **Biochemistry**, 24: 6949-6954.
- WOJTCZAK, L. & SCHONFELD, P., 1993. Effect of fatty acids energy coupling processes in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, 1183: 41-57.
- XUE, Z.; ZHOU, J. M.; MELESE, T.; CROSS, R. L. & BOYER, P. D., 1987. Chloroplast F<sub>1</sub> ATPase has more than three nucleotide binding sites and 2-azido-ADP or 2-azido-ATP at both catalytic and noncatalytic sites labels the  $\beta$  subunit. **Biochemistry**, 26: 3749-3753.
- YOSHIDA, M. & ALLISON, W. S., 1986. Characterization of the catalytic and noncatalytic ADP binding sites of the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic bacterium, PS3. **J. Biol. Chem.**, 261: 5714-5721.

## TRABALHOS PUBLICADOS

Os resultados deste trabalho de tese originaram as seguintes publicações:

SAVIANI, E. E.; SILVA, Jr. A. & MARTINS, I. S., 1997. Photoaffinity labelling of the uncoupling protein from potato tuber mitochondria. **Plant Physiol. Biochem.**, 35 (9): 701-706. (Anexo 1).

SAVIANI, E. E. & MARTINS, I. S., 1998. Fatty acid-mediated uncoupling of potato tuber mitochondria. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 44 (4): 833-839. (Anexo 2).

SAVIANI, E. E.; SILVA, Jr. A. & MARTINS, I. S., 1998. Role of  $F_1-F_0$ -ATP synthase and uncoupling protein of ripened avocado fruits. **Plant Physiol. Biochem.**, 36 (8): 000-000 (Anexo 3).

## Photoaffinity labelling of the uncoupling protein from potato tuber mitochondria

Elzira E. Saviani, Arnaldo da Silva Jr. and Ione S. Martins\*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil

\*Corresponding author (Fax 55-192-393124)

**Abstract** In the present work we used 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP to identify the uncoupling protein of potato tuber mitochondria (PUMP). An adenine nucleotide binding site is described which is distinct from the one present in the ATP/ADP carrier (AAC). This adenine nucleotide binding site is sensitive to GTP with a dissociation constant for 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP of 21  $\mu$ M and an optimum at acidic pH. The GTP sensitivity and pH dependence of the adenine nucleotide binding site detected in potato tuber mitochondria was not apparent in rat liver mitochondria (RLM), and closely corresponds to the uncoupling mitochondrial protein (UCP) of brown adipose tissue mitochondria (BATM). The probe 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP was covalently incorporated into potato tuber mitochondria by near ultraviolet irradiation. Two major radioactive bands of 30,000 and 32,000 Da were identified in the autoradiography of the SDS gel electrophoresis of potato mitochondrial proteins. These bands correspond to AAC and PUMP, since labelling was prevented by carboxyatractyloside (CAT) or GTP, respectively.

**Key words** Plant uncoupling mitochondrial protein, photoaffinity labelling, 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP, potato mitochondria, adenine nucleotide binding sites.

**Abbreviations** AAC, ATP/ADP mitochondrial carrier; BATM, brown adipose tissue mitochondria; BSA, bovine serum albumin; CAT, carboxyatractyloside; Hepes, (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); MES, (2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid); PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PM, potato mitochondria; PUMP, plant uncoupling mitochondrial protein; RLM, rat liver mitochondria; SDS, sodium dodecyl sulfate; Tris, Tris[hydroxymethyl]aminomethane; UCP, uncoupling protein.

### INTRODUCTION

The very uncoupled respiration of brown adipose tissue mitochondria (BATM) result from the high  $H^+$  conductivity of the inner mitochondrial membrane. The  $H^+$  electrochemical gradient generated by the redox proton pumps is dissipated into heat instead of being utilized for ATP synthesis (for review, see Nicholls and Locke, 1984). This thermogenic mechanism is important at birth and for cold adaptation of mammals, and for arousal of hibernators (for review, see Nicholls and Rial, 1984). The molecular basis of this  $H^+$  conduction is the uncoupling protein (UCP), a nucleotide binding protein (with Mr of 32,000) present at the inner mitochondrial membrane of BATM that transports  $H^+$  (or  $OH^-$ ) and also  $Cl^-$  (Nicholls, 1977). The binding of purine nucleotides to

UCP inhibits  $H^+$  transport, recoupling the respiration (Nicholls, 1977).

The similarity in molecular mass of the 32,000 Da UCP with the ATP/ADP carrier (AAC), Mr 30,000, and the fact that both proteins have the capability of binding purine nucleoside di- and triphosphates, suggested that these carriers could be related. This hypothesis was substantiated when UCP was isolated from BATM by procedures similar to those developed for the isolation of the AAC (Lin and Klingenberg, 1982) and the analysis of their primary sequences was found to be similar (Aquila *et al.*, 1985). Subsequent determination of the amino acid sequence of the phosphate carrier firmly established that these proteins are members of a mitochondrial carrier family (Aquila *et al.*, 1987).

The apparently exclusive localization of UCP in BATM led to the proposition that this protein was a

late evolutionary acquisition of mammals (Klingenberg, 1990). However, we have recently shown that plant mitochondria present a protein with functional and structural similarities of UCP (Vercesi *et al.*, 1995). The respiratory activity of potato tuber mitochondria is coupled by ATP or GTP addition with a parallel increase in membrane potential. Following the same methodology utilized for isolation of UCP, a protein of an apparent Mr 32,000 was obtained from potato tuber mitochondria that, when incorporated into liposomes was able to increase proton transport in a manner sensitive to ATP or GTP. This protein, capable of controlling  $H^+/OH^-$  transport, named as plant uncoupling mitochondrial protein, PUMP, may be physiologically relevant in heat production in plants.

The identification and characterization of nucleotide binding sites can be carried out by photoaffinity labelling with azidopurine derivatives (Czarnecki, 1984; Dalbon *et al.*, 1988; Martins and Penefsky, 1994). Indeed, the first demonstration that UCP was a 32,000 Da nucleotide binding protein used photoaffinity labelling of BATM with 8-azido ATP. Incorporation of the probe into UCP could be differentiated from the AAC by the use of GTP and atractyloside (Heaton *et al.*, 1978). More recently, this photoaffinity analog was used to identify part of the nucleotide binding site within the primary structure in isolated UCP (Winkler and Klingenberg, 1992).

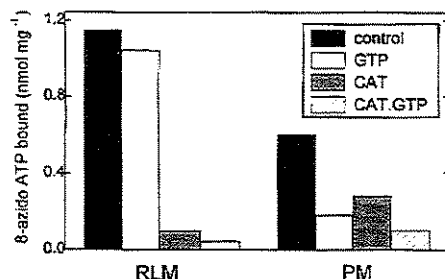
In this paper the photoaffinity label 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP is shown to bind and incorporate into PUMP and AAC of potato tuber mitochondria, thus enabling both of these proteins to be identified.

## RESULTS

### Binding of 8-azido ATP to potato tuber- and rat liver mitochondria

The noncovalent binding properties of 8-azido ATP to potato tuber mitochondria were compared with those of RLM. To avoid covalent incorporation of the 8-azido ATP into mitochondrial proteins, the incubations were performed in the dark. Accumulation of 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP into intact RLM was 1.15 nmol mg protein $^{-1}$  (*fig. 1*). This value could have resulted from binding to the AAC, exchange with endogenous adenine nucleotides or to unspecific sites in the mitochondrial membrane (Weidemann *et al.*, 1970). GTP is a known ligand for UCP (Weidemann *et al.*, 1970; Nicholls, 1976; Rafael and Heldt, 1976) while CAT competes with adenine nucleotides to bind to the AAC

(Vignais *et al.*, 1973). Pre-incubation of RLM with GTP, CAT or both induced a decrease in the total accumulation of 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP to 1.04, 0.1 and 0.04 nmol mg $^{-1}$ , respectively (*fig. 1*). These results



**Figure 1.** Specificity of 8-azido ATP binding to potato tuber (PM) and rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria (0.5 mg 100  $\mu$ l $^{-1}$ ) were treated with GTP (1 mM), CAT (10  $\mu$ M), both or neither for 10 min and then incubated for 10 min with 100  $\mu$ M of 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP at pH 6.8.

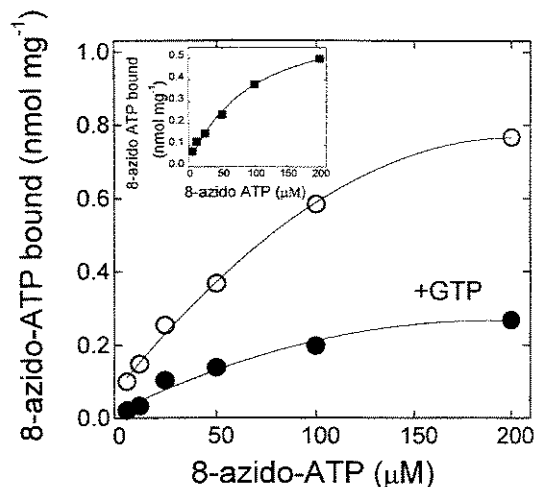
indicate that 93% of the total accumulation of 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP by RLM resulted from binding and translocation of the adenine nucleotide analog through the AAC. GTP displaced 10% of the total accumulation of 8-azido ATP indicating that intact RLM does not have a significant binding site for this nucleotide. Unspecific binding of 8-azido ATP (obtained in the presence of CAT and GTP) accounted to only 3.8% of the total adenine nucleotide analog accumulation by RLM.

Total 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP accumulated by potato tuber mitochondria (0.6 nmol mg $^{-1}$ ) showed a 50% decrease by pre-incubation with CAT (0.28 nmol mg $^{-1}$ ). It was also observed that GTP caused a decrease in the total accumulation of 8-azido ATP up to 0.18 nmol mg $^{-1}$  and to 0.1 nmol mg $^{-1}$  in the presence of CAT (*fig. 1*). These results show that the inhibition of 8-azido ATP accumulation by GTP was about 70% and that CAT did not alter this level of inhibition. These findings clearly indicate that potato tuber mitochondria have an important GTP-sensitive adenine nucleotide binding site, which is distinct from the AAC. This binding site is not apparent in RLM and resembles that presented by brown adipose tissue mitochondria (Nicholls, 1976; Rafael and Heldt, 1976).

### GTP-sensitive binding of 8-azido ATP to potato tuber mitochondria

The 8-azido [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP binding curves obtained with potato mitochondria are shown in figure 2.



