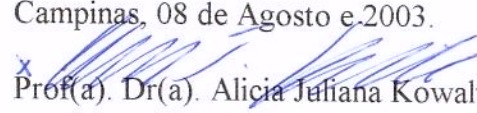


FERNANDO RUY

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Fernando Ruy**.

Campinas, 08 de Agosto e 2003.


Prof(a). Dr(a). Alicia Juliana Kowaltowski
Orientador(a)

***CANAIS DE POTÁSSIO EM MITOCÔNDRIAS
DE PLANTAS***

CAMPINAS

2003

FERNANDO RUY

***CANAIS DE POTÁSSIO EM MITOCÔNDRIAS
DE PLANTAS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ALICIA J. KOWALTOWSKI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL E. VERCESI

CAMPINAS

2003

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200333679

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	R 944c
V	EX
TOMBO BCI	56262
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	4/12/03
Nº CPD	

CM00192159-0

Bib id 305134

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

R944c Ruy, Fernando
Canais de potássio em mitocôndrias de plantas / Fernando Ruy.
Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientadores : Alicia Juliana Kowaltowski, Anibal Eugenio Vercesi

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Calor. 2. Fosforilação. 3. Energia. I. Alicia Juliana Kowaltowski. II. Anibal Eugenio Vercesi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Alicia J. Kowaltowski

Membros:

1. Dra. Alicia J. Kowaltowski

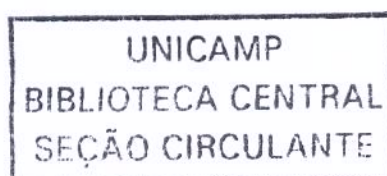
2. Dr. Jiri Borecky

3. Dr. Iolanda Midea Cuccovia

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/08/2003

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bionergética do Depto. de Patologia
Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**



Aos meus pais pelo apoio irrestrito e incondicional.

À professora Alicia pela excelente orientação, dedicação e rigor científico.

Ao Professor Anibal por todos os ensinamentos e seu esforço em proporcionar material e ambiente adequado para o desenvolvimento do presente trabalho.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, imprescindível ao andamento do trabalho.

Aos colegas de laboratório, Adriana, Alexandre, Ana, Celene, Chico, Cláudia, Denise, Evelise, Fabiane, Felipe, Graziela, Jesus, Jiri, Luciane, Márcia, Marcos, Michely, Natália, Renata, Ricardo, Roger, Solange e Endrigo (*in memoriam*).

Às técnicas, Edilene e Elisângela, pelo isolamento de mitocôndrias e preparo de soluções.

À Maria Rita por todo o apoio.

	PÁG.
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO	13
1.1- A cadeia respiratória de plantas.....	14
1.2- Sistemas Dissipadores de Energia.....	16
1.2.1- A proteína desacopladora de mamíferos.....	16
1.2.2- A proteína desacopladora de plantas.....	18
1.2.3- A oxidase alternativa.....	19
1.2.4- Os canais de K^+ mitocondriais.....	20
2- MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1- Origem dos materiais.....	24
2.2- Isolamento das mitocôndrias vegetais.....	24
2.3- Dosagem de proteína.....	25
2.4- Medida da variação de volume da organela.....	26
2.5- Medida do consumo de O_2 mitocondrial estimado pelo fluxo de K^+ através da membrana interna.....	26
2.6- Determinação de geração mitocondrial de H_2O_2	27
2.7- Análise dos dados.....	27
3- RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES	28
3.1- Permeabilidade das mitocôndrias a íons K^+	29

3.2- Efeito da captação de K^+ no consumo de O_2 de mitocôndrias de batata.....	30
3.3- Determinação experimental da constante de Michaelis – Menten para íons K^+	30
3.4- Regulação dos canais de K^+ em mitocôndrias vegetais por quinina.....	31
3.5- Regulação da geração de H_2O_2 por K^+	32
4- DISCUSSÃO.....	33
5- CONCLUSÕES.....	38
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7- FIGURAS.....	50
8- APÊNDICE.....	69