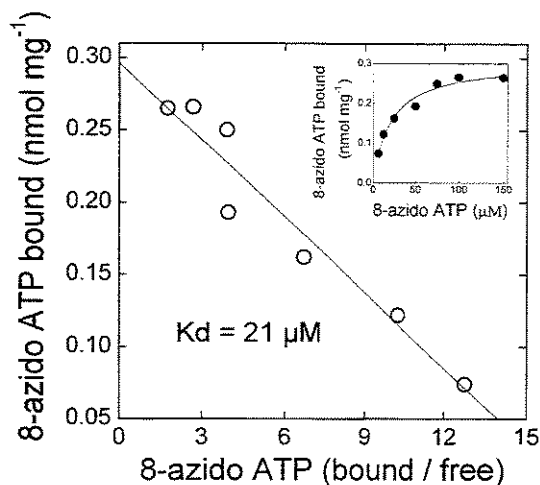


**Figure 2.** Concentration dependence of 8-azido ATP uptake and binding to intact potato tuber mitochondria: effect of GTP. Potato tuber mitochondria ( $0.5 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ) were incubated for 20 min with 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP in the concentration range of 6.25 to 200  $\mu\text{M}$ , at pH 6.0. (○) no further addition; (●) 2 mM GTP. The inset shows a plot of the difference between total binding and binding in the presence of GTP.

Our data indicate that GTP-sensitive binding of 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP does not reach saturation in the concentration range from 6.25 to 200  $\mu\text{M}$  (inset *fig. 2*). This behaviour could be accounted for by an increased activity of the AAC at higher concentrations of the analog. To further evaluate the kinetic parameters of 8-azido ATP binding to GTP-removable binding sites, the concentration dependence of GTP-sensitive 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP binding to PM was carried out in the presence of CAT, in order to abolish any exchange with endogenous adenine nucleotides. In these conditions, a saturation curve of 8-azido ATP binding was obtained with a maximum of  $0.29 \text{ nmol mg}^{-1}$  (inset *fig. 3*), and the linear Scatchard plot indicated the presence of a single class of binding sites for 8-azido ATP, GTP-sensitive, with a  $K_d$  of 21  $\mu\text{M}$  (*fig. 3*).

#### pH dependence of 8-azido ATP binding to potato tuber mitochondria

It is well established that binding of purine nucleotides to UCP in mitochondria of brown adipose tissue has an optimum at acidic pH. The earlier studies of Nicholls (1974) showed that, at acidic pH, the control of proton conductance of BATM by purine nucleoside di- and triphosphates was favored and this effect was due to a higher affinity of the nucleotide binding site

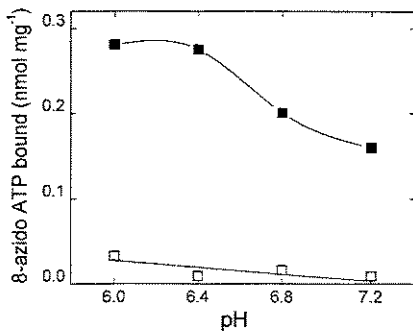


**Figure 3.** Evaluation of GTP-removable binding (Scatchard plot) of 8-azido ATP into carboxyatractyloside-pretreated potato tuber mitochondria. Experiment carried out as described in figure 2, except that mitochondria were preincubated with CAT (20  $\mu\text{M}$ ) to prevent binding and translocation of 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP through the AAC. The inset shows a plot of the difference between total binding and binding in the presence of GTP.

for GTP at acidic pH (Nicholls, 1976). Further studies with incorporated UCP have confirmed these observations showing that  $\text{H}^+$  transport through UCP was inhibited by purine nucleotides in a pH dependent manner (Klingenberg and Winkler, 1985). The effect of pH on GTP-sensitive binding of 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP to potato mitochondria has been tested in CAT-pre-treated mitochondria. GTP-removable binding of 8-azido ATP to PM increased with  $\text{H}^+$  ion concentration while RLM did not present any significant 8-azido ATP binding in the same pH range (*fig. 4*).

#### Covalent incorporation of 8-azido-ATP to mitochondria

Photoaffinity labelling of potato tuber mitochondria with 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP resulted in the incorporation of the probe into a protein with an apparent  $M_r$  32,000 that was largely inhibited by preincubation with GTP. Also a second protein with an apparent  $M_r$  30,000 was labelled with the probe, and this incorporation was sensitive to CAT (*fig. 5*). Liver mitochondria do not contain UCP (Nicholls and Locke, 1984) and no protein of 32,000  $M_r$  was labelled with the probe, under the same experimental conditions. Nevertheless, a protein with an apparent  $M_r$  30,000 was photoincorporated

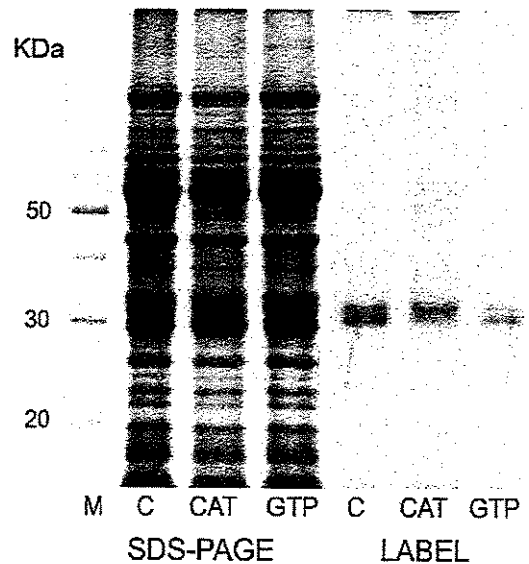


**Figure 4.** pH dependence of the GTP-removable adenine nucleotide binding to potato mitochondria. (■) potato tuber mitochondria; (□) rat liver mitochondria. Mitochondrial suspensions ( $0.5 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ) were treated with CAT ( $20 \mu\text{M}$ ) or CAT and GTP ( $2 \text{ mM}$ ) for 10 min and then incubated for 20 min with  $200 \mu\text{M}$  8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP, at the pH range indicated. Values plotted represent the difference between binding in the presence of CAT and binding in the presence of CAT and GTP.

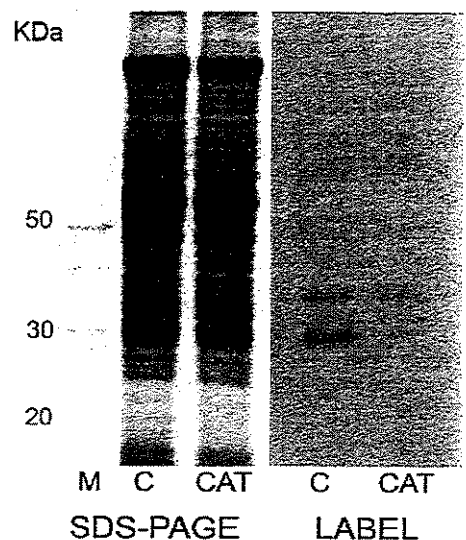
rated in RLM, in a CAT-sensitive manner (*fig. 6*) and, the presence of GTP ( $1 \text{ mM}$ ) had no influence in those incorporation (not shown). We have also carried out controls with BATM isolated from cold adapted hamsters and the observed pattern of 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP labelling resembled that showed by potato tuber mitochondria, but not the one presented by RLM. As already described by Heaton *et al.* (1978), two proteins were labelled in BATM, being the incorporation of the  $30,000 \text{ Da}$  prevented by CAT and the incorporation of the  $32,000 \text{ Da}$  prevented by GTP (*fig. 7*). These results corroborate the data of binding of 8-azido ATP to PM and showed that the GTP-sensitive adenine nucleotide binding site of PM is distinct from the CAT-sensitive adenine nucleotide binding site.

## DISCUSSION

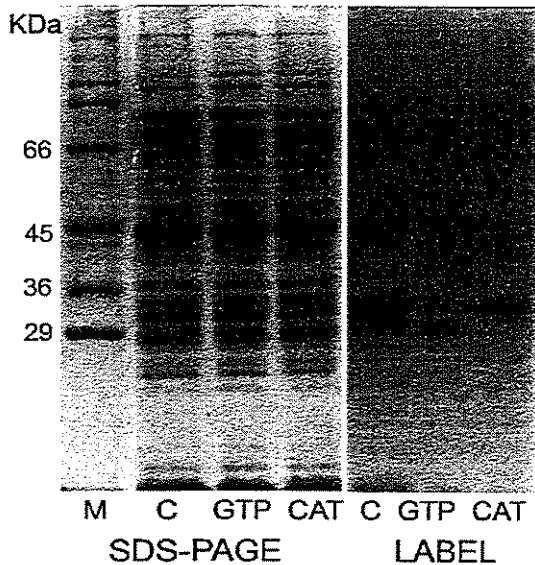
This paper uses the photoaffinity label 8-azido ATP to show that potato tuber mitochondria have an uncoupling protein with similar properties of those presented by brown adipose tissue mitochondria. Photoaffinity labelling of potato mitochondria with 8-azido ATP showed incorporation of the probe into a protein with an apparent  $M_r 32,000$ , and a second one with an apparent  $M_r 30,000$ . These proteins would correspond to PUMP and AAC, since labelling was prevented by GTP or CAT, respectively. The support for these conclusions comes from the results obtained with other



**Figure 5.** Covalent incorporation of 8-azido ATP into potato tuber mitochondria. Mitochondrial suspensions ( $0.5 \text{ mg } 200 \mu\text{l}^{-1}$ ) were irradiated in the presence of  $200 \mu\text{M}$  8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP at pH 6.0, as described in Methods. GTP ( $1 \text{ mM}$ ) or CAT ( $20 \mu\text{M}$ ) were present where indicated. SDS-PAGE, gel electrophoresis, with  $20 \mu\text{g}$  of protein in each lane; Label, corresponding autoradiography; M, molecular mass marker.



**Figure 6.** Covalent incorporation of 8-azido ATP into rat liver mitochondria. Mitochondrial suspensions ( $0.5 \text{ mg } 200 \mu\text{l}^{-1}$ ) were irradiated in the presence of  $200 \mu\text{M}$  8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP at pH 6.0. CAT ( $10 \mu\text{M}$ ) was added where indicated. SDS-PAGE, gel electrophoresis, with  $50 \mu\text{g}$  of protein in each lane; Label, corresponding autoradiography; M, molecular mass marker.



**Figure 7.** Covalent incorporation of 8-azido ATP into brown adipose tissue mitochondria. Mitochondrial suspensions ( $0.5 \text{ mg } 200 \mu\text{l}^{-1}$ ) were irradiated in the presence of  $200 \mu\text{M}$  8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP at pH 6.0. GTP ( $1 \text{ mM}$ ) or CAT ( $10 \mu\text{M}$ ) were present where indicated. SDS-PAGE, gel electrophoresis, with  $20 \mu\text{g}$  of protein in each lane; Label, corresponding autoradiography; M, molecular mass marker.

types of mitochondria, under comparable experimental conditions: similar results were obtained with BATM that contain UCP, but not with RLM that is devoid of this protein.

Additional evidence for the existence of an uncoupling protein in potato tuber mitochondria, with adenine nucleotide binding properties similar to UCP, comes from the way nucleotides compete among each other during the process of accumulation into the mitochondria. Whereas accumulation of 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP to RLM was not displaced by GTP, a significant inhibition in this process, induced in the presence of GTP, was observed in potato tuber mitochondria. This displacement has not changed in the presence of CAT, indicating that PM have a specific GTP-removable binding site, not apparent in RLM. The relatively smaller accumulation of 8-azido ATP in PM compared with that of RLM could have resulted from the smaller pool of adenine nucleotides occurring in these mitochondria (for review, see Douce, 1985). Kinetics of the binding of 8-azido ATP to GTP-removable binding sites of potato mitochondria could be properly evaluated as the activity of the AAC was inhibited by CAT. The high observed value of  $K_d$  ( $21 \mu\text{M}$ ) is in agreement with previous results which showed that inhibi-

tion of proton transport by liposome-incorporated PUMP was attained at high concentrations of ATP (Vercesi *et al.*, 1995).

The pH dependence of the GTP-sensitive adenine nucleotide binding constitute additional similarity between the uncoupling protein of potato mitochondria and the one present in BATM.

Although the thermogenic function for the uncoupling protein detected in potato tuber mitochondria remains to be elucidated, the present results show that many of the characteristics of PUMP resemble those presented by UCP of BATM. These observations address to the need of an in-depth revision of the proposed mechanism on the evolution of this protein in nature.

## METHODS

**Preparation of mitochondria.** Potato mitochondria were isolated according to Martins and Vercesi (1985). Rat liver and brown adipose tissue mitochondria from cold-adapted hamsters were isolated according to Cannon and Lindberg (1979). The mitochondrial protein concentration was determined using the Biuret assay (Gornal *et al.*, 1949) with bovine serum albumin as standard.

**Binding of 8-azido ATP to mitochondrial proteins.** Potato tuber or rat liver mitochondria ( $0.5 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ) were incubated under low light conditions, at room temperature, in a reaction medium containing  $250 \text{ mM}$  sucrose,  $1 \text{ mM}$  EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and 8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP with a specific activity of  $5 \times 10^4 \text{ dpm nmol}^{-1}$ . The buffers used to establish the pH were  $10 \text{ mM}$  MES (pH 6.0 and 6.4) and  $10 \text{ mM}$  Hepes (pH 6.8 and 7.2). The concentration of 8-azido ATP and other additions are specified in the legends of the figures. After the indicated times of incubation the suspension was centrifuged for 10 min in a Eppendorf Centrifuge, and washed once with buffer medium (reaction medium, without azido nucleotide). Washing was important to eliminate unspecific binding. Pellet was used for determination of radioactivity by Cerenkov counting.

**Photoaffinity labelling of mitochondrial proteins.** Mitochondria ( $0.5 \text{ mg } 200 \mu\text{l}^{-1}$ ) were incubated for 20 min, at room temperature, under low light, as described for binding. After incubation, samples were placed on a shallow plastic tray, 2 cm from a Mineralight Multiband lamp, model UV SL-25, and photolyzed at the short wavelength setting for 2 min. The irradiated samples were washed with  $4 \text{ mM}$  ATP, to displace noncovalently bound azido nucleotides, and concentrated by centrifugation.

**Gel electrophoresis of photolabelled mitochondria.** Concentrated samples of photolabelled mitochondria were incu-

bated in a boiling water bath for 2 min in a solution containing 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 10% glycerol and 0.0025% bromophenol blue. Gel electrophoresis was performed according to Laemmli (1970), using a 10% acrylamide gradient slab gel with a 3% acrylamide stacking gel. The initial current of 20 mA was increased to 25 mA as soon as samples reached the running gel. The gels were stained for 30 min in methanol/acetic acid/water (5/1/5, v/v/v) containing 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R and destained in acetic acid/methanol/water (3/2/35, v/v/v). Following electrophoresis, the stained gel was dried and subjected to autoradiograph at  $-70^{\circ}\text{C}$  using X-Omat AR film (Kodak).

**Acknowledgments.** We thank A.C.N. Magalhães and L. Pereira-da-Silva for helpful comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

(Received November 8, 1996; accepted February 3, 1997)

## REFERENCES

- Aquila H., Link T. A. and Klingenberg M., 1985. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier: analysis of sequence homologies and folding of the protein in the membrane. *EMBO J.*, **4**, 2369-2376.
- Aquila H., Link T. A. and Klingenberg M., 1987. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Lett.*, **212**, 1-9.
- Cannon B., and Lindberg O., 1979. Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. *Methods Enzymol.*, **55**, 65-78.
- Czarnecki J. J., 1984. Tautomerism of 2-azidoadenine nucleotides, effects on enzyme kinetics and photoaffinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta*, **800**, 41-51.
- Dalbon P., Brandolin G., Boulay F., Hoppe J. and Vignais P. V., 1988. Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] adenosine diphosphate. *Biochemistry*, **27**, 5141-5149.
- Douce R., 1985. *Mitochondria in higher plants: structure, function, and biogenesis*. Academic Press, London, 327 p.
- Gornal A. G., Bardwill C. I. and David M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-757.
- Heaton G. M., Wagenvoord R. J., Kemp A. Jr. and Nicholls D. G., 1978. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.*, **82**, 515-521.
- Klingenberg M., 1990. Mechanism and evolution of the uncoupling protein brown adipose tissue. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 108-112.
- Klingenberg M. and Winkler E., 1985. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven  $\text{H}^+$  translocator. *EMBO J.*, **4**, 3087-3092.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lin C. S. and Klingenberg M., 1982. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. *Biochemistry*, **21**, 2950-2956.
- Martins I. S. and Penefsky H.S., 1994. Covalent modification of catalytic sites on membrane-bound beef heart mitochondrial ATPase by 2-azido-adenine nucleotides. *Eur. J. Biochem.*, **224**, 1057-1065.
- Martins I. S. and Vercesi A. E., 1985. Some characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 943-948.
- Nicholls D. G., 1974. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of the inner membrane. *Eur. J. Biochem.*, **49**, 573-583.
- Nicholls D. G., 1976. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 223-228.
- Nicholls D. G., 1977. The effective proton conductances of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue: dependency on proton electrochemical gradient. *Eur. J. Biochem.*, **77**, 349-356.
- Nicholls D. G. and Locke R. M., 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.*, **64**, 1-64.
- Nicholls D. G. and Rial E., 1984. Brown fat mitochondria. *TIBS*, **9**, 489-491.
- Rafael J. and Heldt H. W., 1976. Binding of guanine nucleotides to the outer surface of the inner membrane of guinea pig brown fat mitochondria in correlation with the thermogenic activity of the tissue. *FEBS Lett.*, **63**, 304-308.
- Vercesi A. E., Martins I. S., Silva M. A. P., Leite H. M. F., Cuccovia I. and Chaimovich H., 1995. PUMPing plants. *Nature*, **375**, 24.
- Vignais P. V., Vignais P. M. and Defaye G., 1973. Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin). *Biochemistry*, **12**, 1508-1518.
- Weidemann M. J., Erdelt H. and Klingenberg M., 1970. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Identification of carrier sites. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 313-335.
- Winkler E. and Klingenberg M., 1992. Photoaffinity labeling of the nucleotide-binding site of the uncoupling protein from hamster brown adipose tissue. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 295-304.

**FATTY ACID-MEDIATED UNCOUPLING OF POTATO TUBER MITOCHONDRIA**Elzira E. Saviani and Ione S. Martins<sup>1</sup>

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil

Received November 21, 1997

**Summary:** The present work examined whether the ATP/ADP carrier, other than the plant uncoupling mitochondrial protein, participates in free fatty acid-mediated uncoupling of potato tuber mitochondria. The basal respiration rate of succinate-energized mitochondria was stimulated by a low concentration of palmitate (20  $\mu$ M). This uncoupling was reversed by 10  $\mu$ M carboxyatractyloside and by the subsequent addition of 0.1% bovine serum albumin. The decrease in membrane potential caused by palmitate was suppressed by carboxyatractyloside (1  $\mu$ M) and, to a lesser degree, by bongkrekate (20  $\mu$ M). GTP could also reverse this decrease via a carboxyatractyloside-independent mechanism. These results indicate that the ATP/ADP carrier, along with the plant uncoupling mitochondrial protein, participates in the protonophoric action of palmitate in potato tuber mitochondria.

**Key words:** FFA-mediated uncoupling; ATP/ADP mitochondrial carrier; plant uncoupling mitochondrial protein; potato tuber mitochondria.

**Introduction**

Free fatty acids (FFA) have long been known to be natural uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria from a variety of mammalian tissues (1). The uncoupling action of FFA is explained by their ability to increase the proton permeability of the inner mitochondrial membrane (2). However, the mechanism of uncoupling by FFA differs from classical protonophores in that only their undissociated (protonated) forms readily transverse the phospholipid bilayer while the dissociated (anionic) forms do not penetrate the membrane. To explain the FFA-mediated uncoupling of mitochondria,

---

Abbreviations: AAC, ATP/ADP mitochondrial carrier; BATM, brown adipose tissue mitochondria; BKA, bongkrekate; BSA, bovine serum albumin; CAT, carboxyatractyloside; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; FFA, free fatty acid; PM, potato mitochondria; PUMP, plant uncoupling mitochondrial protein;  $\Delta\psi$ , transmembrane electrical potential; UCP, uncoupling protein.

<sup>1</sup>Corresponding author (fax 55-19-239-3124)

Skulachev's group suggested the existence of proteins in the inner mitochondrial membrane that facilitate the transport of anionic fatty acid species (3). Thus, the high uncoupling effect of FFA in brown adipose tissue mitochondria (BATM, 4-6) could be explained by their action on uncoupling protein (UCP) that is highly expressed in this tissue. The FFA-mediated uncoupling seen in mammalian mitochondria in which UCP is absent was proposed to be catalysed by ATP/ADP carrier (7), that is very similar to UCP in aminoacid sequence, domain structure, and other properties (8). This hypothesis was based on the observation that carboxyatractyloside (CAT), the most potent and specific inhibitor of the ATP/ADP carrier (AAC), prevented the FFA-induced increase in  $H^+$  permeability in the inner mitochondrial membrane (9).

Although UCP has been considered to be a late evolutionary acquisition of mammals (10), we have recently shown that plant mitochondria contain a protein with similar activity and nucleotide-binding properties (11, 12). One of the first observations that lead us to propose the existence of this protein in plant mitochondria was the important recoupling effect of BSA, a well known fatty acid-binding protein, on the basal rate of  $O_2$  consumption by isolated potato tuber mitochondria (11). However, the expression of PUMP in potato mitochondria is not as high as that of UCP in BATM, as shown by photoaffinity labeling with 8-azido-ATP (12). To determine whether the recoupling effect of BSA was attributable solely to its ability to prevent FFA cycling through PUMP or whether the AAC carrier was also involved, we have examined the effect of AAC- and PUMP-ligands in reversing the uncoupling action of FFA in isolated potato tuber mitochondria.