ADP	adenosina-5'-difosfato
AOX	oxidase alternativa
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BHAM	ácido benzohidroxâmico
BSA	albumina bovina
EGTA	etileno glico – bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
Glib.	glibenclamida
Hepes	ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etansulfônico])
MB	mitocôndria de batata
MM	mitocôndria de milho
MT	mitocôndria de tomate
MitoK _{ATP}	canal de potássio mitocondrial sensível a ATP
NEM	N-etilmaleimida
P _i	fosfato inorgânico
PUMP	proteína desacopladora de plantas
UCP	proteína desacopladora mitocondrial
UQ	Ubiquinona (forma oxidada)
ΔμH ⁺	gradiente eletroquímico de prótons



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

RESUMO

O gradiente de prótons ($\Delta\mu H^+$) gerado através da membrana mitocondrial interna pela oxidação de substratos não é totalmente acoplado à síntese de ATP. Além de transportadores específicos que utilizam a energia do $\Delta\mu H^+$, a membrana mitocondrial interna possui sistemas dissipadores de energia, tais como a proteína desacopladora de plantas (PUMP) e a oxidase alternativa (AOX), que diminuem a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias vegetais. Outro mecanismo potencialmente dissipativo recentemente descrito envolve um ciclo do íon K^+ , onde a captação do cátion é mediada por canais de K^+ sensíveis a ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) e seu efluxo é balanceado através do trocador K^+/H^+ . Esses canais de K^+ foram extensamente estudados em mitocôndrias de mamíferos, e também descritos em mitocôndrias vegetais, onde possuem, aparentemente, alta atividade. Interessados neste novo canal, nós decidimos estudá-lo em maior detalhe, utilizando plantas onde as funções dos outros sistemas dissipadores de energia já foram bastante caracterizadas. Em mitocôndrias de tubérculo de batata, o transporte de K^+ mostrou-se insensível a ATP, glibenclamida e 5-hidroxidecanoato, conhecidos reguladores dos $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ de mamíferos, mas foi inibido por quinina. Este transporte de K^+ sensível a quinina promove inchamento da organela e aumento da velocidade respiratória, resultando em maior dissipação energética e prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio. Um transporte de K^+ sensível a quinina também foi observado em mitocôndrias de milho e tomate. Nossas observações experimentais sugerem a existência de um novo canal de potássio em mitocôndrias vegetais, com características distintas do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ e capacidade de dissipar o $\Delta\mu H^+$ quando acoplado ao trocador K^+/H^+ .



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ABSTRACT

The proton gradient ($\Delta\mu\text{H}^+$) across the mitochondrial inner membrane generated by substrate oxidation is not totally coupled to ATP synthesis. In addition to specific uniporters that use the energy contained in $\Delta\mu\text{H}^+$, the mitochondrial inner membrane presents energy-dissipating systems such as the plant uncoupling protein (PUMP) and the alternative oxidase (AOX), which decrease the efficiency of oxidative phosphorylation in plant mitochondria. Another potential dissipative mechanism recently described involves a K^+ cycle, where ion import is mediated by ATP-sensitive K^+ channels (mitoK_{ATP}) and its efflux is obtained through a K^+/H^+ exchanger. These channels were extensively studied in mammalian mitochondria, and also described in plant mitochondria, in which they apparently present high activity. We decided to study this newly discovered channel, using plants where the roles of the other energy dissipating systems are well established. In potato mitochondria, we observed a K^+ transport insensitive to ATP, glibenclamide and 5-hydroxydecanoate, which regulate mammalian mitoK_{ATP}, but was inhibited by quinine. This quinine-sensitive K^+ transport promotes organelle swelling and increases respiratory rates, resulting in large energetic dissipation and prevention of the reactive oxygen species generation. A quinine-sensitive K^+ was also observed in tomato and maize mitochondria. Our experimental observations suggest the existence of a new K^+ channel in plant mitochondria with different characteristics from those observed in mammalian tissue capable of dissipating $\Delta\mu\text{H}^+$.