### Materials and Methods

**Preparation of mitochondria.** Potato tuber mitochondria were isolated according to Martins and Vercesi (13). The mitochondrial protein concentration was determined using the Biuret assay (14) with bovine serum albumin as standard.

**Respiratory activity.**  $O_2$  consumption by isolated mitochondria was measured using a Clark oxygen electrode (Yellow Springs Instruments Co.). The output of the oxygen electrode was registered with a Linear recorder (model 291). The reaction medium contained 250 mM sucrose, 10 mM Hepes (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazine-ethanesulfonic acid), pH 7.2, 10 mM succinate, 5  $\mu$ M rotenone, 1 mM potassium-phosphate and potato tuber mitochondria (0.5 mg.ml<sup>-1</sup>). Other additions are specified in the table legend.

**Transmembrane electrical potential measurements.** Membrane potential was measured using safranin as an optical probe (15). Potato tuber mitochondria ( $0.6\text{--}1.0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) were incubated in a reaction medium containing 250 mM sucrose; 10 mM Hepes, pH 7.2, 5  $\mu\text{M}$  rotenone, 0.5 mM sodium phosphate, 20 mM succinate and 10  $\mu\text{M}$  safranin at room temperature. Other additions are specified in the figure legends. The changes in absorbance at 511-533 nm were recorded using a double beam spectrophotometer (DW 2000, SLM Instruments).

### Results and Discussion

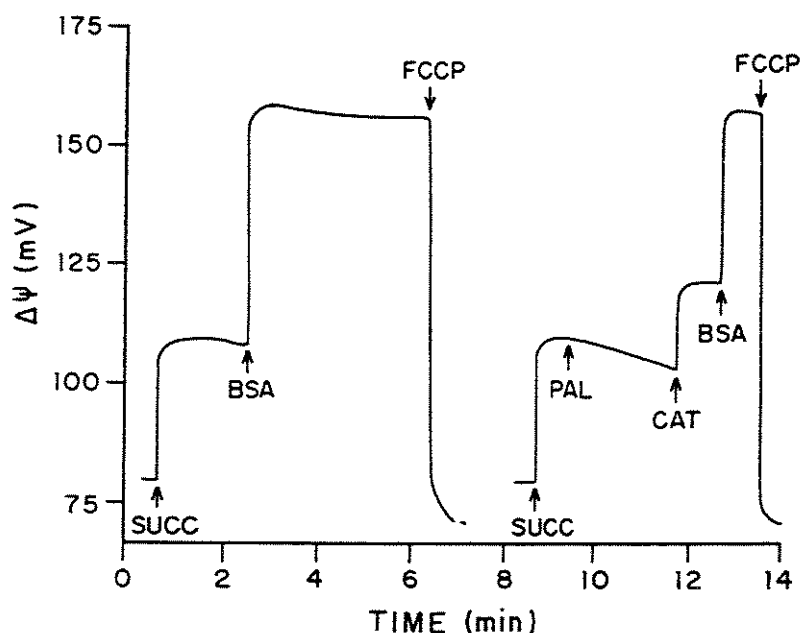
Table 1 shows that the basal rate of  $\text{O}_2$  consumption by succinate-energized potato tuber mitochondria (PM) decreased markedly following the addition of BSA (exp. 1). At a concentration of 20  $\mu\text{M}$ , palmitate stimulated the respiration rate (exp. 2) while the subsequent addition of BSA decreased the rate of  $\text{O}_2$  consumption to the level seen in the first experiment. The palmitate-induced increase in respiration was also significantly blocked by CAT, a potent inhibitor of AAC (exp. 3), although this inhibition was not as

**TABLE 1.  $\text{O}_2$  consumption rates by potato tuber mitochondria: effect of palmitate, CAT and BSA.** Potato tuber mitochondria were energized with succinate, as described in the Materials and Methods.  $\text{O}_2$  consumption was measured using a Clark oxygen electrode. After determining the basal  $\text{O}_2$  consumption, BSA (0.1%), CAT (20  $\mu\text{M}$ ), or palmitate (20  $\mu\text{M}$ ) was added. The values represent the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

<u>Experiment</u>	<u>Additions</u>	<u>Respiration</u> ( $\text{natomO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
1	-	197 $\pm$ 5.7
	+BSA	127 $\pm$ 5.8
2	-	197 $\pm$ 5.7
	+ Palmitate	228 $\pm$ 6.5
	+ BSA	110 $\pm$ 5.6
3	-	197 $\pm$ 5.7
	+Palmitate	223 $\pm$ 8.7
	+CAT	161 $\pm$ 3.4
4	-	197 $\pm$ 5.7
	+CAT	151 $\pm$ 11.5
	+Palmitate	188 $\pm$ 15.8

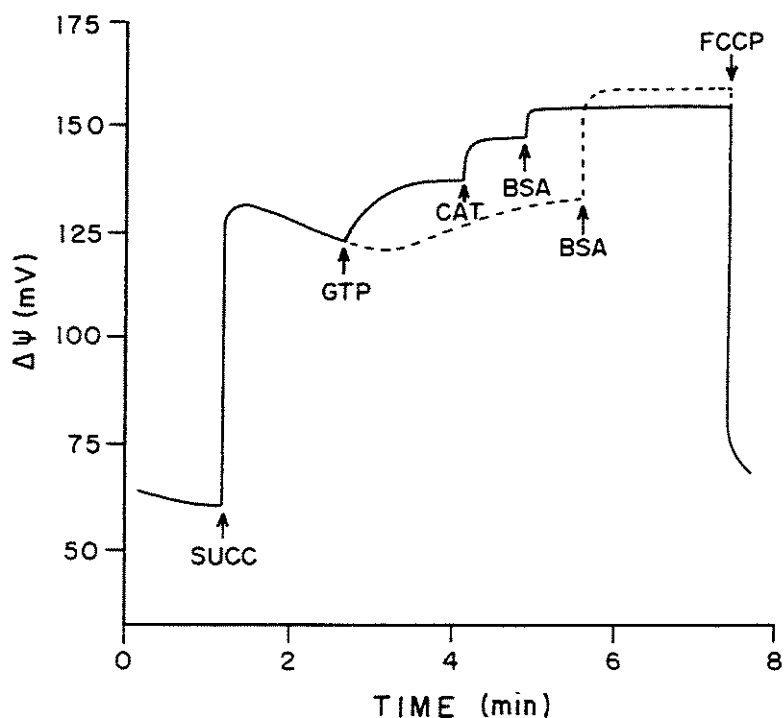
marked as that induced by BSA. The inhibition of  $O_2$  consumption by CAT did not interfere with the uncoupling action of palmitate (exp. 4). These results show that maximal rates of  $O_2$  consumption by succinate-energized PM were attained in the presence of palmitate and that the addition of BSA decreased this stimulated rate of  $O_2$  consumption by about 60%. The recoupling response evoked by BSA can be reproduced out by CAT suggesting that AAC may participate in the palmitate-mediated uncoupling of PM. However, the higher rate of  $O_2$  consumption obtained with CAT compared to that observed with BSA suggests the presence of another site for uncoupling, which would involve PUMP, as previously proposed (11).

The suggestion that AAC other than PUMP participates in the uncoupling action of FFA in PM was confirmed in experiments in which the mitochondrial membrane potential was measured. Succinate-energized mitochondria developed a low  $\Delta\psi$  that decreased further upon the addition of palmitate (Fig. 1). The low  $\Delta\psi$  induced by palmitate could be partially reversed by CAT and the subsequent addition of BSA completely restored  $\Delta\psi$ . This  $\Delta\psi$  was abolished by FCCP, an artificial protonophore (Fig. 1). The palmitate-induced decrease in  $\Delta\psi$  could be reversed by GTP (Fig. 2), a



**FIGURE 1.** Effect of BSA and CAT on palmitate-dissipated  $\Delta\psi$  in potato tuber mitochondria. Potato mitochondria ( $1.0 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) were energized with succinate, as described in the Materials and Methods. Palmitate (PAL,  $10 \mu\text{M}$ ), CAT ( $1 \mu\text{M}$ ), BSA (0.1%) and FCCP ( $5 \mu\text{M}$ ) were added as indicated. The changes in transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ) were monitored with the optical probe safranin ( $10 \mu\text{M}$ ).



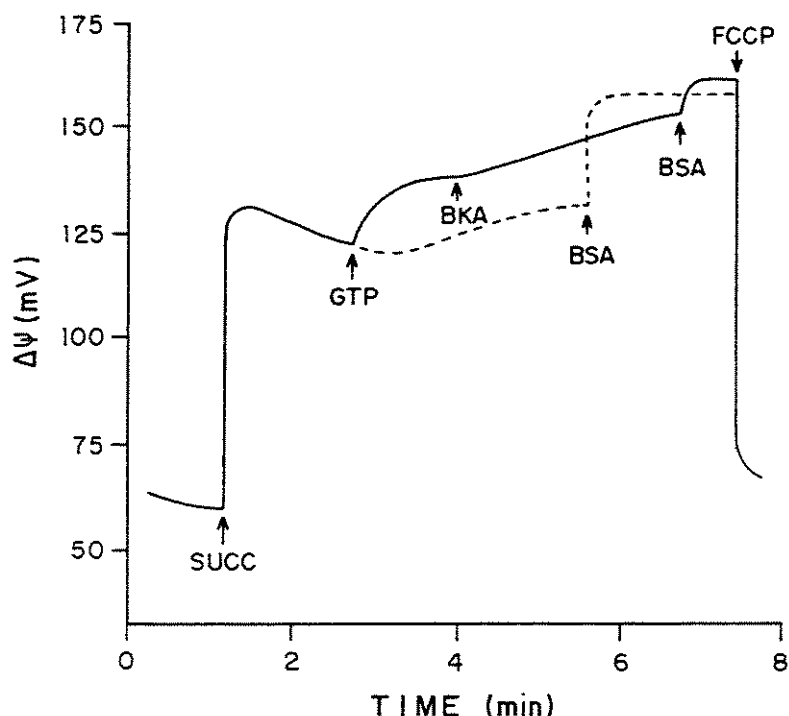


**FIGURE 2. Effect of GTP and CAT on palmitate-dissipated  $\Delta\psi$  of potato tuber mitochondria.** Potato mitochondria ( $0.6 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) were energized with succinate, as described in the Materials and Methods, in the presence of palmitate ( $10 \mu\text{M}$ ). GTP ( $1 \text{ mM}$ ), CAT ( $1 \mu\text{M}$ ), BSA ( $0.2 \%$ ) and FCCP ( $5 \mu\text{M}$ ) were added as indicated. The dotted line represents the response without GTP and CAT. The changes in transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ) were monitored with the optical probe safranin ( $10 \mu\text{M}$ ).

known PUMP ligand (12), and this recovery further enhanced by CAT. The latter observation suggests that these two compounds act at different sites. The GTP-mediated recovery in  $\Delta\psi$ , could also be enhanced by BKA, another AAC inhibitor (Fig. 3).