1- INTRODUÇÃO

Nos organismos aeróbicos a produção de energia, necessária para o funcionamento adequado do metabolismo, é essencialmente obtida através da síntese e posterior quebra de compostos fosfatados de alta energia, tais como o ATP. Estes compostos, em sua maioria, são produzidos a partir da degradação dos esqueletos carbônicos de carboidratos, lipídios e aminoácidos através do ciclo do ácido cítrico. A oxidação destes compostos é acompanhada pela redução das coenzimas NAD^+ e FAD na matriz mitocondrial e na superfície interior da membrana mitocondrial interna, respectivamente. Estas coenzimas são então oxidadas, gerando um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) e permitindo que os elétrons liberados sejam transferidos ao oxigênio através da passagem pelos complexos protéicos que constituem a cadeia transportadora de elétrons (MITCHELL, 1961). O retorno destes prótons, agora a favor do gradiente eletroquímico, através do complexo protéico $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$ é responsável pela síntese de ATP a partir da fosforilação do ADP por fosfato inorgânico (NICHOLLS e FERGUSON, 1982). Os compostos fosfatados gerados a partir da fosforilação constituem elementos fundamentais na manutenção da fisiologia celular.

Embora a função básica do $\Delta\mu\text{H}^+$ seja a produção de energia por meio da síntese de nucleotídeos, o consumo de oxigênio mitocondrial não é totalmente acoplado à fosforilação. O gradiente de prótons é também utilizado em outros processos fisiológicos, como o transporte eletroforético de Ca^{2+} (GUNTER et al., 1994), a captação eletroneutra de P_i (KRAMER, 1996), a troca eletroforética de ATP^4 por ADP^3 (KLINGENBERG e NELSON, 1994), ou pode ser dissipado através da proteína desacopladora de mamíferos (UCP1 – NICHOLLS et al., 1978).

1.1- A CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS MITOCONDRIAL DE PLANTAS

O processo de fotossíntese nas plantas clorofiladas permite a síntese de compostos orgânicos através de um mecanismo de transdução de energia em que as radiações eletromagnéticas do sol são convertidas em energia química de substratos orgânicos, predominantemente carboidratos nas plantas. Parte destes compostos são

armazenados e depois oxidados durante o processo de síntese de ATP. Nas plantas, a demanda energética é suprida através de duas vias distintas: a fosforilação oxidativa, que ocorre nas mitocôndrias, e a fotofosforilação nos cloroplastos. A contribuição de cada organela varia de acordo com o tecido da planta, estágio de desenvolvimento do organismo e fatores ambientais, como a disponibilidade de luz.

A cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias de plantas difere em diversos aspectos dos mamíferos (Figura 1). Ela contém três NAD(P)H desidrogenases adicionais que não são conversores de energia (não transportam prótons) e não são inibidas por rotenona. Estas enzimas são responsáveis pela oxidação do NADH da matriz mitocondrial e do citoplasma (MOLLER et al., 1993).

Mitocôndrias vegetais possuem ainda uma via que se ramifica da cadeia principal dos citocromos ao nível da ubiquinona – a oxidase alternativa (HUQ e PALMER, 1978; RICH, 1978). O fluxo de elétrons através desta proteína possibilita a redução do oxigênio à água sem o bombeamento de H^+ para o citosol. Assim, a energia proveniente da oxidação dos substratos respiratórios não é utilizada para a síntese de ATP, sendo dissipada na forma de calor.

Outro sistema dissipador de energia recentemente descoberto em mitocôndrias vegetais é a proteína desacopladora de plantas (PUMP - VERCESI et al., 1995). Assim como a UCP1, a PUMP aumenta a condutividade da membrana mitocondrial interna a prótons, dissipando a energia contida no $\Delta\mu H^+$.

Embora os sistemas dissipadores de energia em plantas permitam o mesmo efeito final, isto é, o desacoplamento entre a respiração e a fosforilação, há uma diferença básica entre a PUMP e a AOX: enquanto a proteína desacopladora diminui o gradiente eletroquímico de prótons, a AOX previne sua formação (MOORE et al., 1978). Outra diferença entre os dois sistemas refere-se à regulação por ácidos graxos livres, que ocorre em direções opostas. Enquanto a PUMP é ativada por ácidos graxos livres, a AOX é inibida (SLUSE et al., 1998). Assim, ambos sistemas não trabalham simultaneamente nas suas velocidades máximas. Muito provavelmente, estes sistemas funcionam sequencialmente durante o desenvolvimento da planta (ALMEIDA et al., 1998). A AOX é ativada durante o

crescimento da planta, e a PUMP está ativada durante eventos fisiológicos da planta adulta, como, por exemplo, o amadurecimento de frutos e senescência, quando a concentração de ácidos graxos livres aumenta consideravelmente (GÜÇLÜ et al., 1989; ROUET-MAYER et al., 1995).