Together, the present results provide evidence that the ATP/ADP mitochondrial carrier, along with PUMP, participates in the uncoupling effect of FFA in potato tuber mitochondria. This was confirmed by the observation that inhibitors of both carriers partly reversed the increase in respiration rate and the dissipation of  $\Delta\psi$  evoked by palmitate.

Recently, glutamate/aspartate (16, 17) and dicarboxylate (18) carriers, have been proposed to contribute to the protonophoric action of long chain FFA in mammalian non-brown fat mitochondria. The observation that BSA can further reverse the



**FIGURE 3.** Effect of GTP and BKA on palmitate-dissipated  $\Delta\psi$  of potato tuber mitochondria. Potato mitochondria ( $0.6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) were energized with succinate, as described in the Materials and Methods, in the presence of palmitate ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ). GTP ( $1 \text{ mM}$ ), BKA ( $20 \text{ }\mu\text{M}$ ), BSA ( $0.2 \text{ }\%$ ) and FCCP ( $5 \text{ }\mu\text{M}$ ) were added as indicated. The dotted line represents the response without GTP and BKA. The changes in transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ) were monitored with the optical probe safranin ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ).

palmitate-induced uncoupling in PM after treatment with GTP and CAT (Fig. 3) points to the possibility that di- or tricarboxylate carriers may also be involved in FFA uncoupling in these mitochondria.

**Acknowledgement.** This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

### References

1. Pressman, B. C., and Lardy, H. A. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 21, 458-466.
2. Wojtczak, L., and Schonfeld, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1183, 41-57.
3. Skulachev, V. P. (1988) *Membrane Bioenergetics*. Springer-Verlag, Berlin.
4. Locke, R. M., Rial, E., and Nicholls, D. G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 129, 381-387.
5. Locke, R. M., Rial, E., Scott, I. D., and Nicholls, D. G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 129, 373-380.
6. Rial, E., Poustie, A., and Nicholls, D. G. (1983) *Eur. J. Biochem.* 137, 197-203.

7. Andreyev, A. Yu., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., Tsofina, L. M., Volkov, N. I., and Vygodina, T. V. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 585-592.
8. Aquila, H., Link, T. A., and Klingenberg, M. (1985) *EMBO J.* 4, 2369-2376.
9. Andreyev, A. Yu., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., and Volkov, N. I. (1988) *FEBS Lett.* 226, 265-269.
10. Klingenberg, M. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 108-112.
11. Vercesi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A. P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I. and Chaimovich, H. (1995) *Nature* 375, 24.
12. Saviani, E. E., Silva Jr., A., and Martins, I. S. (1997) *Plant Physiol. Biochem.* 35, 701-706.
13. Martins, I. S., and Vercesi, A. E. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 943-948.
14. Gornal, A. G., Bardwill, C. I., and David, M. M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751-757.
15. Akerman, K. E. O., and Wikstrom, M. K. F. (1976) *FEBS Lett.* 68, 191-197.
16. Bodrova, M. E., Markova, O. V., Mokhova, E. N., and Samartsev, V. N. (1995) *Biochemistry (Moscow)* 60, 1027-1033.
17. Samartsev, V. N., Smirnov, A. V., Zeldi, I. P., Markova, O. V., Mokhova, E. N., and Skulachev, V. P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1319: 251-257.
18. Wieckowski, M. R., and Wojtczak, L. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 414-417.



## Role of $F_1F_0$ -ATP synthase and uncoupling protein in mitochondrial respiratory uncoupling of ripened avocado fruits

Elzira E. Saviani, Arnaldo da Silva Jr., Ione S. Martins \*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil.

\* Author to whom correspondence should be addressed (fax 55-19-289-3124; e-mail ionesm@obelix.unicamp.br)

(Received August 14, 1997; accepted April 22, 1998)

**Abstract** – The present study was carried out to determine the contribution of the  $F_1F_0$ -ATP synthase, the ATP/ADP carrier (AAC) and a putative plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) to the increased respiratory activity of ripened avocado fruits. We have compared the  $\beta$ -subunit content of  $F_1$  and AAC, determined by photoaffinity labelling with 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , and the transmembrane electrical potential difference ( $\Delta\Psi$ ), established by substrate oxidation, in mitochondria isolated from pre- and postclimacteric avocado fruits. The  $\beta$ -subunit content of  $F_1$  decreased, while that of AAC did not change, with ripening. The  $\Delta\Psi$  established by succinate oxidation of postclimacteric avocado mitochondria was very low and could be substantially increased by oligomycin, which inhibits  $\text{H}^+$  transport through  $F_0$ , and by the purine nucleotides GTP or ATP, which are known to inhibit  $\text{H}^+$  transport through the uncoupling protein present in brown adipose tissue and potato tuber mitochondria. Oligomycin and GTP had no effect on the  $\Delta\Psi$  of preclimacteric avocado mitochondria. Carboxyatractyloside and bongkrekic acid, specific inhibitors of AAC, had no effect on the  $\Delta\Psi$  of pre- or postclimacteric avocado mitochondria. These results suggest that a PUMP-like protein may exist in mitochondria of postclimacteric avocado fruits, and that this protein and the  $F_0$  from  $\beta$ -detached ATP synthase, but not the AAC, could provide pathways for energy dissipation in ripened avocado fruit mitochondria. © Elsevier, Paris

**Avocado fruit ripening / alternative oxidase / mitochondrial ATP synthase / plant uncoupling mitochondrial protein / photoaffinity labelling / ATP/ADP carrier / mitochondrial  $\text{H}^+$  permeability**

AAC, ATP/ADP mitochondrial carrier / BATM, brown adipose tissue mitochondria / BKA, bongkrekic acid / BSA, bovine serum albumin / CAT, carboxyatractyloside / EGTA, ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)  $\text{N,N,N',N'}$ -tetraacetic acid / FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone / FFA, free fatty acids / Hcpes,  $\text{N}$ -[2-hydroxyethyl]piperazine- $\text{N}'$ -[2-ethanesulfonic acid] / oligo, oligomycin / OSCP, oligomycin sensitivity-conferring protein / PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis / PUMP, plant uncoupling mitochondrial protein / SDS, sodium dodecyl sulfate /  $\Delta\Psi$ , transmembrane electrical potential difference / Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane / UCP, uncoupling protein

### 1. INTRODUCTION

Ripening represents a genetically determined process of tissue differentiation that involves complex biochemical and physiological changes leading to the development of soft and edible fruits (for review, see [5, 8]). The ripening of avocado and other climacteric-type fruits is characterized by a dramatic burst in respiratory activity [4], which suggests an alteration in mitochondrial respiration.

In mitochondrial membranes of most plant species, the electron flux from reduced ubiquinone is partitioned between cytochrome oxidase and the cyanide- and antimycin-resistant alternative oxidase. When elec-

trons from the ubiquinone pool flow through the alternative pathway, the energy is not conserved in the form of an electrochemical  $\text{H}^+$  gradient. Consequently, no ATP is formed and the free energy released is lost as heat (for review, see [17]).

Earlier studies on ripening attributed respiratory climacteric to the engagement of the alternative oxidase, which leads to a marked increase in mitochondrial respiratory activity because of the nonelectrogenic nature of this pathway [31, 32]. However, further studies by this same group have shown that there is no obligatory participation of the alternative pathway in the climacteric and ripening [33]. As yet, there is no plausible explanation for the metabolic connections between the

climacteric respiratory increase and mitochondrial activity in the ripening process. An increased proton leakage at the mitochondrial membrane could, at least in part, explain the climacteric respiratory increase in the ripening process since, according to chemiosmotic theory, the velocity of electron flow and consequently the rate of mitochondrial  $O_2$  consumption are controlled by the electrochemical  $H^+$  gradient. One possible uncoupling mechanism could be the activation of  $H^+$  transport through specific proteins of the inner mitochondrial membrane. Some mitochondrial membrane proteins that have been shown to function as  $H^+$  carriers are the uncoupling protein ATP/ADP carrier (AAC) and the  $F_0$  portion of the ATP synthase complex.

The uncoupling protein (UCP) of brown adipose tissue mitochondria (BATM) is the key element for non-shivering thermogenesis in mammals (for review, see [12, 22]). Proton transport through this 32 kDa membrane protein dissipates as heat the proton electrochemical potential gradient generated by substrate-oxidation-driven electron transport (for review, see [21]).  $H^+$  transport by UCP is inhibited by purine nucleotides and activated by fatty acids [13, 20, 27]. Until recently, this uncoupling protein was believed to be exclusive to BATM. However, a 32 kDa protein with similar structural and functional properties has been found in potato tuber mitochondria [36]. This protein, known as plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP), is able to transport  $H^+$  when incorporated into liposomes and can be detected by photo-affinity labelling of potato mitochondria with azido-ATP. The binding of azido-ATP to PUMP is GTP-sensitive and pH-dependent [28].

The ability of free fatty acids (FFA) to stimulate  $H^+$  transport through UCP means these compounds have a high uncoupling effect on BATM [13, 27]. However, FFA have long been known as natural uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation in a variety of mammalian tissues [26]. In mitochondria where there is no UCP, the increased  $H^+$  permeability of the inner membrane induced by FFA was shown to be inhibited by carboxyatractyloside (CAT), the most potent and specific inhibitor of the AAC [11]. This observation led Skulachev's group to propose that AAC, in addition to its main function (i.e. the translocation of adenine nucleotide anions), can also participate in FFA-mediated uncoupling in tissues other than brown fat [2]. Two mechanisms have been proposed to explain the FFA-mediated increase in proton permeability of the inner mitochondrial mem-

brane: (a) fatty acids allosterically stimulate the transfer of  $H^+$  by UCP [38] or AAC [6] and, (b) the fatty acid anion is translocated by these proteins while the protonated form freely crosses the membrane bilayer [9, 30].

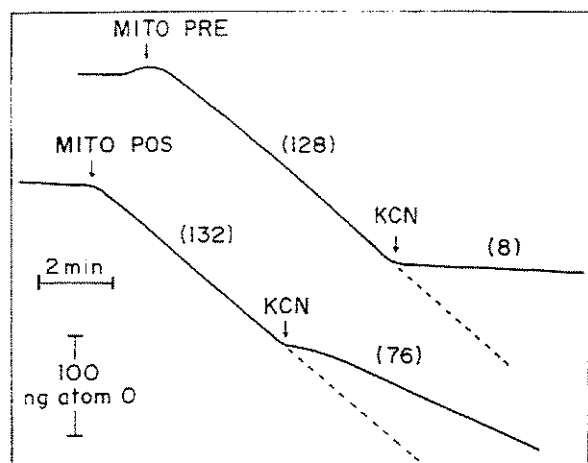
When energy dissipating mechanisms are not operative, the mitochondrial ATP synthase complex can use the electrochemical  $H^+$  gradient derived from the operation of the respiratory chain to drive ATP synthesis. This complex consists of two main parts, the hydrophilic  $F_1$  and the integral membrane portion  $F_0$ . The  $F_1$  portion, which contains the nucleotide and phosphate binding sites, is composed of five types of subunits in a stoichiometry of  $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$ .  $F_0$  is concerned with  $H^+$  translocation and contains the subunits a, b and c in a variable stoichiometry depending on the organism. Other minor subunits are present in the mitochondrial enzyme, including the oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP) that has been shown to adjust the fitting of  $F_1$  to  $F_0$  for the correct and efficient channeling of protons for ATP synthesis (for review, see [10, 11, 23]).