Além das funções bioenergéticas, as mitocôndrias de plantas fornecem ainda carbonos provenientes do ciclo do ácido cítrico para a biosíntese de compostos como aminoácidos, uma vez que estes organismos são autótrofos.

1.2- SISTEMAS DISSIPADORES DE ENERGIA

1.2.1- A proteína desacopladora de mamíferos (UCP1)

Em 1978, os pesquisadores FOSTER e FRYDMAN observaram que as mitocôndrias do tecido adiposo marrom de mamíferos hibernantes, quando expostas ao frio, respiravam numa velocidade muito superior às organelas presentes em outros tecidos. Este aumento abrupto da respiração, regulado hormonalmente, foi elucidado através da descoberta de uma proteína presente na membrana interna das mitocôndrias do tecido adiposo marrom (NICHOLLS, 1978), chamada de proteína desacopladora (UCP, posteriormente denominada UCP1). A estrutura da UCP1 foi elucidada através de experimentos de detecção imunológica (MIROUX et al., 1993). Como observado na Figura 2, ela contém seis α -hélices transmembrânicas, sendo que as extremidades N- e C-terminais se localizam no lado do espaço intermembranas.

A UCP1 possibilita um aumento da condutância de prótons na membrana mitocondrial interna, permitindo a dissipação do $\Delta\mu H^+$ criado pelas bombas redox da cadeia respiratória. O desacoplamento mediado pela proteína desacopladora pode ser alostericamente inibido por nucleotídeos de purina, que funcionam como reguladores fisiológicos do processo de termogênese (NICHOLLS, 1979). Dois modelos foram propostos para explicar o mecanismo de ação da UCP1: o modelo tamponante (WINKLER e KLINGENBERG, 1994) (Figura 3A) e o modelo protonofórico (SKULACHEV, 1991) (Figura 3B).

O modelo tamponante propõe que ácidos graxos se ligam a sítios localizados perto do canal de prótons da proteína, principalmente histidinas, criando grupos aceptores/doadores de elétrons que facilitariam o transporte de H^+ . Em estudos posteriores, os autores demonstraram que mutações nos resíduos de His¹⁴⁵ e His¹⁴⁷ aboliam o transporte de prótons, o que os levou a concluir que estes aminoácidos fazem parte do hipotético canal de prótons (BIENENGRAEBER et al., 1998). Porém, a proteína desacopladora de plantas (PUMP - VERCESI et al., 1995) presente em batatas não possui nenhuma das histidinas citadas e é capaz de catalisar desacoplamento e transporte de prótons dependentes de ácidos graxos (JEZEK et al., 1996; 1997).

O modelo protonoforético, proposto por SKULACHEV (1991), sugere que o mecanismo de desacoplamento promovido pela UCP envolva um ciclo fútil de ácidos graxos através da bicamada lipídica por um mecanismo de “flip-flop”, posteriormente corroborado por GARLID et al. (1996). Análises experimentais mostraram que o tamanho da cadeia hidrofóbica dos ácidos graxos influencia na velocidade do seu transporte, provavelmente devido ao fato dos ácidos graxos alcançarem mais rapidamente o seu sítio de ligação hidrofóbico na UCP (JEZEK et al., 1997).