In the present study, we investigated whether the uncoupled respiratory activity of ripened avocado fruits could result from a facilitated  $H^+$  flow through membrane-bound mitochondrial proteins, such as the  $F_0$  portion of the ATP synthase, the ATP/ADP carrier and the uncoupling protein which, in other systems, have been shown to function as proton channels.

## 2. RESULTS

### 2.1. Characterization of mitochondria from pre- and postclimacteric avocado fruits

Mitochondria obtained from pre- and postclimacteric avocado fruits by differential centrifugation were further purified by self-generated Percoll gradients as described by Moreau and Romani [18]. As previously demonstrated by these authors, there is a change in the buoyant density of avocado mitochondria during ripening. Postclimacteric avocado mitochondria have the same buoyant density as other plant mitochondria, whereas mitochondria from preclimacteric fruit have a lower density. Although the correlation between the ripening process and the alternative respiratory pathway is not yet understood, mitochondria of ripened fruits always present increased mitochondrial oxidase activity [19]. Therefore, we also measured the alternative oxidase activity of the Percoll purified avocado mitochondria by checking the cyanide-insensitive suc-



**Figure 1.**  $O_2$  consumption rates of isolated avocado fruit mitochondria: effect of cyanide. Pre- (MITO PRE) or postclimacteric (MITO POS) avocado fruit mitochondria were energized with succinate, as described in Methods.  $O_2$  consumption was followed using a Clark oxygen electrode. Cyanide (KCN), at a final concentration of 1 mM, was added where indicated. The numbers in parentheses refer to the respiratory rates expressed as  $ng\ atom\ O \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ .

inate-dependent  $O_2$  uptake. A typical effect of cyanide (KCN) on the respiration of avocado mitochondria is shown in *figure 1*. The rate of  $O_2$  consumption by succinate-energized avocado mitochondria isolated from preclimacteric fruits decreased from 128 to 8  $ng\ atom\ O \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  upon the addition of KCN (1 mM). This result indicates that in this preparation of preclimacteric avocado mitochondria, only 6.2 % of the electron flow can be carried by the alternative oxidase. Conversely, KCN decreased the rate of  $O_2$  consumption of postclimacteric mitochondria from 132 to 76  $ng\ atom\ O \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ , indicating that 57.6 % of the  $O_2$  consumption in these mitochondria can be carried by the alternative path. The experiments described below were performed with mitochondria isolated from preclimacteric avocado fruits that presented little or no cyanide-insensitive  $O_2$  uptake (0–10 %), and with mitochondria isolated from postclimacteric fruits that presented high cyanide-insensitive respiration (50–80 %).

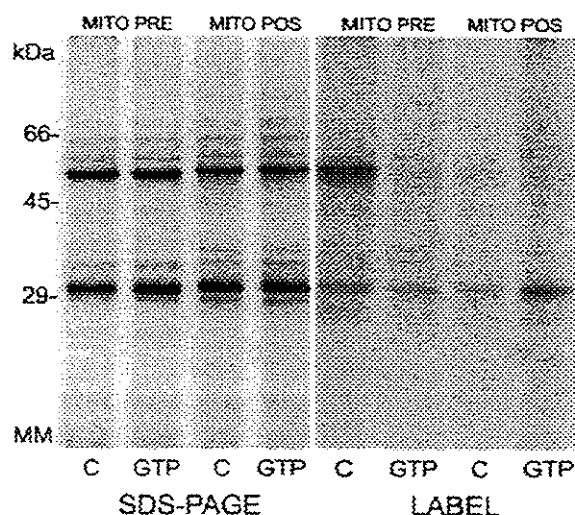
## 2.2. Photoaffinity labelling of mitochondrial proteins

Under specific conditions, the photoaffinity label 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$  could be incorporated into different ATP-binding mitochondrial proteins of pre- and postclimacteric avocado fruits.

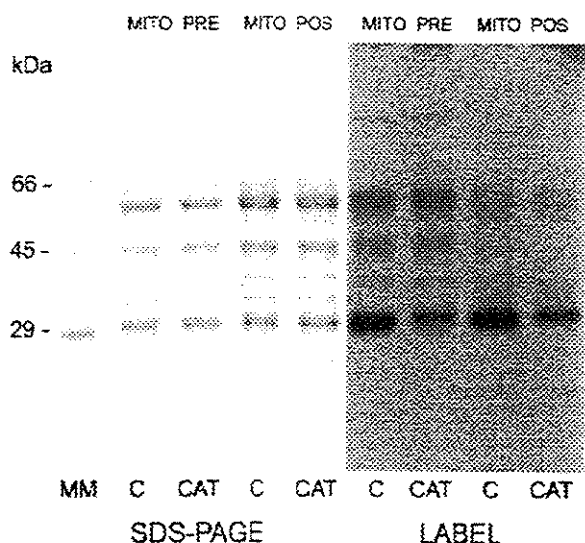
To label the nucleotide binding sites of the mitochondrial ATP synthase, we exposed the  $F_1$  portion by

freezing and thawing, then washing the mitochondrial membranes to remove matrix proteins, as described in Methods. Incubation of washed mitochondrial membranes with 50  $\mu M$  8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$  at pH 7.2 resulted in the incorporation of the probe into a protein with an apparent molecular mass of 50 kDa (*figure 2*), which would correspond to the  $\beta$ -subunit of the  $F_1$  portion. There was little or no labelling of the 50 kDa protein in the presence of GTP, a natural ligand of the  $\beta$  subunit (*figure 2*). The catalytic sites of the  $\beta$  subunit were probably the site of attachment of the probe since, under similar experimental conditions, we have previously shown that bovine heart membrane-bound  $F_1$  incorporates 2-azido-ATP into a peptide fragment of the catalytic site on the  $\beta$ -subunit [14]. *Figure 2* also shows that incorporation of 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$  was much higher into preclimacteric than postclimacteric avocado mitochondrial membranes suggesting that the content of  $\beta$  subunits per mg of protein has decreased after ripening.

To exclusively label nucleotide binding sites exposed to the cytosolic face of mitochondrial membranes, we used intact mitochondria. Incubation of preclimacteric avocado mitochondria with 50  $\mu M$  8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$  resulted in incorporation of the probe into a ~30 kDa polypeptide (*figure 3*). Labelling of this protein was largely prevented by CAT, indicat-



**Figure 2.** Covalent incorporation of 8-azido ATP into  $F_1$  of pre- (MITO PRE) and postclimacteric (MITO POS) avocado fruit mitochondria. Washed mitochondrial membranes ( $0.5\ mg \cdot 200\ \mu L^{-1}$ ) were irradiated in the presence of 50  $\mu M$  8-azido  $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$  at pH 7.2, as described in Methods. GTP (1 mM) was present where indicated; C, control. SDS-PAGE, with 20  $\mu g$  of protein in each lane; Label, autoradiography of the gel electrophoresis; MM, molecular mass marker.



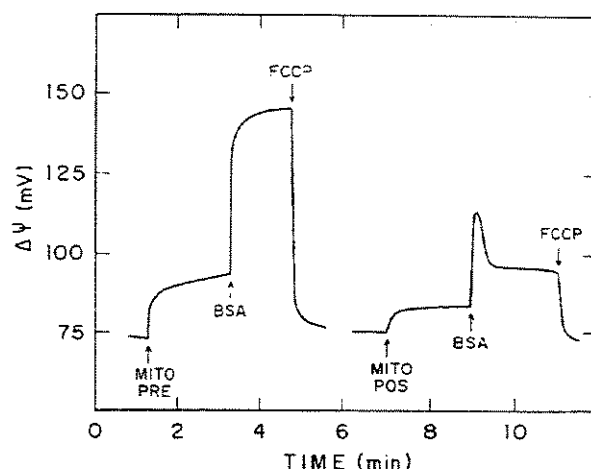
**Figure 3.** Covalent incorporation of 8-azido ATP into AAC of pre- (MITO PRE) and postclimacteric (MITO POS) avocado fruit mitochondria. Mitochondrial suspensions ( $0.5 \text{ mg} \cdot 200 \mu\text{l}^{-1}$ ) were irradiated in the presence of  $50 \mu\text{M}$  8-azido [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP at pH 7.2, as described in Methods. CAT ( $20 \mu\text{M}$ ) was present where indicated; C, control. SDS-PAGE, with  $20 \mu\text{g}$  of protein in each lane; Label, autoradiography of the gel electrophoresis; MM, molecular mass marker.

ing that the photoaffinity probe was predominantly incorporated into AAC. The amount of AAC was not significantly changed by ripening since the incorporation of 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP into postclimacteric was equivalent to that which occurred in preclimacteric avocado mitochondria.

Figure 3 also shows that in the presence of CAT there is still some incorporation of 8-azido-ATP into avocado mitochondria. This observation led us to determine whether the remaining labelling could result from incorporation of the probe into the very similar (in terms of molecular mass) uncoupling protein previously distinguished from the AAC present in brown adipose tissue and potato tuber mitochondria, by photoaffinity labelling with 8-azido-ATP [28]. However, the close molecular mass of these proteins made their identification in avocado mitochondria difficult using this approach. The possibility remains that this protein may be expressed in the mitochondria of avocado fruits (see below).