Uma evidência experimental que apóia o modelo protonoforético é ação de uma classe de substratos das proteínas desacopladoras, os alquilsulfonados. Estes compostos, análogos dos ácidos graxos, são inibidores competitivos do transporte de Cl^- de maneira sensível a nucleotídeos (GARLID et al., 1996). Devido a seu pK_a bastante baixo, estas moléculas raramente se encontram protonadas no meio de reação, não podendo atravessar a bicamada lipídica e transportar prótons (GARLID et al., 1996). Entretanto, JABUREK et al. (2001) mostraram que um alquilsulfonado (C11-sulfonado) pode ser transportado através de membranas após formar um par iônico com o propranolol, uma base anfifílica. Neste trabalho, o par iônico eletroneutro alquilsulfonado - propranolol foi capaz de induzir desacoplamento de maneira sensível ao GDP. Assim, estas evidências experimentais indicam que a UCP1 catalisa o transporte de ânions, e o transporte de H^+ acontece durante a reentrada dos substratos da proteína desacopladora através do mecanismo de flip-flop (JABUREK et al., 2001).

1.2.2- A proteína desacopladora de plantas (PUMP)

Em 1995, VERCESI et al. demonstraram a existência de uma proteína com características e peso molecular semelhantes à UCP1 presente em mitocôndrias de batata (*Solanum tuberosum*). Batizada de PUMP (plant uncoupling mitochondrial protein), esta proteína estimula a dissipação do potencial eletroquímico através da reentrada de prótons na matriz mitocondrial por meio de um ciclo de ácidos graxos (JEZEK et al., 1997). Neste ciclo, a PUMP catalisa o transporte de ácidos graxos desprotonados da matriz para o citosol. O retorno destes ácidos graxos através do mecanismo de “flip-flop” (SKULACHEV, 1991; 1999) resulta num ciclo fútil de prótons, dissipando a energia protomotiva gerada pela oxidação de substratos na cadeia respiratória (JEZEK et al., 1996). O ciclo de H^+ estimulado pela proteína desacopladora é sensível a inibição alostérica por nucleotídeos de purina como ATP e GTP, e é extremamente sensível a BSA, que remove ácidos graxos, essenciais ao ciclo de H^+ (JEZEK et al., 1996; SLUSE et al., 1998).

Durante aproximadamente duas décadas, a UCP do tecido adiposo marrom foi considerada uma aquisição evolutiva dos mamíferos, porém a descrição da proteína em plantas sugeriu que elas desenvolveram-se muito cedo no processo evolutivo. Assim, esta descoberta impulsionou a procura por UCPs em organismos mais simples, como amebas e fungos (JARMUSZKIEWICZ et al., 1999, JARMUSZKIEWICZ et al., 2000). A descrição da PUMP também incentivou a procura de UCPs em outros tecidos. Deste modo, foram descobertos genes que codificam outras isoformas designadas UCP2 (FLEURY et al., 1997), UCP3 (BOSS et al., 1997), BMCP1 (SANCHIS et al., 1998) e UCP4 (MAO et al., 1999). A UCP2 é expressa em mitocôndrias de vários tecidos humanos, especialmente em tecidos ricos em macrófagos, e a regulação de sua expressão em tecido adiposo branco está relacionada ao estado nutricional (BOSS et al., 1997). Vários dados indicam um importante papel desta proteína no *diabetes melitus* (FLEURY et al., 1997), hiperinsulinemia e obesidade (FLEURY et al., 1997). A UCP3 é expressa em mitocôndrias de músculo esquelético e parece estar relacionada à termogênese muscular (BOSS et al., 1997; VIDAL-PUIG et al., 1997) e peso corporal (GONG et al., 1997; DULLOO e SAMEC, 2000). A UCP4 e BMCP1 são expressas em cérebro e suas funções ainda são pouco conhecidas (SANCHIS et al., 1998; MAO et al., 1999).

1.2.3- A oxidase alternativa

Uma das características mais antigas observadas em mitocôndrias de plantas é a parcial resistência de sua atividade respiratória à presença de cianeto. Esta resistência foi observada inicialmente em 1929 por GENOVOIS, porém a descrição de uma via insensível ao composto, a oxidase alternativa, foi feita apenas no final de década de setenta (HUQ e PALMER, 1978; RICH, 1978). A partir de sua descoberta, oxidase alternativa (AOX) tem sido identificada numa grande variedade de plantas superiores (DAY e WISKICH, 1995; SIEDOW e UMBACH, 1995), em leveduras (LAMBOWITZ et al., 1989; SAKAJI et al., 1991) e em alguns protozoários (CLARKSON et al., 1989).

A AOX provoca uma ramificação da cadeia de transporte de elétrons da via principal do citocromoc c ao nível da ubiquinona, reduzindo o oxigênio à água, e evitando parcialmente o bombeamento de H^+ da matriz mitocondrial para o citosol. Assim, o fluxo de elétrons através da proteína não é acoplado à síntese de ATP, ocorrendo dissipação de energia na forma de calor. A AOX não é sensível aos inibidores clássicos da via dos citocromos como antimicina ou cianeto, mas pode ser inibida pelo ácido hidroxâmico, benzohidroxamato (BHAM) (SCHONBAUM et al., 1971) ou ácido linoleico, um ácido graxo bastante abundante em plantas (SLUSE et al., 1998).

A AOX é uma proteína homodimérica integral da membrana interna da organela. Cada monômero possui duas porções hidrofóbicas que ligam a proteína à bicamada lipídica e um sítio ativo formado por um centro diférrico ligado a quatro hélices empacotadas que constituem a região hidrofílica da enzima (BERTHOLD et al., 2000) (Figura 4). Os dois monômeros são unidos por interações entre seus resíduos de cisteína terminais. Estruturalmente, a AOX está presente em duas formas: a oxidada, onde os monômeros encontram-se ligados covalentemente através de pontes dissulfeto e a reduzida, onde o dímero é mantido por meio de interações iônicas, não covalentes (UMBACH e SIEDOW, 1993). Sua atividade é regulada através do estado de redução da enzima, sendo que o dímero reduzido possui uma atividade menor que a forma reduzida (UMBACH et al., 1994).

1.2.4- Os canais de K⁺ mitocondriais

Como consequência da diferença de concentração de prótons transmembrânica gerada pela respiração, há uma força para o influxo eletroforético de cátions, em especial o potássio, íon mais abundante na matriz mitocondrial (Hanson, 1985) e citosol. Este influxo de cátions é acompanhado pela entrada de H₂O e ânions, uma vez que a membrana mitocondrial interna possui uma grande variedade de trocadores e canais de ânions, como o canal aniônico permeável a íons cloreto presente em mitocôndrias vegetais (PIMAC - BEAVIS e VERCESI, 1992). A integridade osmótica da organela nestas condições é mantida através da baixa permeabilidade ao K⁺ e a presença de um mecanismo eletroneutro de extrusão do cátion (trocador H⁺/K⁺ - GARLID et al., 1978). Assim, durante o estado regular de respiração, o influxo de K⁺ é balanceado por meio de seu efluxo, evitando o inchamento excessivo e ruptura da organela (GARLID, 1996).

Além da difusão iônica, INOUE et al. (1991) identificaram em mitocôndrias de mamíferos a existência de baixas correntes elétricas específicas a íons K⁺. Foi descrito assim um canal capaz de diminuir ligeiramente a diferença de potencial eletroquímico transmembrânico através do fluxo de K⁺ do citosol para a matriz mitocondrial. Este canal mostrou-se sensível a baixas concentrações de ATP, que promovem a sua inibição, de maneira dependente da presença de íons magnésio (PAUCEK et al. 1996). A reabertura do canal de K⁺ sensível ATP (mitoK_{ATP}) pode ser promovida através de moduladores fisiológicos, como o GTP, ou farmacológicos como o diazóxido e a cromacalina (GARLID et al., 1996). Foram também descritos antagonistas farmacológicos do canal como a glibenclamida e o 5-hidroxicanoato (JABUREK et al., 1998)

O mitoK_{ATP} foi posteriormente isolado e reconstituído em vesículas lipídicas por PAUCEK et al. (1992), e pôde-se comprovar uma grande semelhança funcional e estrutural com o canal de K⁺ sensível a ATP presente na membrana plasmática. Ambos canais são heteromultímeros compostos por 4 subunidades orientadas mais interiormente (mitoKIR), formando o poro de K⁺ e a unidade estrutural, com peso molecular de 55 KDa, e 4 subunidades receptoras de sulfoniluréia (mitoSUR) de 63 KDa, pertencente à superfamília ligante de ATP, com muitos domínios transmembrânicos e 2 campos de ligação para nucleotídeos (NBFs) (YAMADA et al., 1997) (Figura 5). A inibição promovida pelo