### 2.3. Effect of BSA on the $\Delta\Psi$ of avocado fruit mitochondria

The isolation of mitochondria from avocado fruits, with their high lipid content, must be carried out in the



**Figure 4.** Effect of BSA on the  $\Delta\Psi$  of pre- (MITO PRE) and postclimacteric (MITO POS) avocado fruit mitochondria. Incubation mixture:  $250 \text{ mM}$  sucrose,  $10 \text{ mM}$  Hepes (pH 7.2),  $10 \mu\text{M}$  safranin. Additions: mitochondria ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), BSA ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and FCCP ( $2 \mu\text{M}$ ).

presence of BSA to decrease contamination of the mitochondrial preparations with free fatty acids which are known to uncouple oxidative phosphorylation [26]. The effect of BSA on the transmembrane electrical potential ( $\Delta\Psi$ ) established by succinate oxidation under state 4 conditions was examined in mitochondria isolated from pre- and postclimacteric avocado fruits. Typical responses for each category of mitochondria are shown in figure 4. The low  $\Delta\Psi$  established by preclimacteric avocado mitochondria ( $93 \text{ mV}$ ) could be substantially increased (to  $145 \text{ mV}$ ), by the addition of  $0.1 \%$  BSA to the medium. Postclimacteric avocado mitochondria also presented a low  $\Delta\Psi$  in the absence of BSA ( $83 \text{ mV}$ ) and, contrary to the observations for preclimacteric mitochondria,  $0.1 \%$  BSA only transiently increased the  $\Delta\Psi$  that rapidly returned to a low value ( $96 \text{ mV}$ ). These results show that postclimacteric mitochondria are unable to maintain a  $\Delta\Psi$  under the same experimental conditions as preclimacteric mitochondria. Figure 4 also shows that the addition of the uncoupler FCCP collapsed the  $\Delta\Psi$  of both types of mitochondria. Since the two types of mitochondria were isolated by the same procedure, it was expected that the endogenous FFA contamination would be equivalent in both preparations. BSA would couple respiration by preventing the non-specific cycling of  $\text{H}^+$  at the lipid bilayer of the mitochondrial membrane. The reduced effect of BSA in coupling postclimacteric avocado mitochondrial respiration suggests that these mitochondria may have a higher  $\text{H}^+$  conductance than the preclimacteric ones.

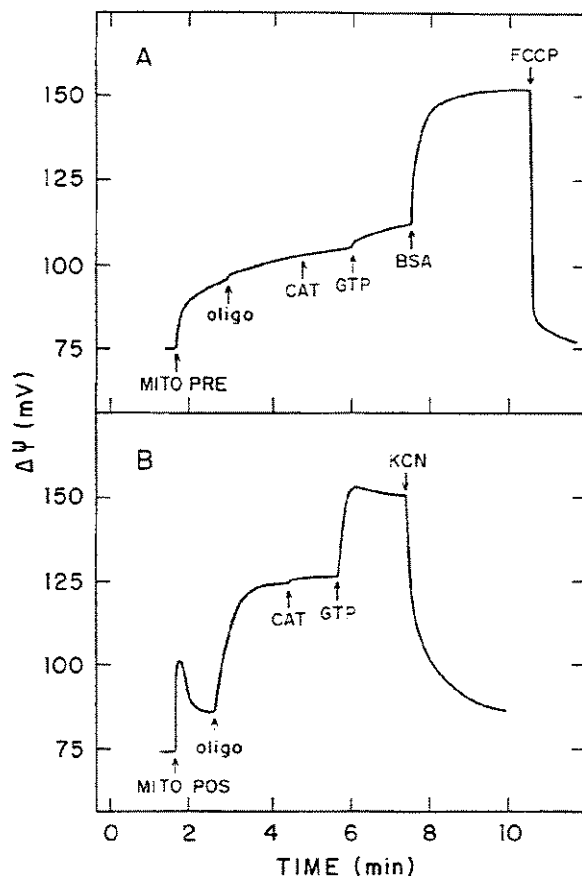


#### 2.4. Effect of oligomycin, CAT and GTP on the $\Delta\Psi$ of avocado fruit mitochondria

The higher uncoupling of postclimacteric avocado mitochondria observed in *figure 4* could reflect the activated  $H^+$  fluxes in specific proteins of the inner mitochondrial membrane. To verify this possibility, we have examined the effect of certain ligands known to inhibit  $H^+$  transport through specific mitochondrial membrane proteins. We used oligomycin to inhibit  $H^+$  transport through  $F_0$ , the membrane sector of ATP synthase, and CAT to inhibit a possible  $H^+$  flux through the AAC. To assess the possible activity of an uncoupling-like protein in avocado fruits, we used GTP which is known to prevent  $H^+$  flux through the PUMP of potato tuber mitochondria [28, 36] and through the UCP of BATM [27].

As shown in *figure 5 A*, oligomycin, CAT or GTP had no effect on the  $\Delta\Psi$  established by succinate-energized, preclimacteric avocado mitochondria. No effect of these compounds were observed whether they were added independently or consecutively, in any order, before (at low  $\Delta\Psi$ ) or after (at high  $\Delta\Psi$ ) BSA addition. These results suggest that the coupling effect of BSA in preclimacteric avocado mitochondria is probably through the prevention of the non-specific proton cycling induced by endogenous FFA contamination at the level of the membrane bilayer.

In the case of postclimacteric avocado fruits, oligomycin and GTP had a significant effect on the  $\Delta\Psi$  build up by succinate-energized mitochondria. Typical responses to these ligands are shown in *figure 5 B* where oligomycin induced a  $\Delta\Psi$  rise from 86.1 to 124.5 mV, and the subsequent addition of GTP increased  $\Delta\Psi$  further to 151 mV. *Figure 5 B* also shows that CAT had no influence on the  $\Delta\Psi$  and that potassium cyanide completely collapsed the transmembrane electrical potential established by succinate oxidation. When GTP was added before oligomycin,  $\Delta\Psi$  increased from 83 to 128 mV and the subsequent addition of oligomycin increased  $\Delta\Psi$  further to 144 mV (*figure 6*). The results in *figures 5 B* and *6* show that the actions of oligomycin and GTP on the build up of  $\Delta\Psi$  in postclimacteric avocado mitochondria were independent and suggest that these mitochondria have an increased  $H^+$  conductance through the  $F_0$  portion of the ATP synthase and through a GTP-sensitive binding site.



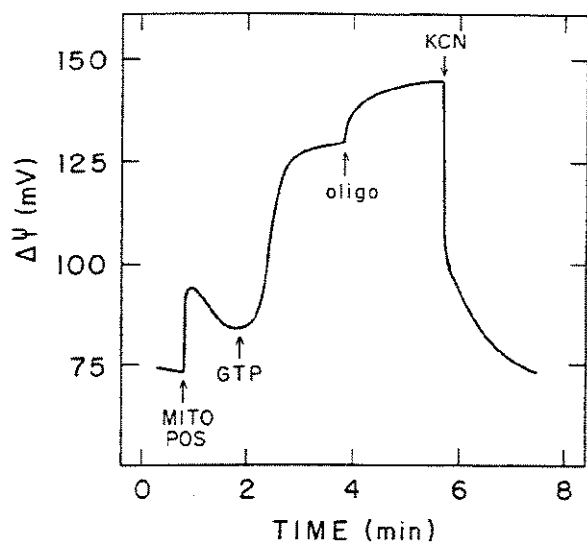
**Figure 5.** Effect of oligomycin, CAT and GTP on the  $\Delta\Psi$  of preclimacteric (A) and postclimacteric (B) avocado fruit mitochondria. Incubation mixture as in *figure 4*. Additions: mitochondria ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), oligomycin ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), CAT ( $1 \text{ }\mu\text{M}$ ), GTP ( $1 \text{ mM}$ ), BSA ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), FCCP ( $2 \text{ }\mu\text{M}$ ) and KCN ( $1 \text{ mM}$ ).

#### 2.5. Effect of BKA and ATP on the $\Delta\Psi$ of postclimacteric avocado fruit mitochondria

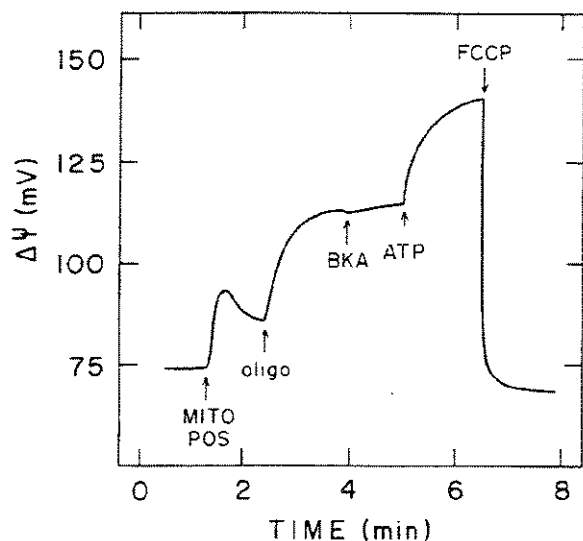
*Figure 7* shows that BKA, another AAC inhibitor, had no effect on the  $\Delta\Psi$  of postclimacteric avocado mitochondria, and that after its addition,  $\Delta\Psi$  could still be substantially increased by ATP. Although adenine nucleotides can also bind to the AAC carrier, the rise in  $\Delta\Psi$  evoked by ATP probably resulted from its binding and inhibition of  $H^+$  transport at a different site since CAT (*figure 5 B*) or BKA (*figure 7*) had no effect on the  $\Delta\Psi$  build up by postclimacteric avocado mitochondria.

### 3. DISCUSSION

The principal findings in this paper suggest that the uncoupled mitochondrial respiratory activity of ripe-



**Figure 6.** Effect of GTP and oligomycin on the  $\Delta\Psi$  of postclimacteric avocado fruit mitochondria. Incubation mixture as in *figure 4*. Additions: mitochondria ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), GTP ( $1 \text{ mM}$ ), oligomycin ( $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) and KCN ( $1 \text{ mM}$ ).



**Figure 7.** Effect of oligomycin, BKA and ATP on the  $\Delta\Psi$  of postclimacteric avocado fruit mitochondria. Incubation mixture as in *figure 4*. Additions: mitochondria ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), oligomycin ( $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), BKA ( $5 \text{ }\mu\text{M}$ ), ATP ( $1 \text{ mM}$ ) and FCCP ( $2 \text{ }\mu\text{M}$ ).

ned avocado fruits could result from an increased leakage of protons through  $F_0$ , probably as a result of a reduced content of the  $\beta$ -subunit in the mitochondrial ATP synthase, and from the activity of a putative uncoupling mitochondrial protein. The low  $\Delta\Psi$  attained under these uncoupling conditions would favor

electron flow through the alternative oxidase which is very active in postclimacteric mitochondria leading to climacteric respiration.

The substantial effect that oligomycin had on the  $\Delta\Psi$  of postclimacteric avocado mitochondria indicated that their  $F_0$  portions are very permeable to  $H^+$ , a characteristic not observed in preclimacteric mitochondria. It is known that mitochondrial membranes depleted of  $F_1$  are very leaky to  $H^+$  and that in these depleted membranes oligomycin is able to seal the  $F_0$  channel even in the absence of  $F_1$  and OSCP [24]. Although we have not determined whether the  $F_0$  content per mg of mitochondrial protein was changed by ripening, the substantial effect that oligomycin had on the  $\Delta\Psi$  of postclimacteric avocado mitochondria suggested that there is an overabundance of  $F_0$  compared to  $F_1$  in these mitochondria. Corroborating with this idea, the photoaffinity labelling with 8-azido-ATP showed that postclimacteric avocado mitochondria present a reduced amount of the  $F_1$   $\beta$ -subunit per mg of protein.