ATP pode ser revertida através de uma mudança conformacional induzida pela hidrólise dos nucleotídeos nos NBFs e posterior ligação dos moduladores às subunidades SURs (SCHWANSTECHER et al., 1998). Apesar destas semelhanças funcionais e estruturais, os canais mitocondriais e de membrana plasmática apresentam respostas diferenciadas à ativação por drogas. Como exemplo, o mitoK_{ATP} é cerca de 2000 vezes mais sensível à abertura por diazóxido, e é inibido especificamente por 5- hidroxidecanoato (GARLID et al., 1996; JABUREK et al., 1998). Além disso, o canal mitocondrial é inibido por ADP, um agonista do canal de K⁺ sensível a ATP da membrana plasmática (GARLID et al., 1996; PAUCEK et al., 1992).

A descoberta desse canal trouxe novas implicações para a fisiologia da organela, pois a existência de uma proteína atuando em conjunto com o trocador K⁺/H⁺ permitiria um ciclo regulado do íon, possibilitando assim uma manutenção do volume da organela independente de pequenas variações da diferença de potencial eletroquímico transmembrânico (KOWALTOWSKI et al., 2001). A manutenção de um volume ideal garantiria o transporte adequado de nucleotídeos através das membranas mitocondriais, favorecendo a fosforilação de creatina e prevenindo a hidrólise de ATP em mitocôndrias cardíacas (SANTOS et al., 2002; BELISLE e KOWALTOWSKI, 2002).

Em 1999, PASTORE et al. verificaram por meio de alterações do volume mitocondrial (inchamento) e medidas da diferença de potencial eletroquímico transmembrânico, que mitocôndrias de uma grande diversidade de vegetais possuíam a capacidade de captar grandes concentrações de K⁺ do meio externo. Essa captação mostrou-se sensível a ATP, que promoveu sua inibição, demonstrando assim a existência do canal em mitocôndrias de plantas. A regulação do canal em vegetais descrita por Pastore e colaboradores. é similar a mamíferos, mas sua atividade é maior, possibilitando uma diminuição significativa da diferença de potencial eletroquímico transmembrânico através de sua abertura. Deste modo, é possível que o canal de plantas desempenhe uma função diferente de apenas regular o volume da organela. A presença de um potente trocador K⁺/H⁺ nestas mitocôndrias (DIOLEZ et al., 1985) permitiria a regulação da diferença de potencial eletroquímico transmembrânico dessas organelas através da abertura do canal, sem que houvesse ruptura da mitocôndria devido ao inchamento excessivo. Assim, como

observado em outros modelos de desacoplamento mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 1998; SKULACHEV et al., 1996), a ativação do canal de potássio pode estar relacionada à redução da formação de ânions superóxidos (PASTORE et al., 1999), protegendo a organela contra espécies reativas de oxigênio. Semelhantemente à proteína desacopladora de plantas e a oxidase alternativa, o canal pode estar também relacionado com a geração de calor em plantas, essencial para o amadurecimento de frutos e resistência ao estresse térmico (COSTA et al., 1999). O canal pode estar envolvido ainda na regulação do metabolismo da planta e prevenção contra o estresse oxidativo (KOWALTOWSKI et al., 1998, FERRANTI et al., 2003).



2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- ORIGEM DO MATERIAL BIOLÓGICO E REAGENTES UTILIZADOS

Batatas (*Solanum tuberosum* cv. Bintje), tomates (*Lycopersicon esculentum* cv. Santa Clara) e milho (*Zea mays*) foram comprados no mercado local, sempre do mesmo fornecedor (mesma plantação).

A maioria dos reagentes utilizados é da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). A sonda Amplex Red, usada na medida da produção de H_2O_2 pelas mitocôndrias, foi comprada junto a Molecular Probes, Inc. (Oregon, EUA).