Purine nucleotide binding to isolated BATM was widely used in earlier studies as a measure of mitochondrial uncoupling protein content. However, latter findings showed that acute changes in GDP binding could occur without apparent changes in the concentration of UCP (for review, see [16]). Today, it is accepted that the stoichiometry of nucleotide binding by UCP corresponds to the thermogenic activity of brown adipose tissue, and thus to the activity of UCP. Feil and Rafael [7] suggested that variable GDP binding reflects the functional activity of UCP, based on different protein conformations. The observation that purine nucleotides had a substantial coupling effect on the transmembrane electrical potential generated by substrate oxidation in postclimacteric avocado mitochondria suggested that a PUMP-like protein could be active in ripened avocado fruits.

Schönfeld [29] has shown that the efficiency of FFA as a CAT-sensitive uncoupler is proportional to the AAC carrier content in mitochondria of different mammalian tissues, an observation also made for plant mitochondria [37]. Although we have not compared the AAC content of avocado fruits with other categories of plant mitochondria, such a relationship could explain the lack of dependence of AAC ligands on the  $\Delta\Psi$  build up of avocado mitochondria.

Recent studies on the alternative oxidase of plant mitochondria have led to the view that the partitioning of electrons between the alternative pathway and the cytochrome pathway is under complex regulation and

can be determined by multiple mechanisms [17, 34, 35]. Based on the present results, one possible mechanism for such regulation could be that in postclimacteric avocado mitochondria, the electrochemical  $H^+$  gradient generated by the redox  $H^+$  pumps of the respiratory chain would be dissipated as  $H^+$  flow back through  $F_0$  and a putative uncoupling protein. Under this low electrochemical  $H^+$  gradient, the alternative oxidase of ripened avocado fruits would be engaged, thus leading to the climacteric respiratory increase. Further studies on fruit ripening which take into consideration the relationship between the increased  $H^+$  flux through specific membrane-bound proteins and the engagement of alternative oxidase, could be helpful in elucidating this process. It also remains to be understood why plants use the alternative pathway under a low  $\Delta\Psi$ , rather than the cytochrome pathway, as it occurs in BATM.

#### 4. METHODS

**4.1. Isolation of mitochondria.** For the isolation of mitochondria, avocado fruits (*Persea americana*, Mill), obtained from the local supermarket, were peeled, cut into small cubes and the tissue suspended in buffer medium containing 0.4 M sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.6), 1 mM EGTA, 0.1 % BSA and 3 mM cysteine. The tissue was homogenized by 10 s pulses in a Waring blender, and the suspension was strained through four layers of gauze and centrifuged at  $1\,500 \times g$  for 5 min to remove debris. The resulting supernatant was centrifuged at  $16\,500 \times g$  for 15 min and the mitochondrial pellet suspended in a wash medium containing 250 mM sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.2) and 0.1 % BSA, and subjected to another cycle of differential centrifugation. Mitochondrial fractions were further purified in a self-generated Percoll gradient as described by Moreau and Romani [18]. Mitochondrial suspensions were combined with a solution of 22.5 % Percoll containing 250 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) and centrifuged for 30 min, at  $35\,000 \times g$ , in a SW 41 rotor (Beckman Instruments). The band of mitochondria was collected with a pipette, diluted 10-fold with wash medium and centrifuged at  $12\,500 \times g$  for 15 min. Using this procedure, mitochondria isolated from preclimacteric fruits appeared near the top of the gradient below the chlorophyll and broken thylakoids, while mitochondria isolated from postclimacteric fruits were located near the bottom of the centrifuge tube. All steps were carried out at  $\leq 4^\circ C$ . The mitochondrial protein concentration was determined using a modified Lowry procedure [25], with bovine serum albumin as standard.

**4.2. Preparation of washed mitochondrial membranes.** Mitochondrial preparations maintained at  $-70^\circ C$  for 30–60 days were thawed and resuspended at a concentration of 2 mg·mL<sup>-1</sup> in 250 mM sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.2) and

0.1 % BSA. To separate the matrix components, the suspension was frozen and thawed three times in liquid  $N_2$ , according to McCormak and Denton [15]. The resulting suspension was centrifuged at  $14\,000 \times g$  for 20 min and the pellet homogenized in the same buffer. All steps were carried out at  $\leq 4^\circ C$ . The protein concentration was determined as described for intact mitochondria.

**4.3. Respiratory activity.**  $O_2$  consumption by isolated mitochondria was measured using a Clark oxygen electrode (Yellow Springs Instruments Co.). The outputs of the oxygen electrode were registered with a Linear recorder (model 291). The reaction medium contained 250 mM sucrose, 10 mM Hepes buffer (pH 7.2), 0.3 % BSA, 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM succinate, 5  $\mu M$  rotenone and 0.5 mg mitochondrial protein·mL<sup>-1</sup>.

**4.4. Transmembrane electrical potential measurements.** Membrane potential was measured using safranin as an optical probe [3]. Mitochondrial suspensions were incubated in a reaction medium containing 250 mM sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.2) and 10  $\mu M$  safranin at room temperature. Other additions are specified in figure legends. Changes in the absorbance at 511–533 nm were recorded using a double beam spectrophotometer (Aminco-DW 2000, SLM Instruments).

**4.5. Photoaffinity labelling of mitochondrial proteins.** The procedures for the incorporation of 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP into intact and washed mitochondria, as well as the gel electrophoresis and autoradiography of photolabelled mitochondria were recently described for potato mitochondria [28].

**Acknowledgments.** We thank A.C.N. Magalhães for helpful comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP-UNICAMP).

#### REFERENCES

- [1] Andreyev A.Yu., Bondareva T.O., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Volkov N.I., Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids, FEBS Lett. 226 (1988) 265–269.
- [2] Andreyev A.Yu., Bondareva T.O., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Tsofina L.M., Volkov N.I., Vygodina T.V., The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria, Eur. J. Biochem. 182 (1989) 585–592.
- [3] Akerman K.E.O., Wikstrom M.K.F., Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, FEBS Lett. 68 (1976) 191–197.
- [4] Biale J.B., The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits, Advances in Food Research, Vol. 10, Academic Press, New York, 1960.
- [5] Brady C.J., Fruit ripening, Annu. Rev. Plant Physiol. 38 (1987) 155–178.

- [6] Brustovetsky N., Klingenberg M., The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate  $H^+$  transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 27329–27336.
- [7] Feil S., Rafael J., Effect of acclimation temperature on the concentration of uncoupling protein and GDP binding in rat brown fat mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 219 (1994) 681–690.
- [8] Fischer R.J., Bennett A.B., Role of cell wall hydrolases in fruit ripening, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1991) 675–703.
- [9] Garlid K.D., Orosz D.E., Mondriansky M., Vassanelli S., Jezek P., On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2615–2620.
- [10] Gautheron D.C., Godinot C., Evidence from immunological studies of structure-mechanism relationship of  $F_1$  and  $F_1 F_0$ , *J. Bioenerg. Biomembr.* 20 (1988) 451–468.
- [11] Hateli Y., The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 1015–1069.
- [12] Klingenberg M., Mechanism and evolution of the uncoupling protein brown adipose tissue, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 108–112.
- [13] Locke R.M., Rial E., Scott I.D., Nicholls D.G., Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown fat mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 129 (1982) 373–380.
- [14] Martins I.S., Penefsky H.S., Covalent modification of catalytic sites on membrane-bound beef heart mitochondrial ATPase by 2-azido-adenine nucleotides, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 1057–1065.
- [15] McCormack J.G., Denton R.M., The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, *Biochem. J.* 180 (1979) 533–544.
- [16] Milner R.E., Trayhurn P., Evidence that the acute unmasking of GDP-binding sites in brown adipose tissue mitochondria is not dependent on mitochondrial swelling, *Biochem. Cell Biol.* 66 (1988) 1226–1230.
- [17] Moore A.L., Siedow J.N., The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1059 (1991) 121–140.
- [18] Moreau F., Romani R., Preparation of avocado mitochondria using self-generated Percoll density gradients and changes in buoyant density during ripening, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1380–1384.
- [19] Moreau F., Romani R., Malate oxidation and cyanide-insensitive respiration in avocado mitochondria during the climacteric cycle, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1385–1390.
- [20] Nicholls D.G., The effective proton conductances of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue: dependency on proton electrochemical gradient, *Eur. J. Biochem.* 77 (1977) 349–356.
- [21] Nicholls D.G., Locke R.M., Thermogenic mechanisms in brown fat, *Physiol. Rev.* 64 (1984) 1–64.
- [22] Nicholls D.G., Rial E., Brown fat mitochondria, *TIBS* 9 (1984) 489–491.
- [23] Penefsky H.S., Cross R.L., Structure and mechanism of  $F_1 F_0$ -type ATP synthases and ATPases, *Adv. Enzymol.* 64 (1991) 173–214.
- [24] Penin F., Deléage G., Godinot C., Gautheron C., Efficient reconstitution of mitochondrial energy-transfer reactions from depleted membranes and  $F_1$ -ATPase as a function of the amount of bound oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), *Biochim. Biophys. Acta* 852 (1986) 55–67.
- [25] Peterson G.L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346–356.
- [26] Pressman B.C., Lardy, Effects of surface-active agents on latent ATPase of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 21 (1956) 458–466.
- [27] Rial E., Poustie A., Nicholls D.G., Brown adipose tissue mitochondria: the regulation of the 32,000 Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides, *Eur. J. Biochem.* 137 (1983) 197–203.
- [28] Saviani E.E., Silva Jr. A., Martins I.S., Photoaffinity labelling of the uncoupling protein from potato tuber mitochondria, *Plant Physiol. Biochem.* 35 (1997) 701–706.
- [29] Schönfeld P., Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? *FEBS Lett.* 264 (1990) 246–248.
- [30] Skulachev V.P., Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation, *FEBS Lett.* 294 (1991) 158–162.
- [31] Solomos T., Cyanide-resistant respiration in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28 (1977) 663–671.
- [32] Solomos T., Latices G.G., Induction by ethylene of cyanide-resistant respiration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70 (1976) 663–671.
- [33] Theologis A., Latices G.G., Respiratory contribution of the alternate path during various stages of ripening in avocado and banana fruits, *Plant Physiol.* 62 (1978) 249–255.
- [34] Vanlerberghe G.C., Alternative oxidase: from gene to function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 (1997) 703–734.
- [35] Vanlerberghe G.C., Day D.A., Wiskich J.T., Vanlerberghe A.E., McIntosh L., Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation, *Plant Physiol.* 109 (1995) 353–361.
- [36] Verecsi A.E., Martins I.S., Silva M.A.P., Leite H.M.F., Cuccovia I., Chaimovich H., PUMPing plants, *Nature* 375 (1995) 24.
- [37] Vianello A., Petrusa E., Macri F., ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentration of palmitate, *FEBS Lett.* 349 (1994) 407–410.
- [38] Winkler E., Klingenberg M., Effect of fatty acid on  $H^+$  transport activity of the reconstituted uncoupling protein, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2508–2515.