2.2- ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS VEGETAIS

2.2.1- Mitocôndrias de batata

As mitocôndrias de tubérculos de batatas (*Solanum tuberosum*) foram obtidas através do procedimento descrito por BEAVIS e VERCESI (1992). Depois de descascados, os tubérculos de batata foram picados e triturados numa centrífuga doméstica. A solução resultante foi adicionada a um meio contendo sacarose 400 mM, Hepes 10 mM, EGTA 1 mM e cisteína 4 mM (0,05%), num volume final de 1 litro. O pH foi ajustado para 7,2 através da adição de NaOH 1 M. Após a homogeneização, a solução foi filtrada numa malha de poliéster a fim de se retirar o excesso de amido presente. As mitocôndrias foram então isoladas através de centrifugações diferenciais.

2.2.2- Mitocôndrias de tomate

As mitocôndrias de tomate (*Lycopersicon esculentum*) foram obtidas através do método descrito por Almeida e colaboradores., 1999. Aproximadamente 1 Kg de tomates verdes foram picados e triturados (sem sementes) numa centrífuga doméstica. A solução resultante foi adicionada a um meio contendo 500 mM de sacarose, 0,2 mM de EGTA, 40 mM de HEPES e 4 mM de cisteína, pH 7,8. Durante a homogeneização o pH foi mantido entre 7,2 e 7,8 através da adição de NaOH 1 mM. Os sedimentos são então ressuspensos em meio contendo 250 mM de sacarose, 10 mM de Hepes (pH 7,2) e 0,3 mM de EGTA.

As mitocôndrias foram então obtidas através de centrifugações diferenciais e purificadas num gradiente de Percoll, contendo 250 mM de sacarose, 0,3 mM de EGTA, 10 mM de HEPES e 0,5 % de BSA (w/v), pH 7,2. O gradiente foi centrifugado a 40000 g por 30 minutos. As mitocôndrias foram coletadas e lavadas 3 vezes em meio contendo 250 mM de sacarose, 0,3 mM de EGTA, 10 mM de HEPES, pH 7,2.

2.2.3- Mitocôndrias de milho

As mitocôndrias de milho (*Zea mays*) foram isoladas de acordo com o protocolo descrito por MARTINS e VERCESI (1985). As sementes de milho foram inicialmente higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 1 hora e lavadas com água destilada estéril. As sementes foram então colocadas para germinar sob papel de filtro úmido e mantidas no escuro por 5 dias a 28°C. Após este período, os coleóptiles foram extraídos e mergulhados numa solução contendo 250 mM sacarose, 50 mM Tris pH 7,6, 1 mM EGTA e 4 mM cisteína. Nesta solução, os coleóptiles foram picotados e submetidos a um polítron (três pulsos de cinco segundos cada) O pH é constantemente monitorado e mantido ao redor de 7,2.

A mistura foi então filtrada em 8 camadas de gaze e submetida a centrifugações diferenciais para o isolamento das mitocôndrias.

2.3- DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL et al., 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN e PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

2.4- MEDIDA DA VARIAÇÃO DE VOLUME MITOCONDRIAL

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. O espalhamento da luz é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (NICHOLLS e ÅKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial associado com a entrada de K^+ resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a conseqüente diminuição do espalhamento de luz. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (MACEDO et al., 1988) foi realizado em um espectrofotômetro Shimadzu Multispec 1501 e um SLM Aminco DW 2000. As amostras foram continuamente misturadas através de um agitador magnético, e a temperatura mantida a 25°C.

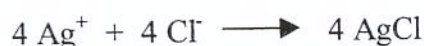
2.5- MEDIDA DO CONSUMO DE O_2 MITOCONDRIAL ESTIMULADO PELO FLUXO DE K^+ ATRAVÉS DA MEMBRANA INTERNA

A respiração mitocondrial foi medida polarograficamente através de um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a um oxígrafo Gilson, em câmara de vidro fechada e termostatzada, com agitação magnética.

O eletrodo tipo Clark compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como acceptor de elétrons, segundo as reações:



Na superfície do ânodo a prata é oxidada, gerando cloreto de prata, segundo as reações:



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O_2 na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo tipo Gilson, onde será feita a leitura.

2.6- DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO MITOCONDRIAL DE H_2O_2

A produção de peróxido de hidrogênio pela organela foi determinada através da oxidação de 30 μM de Amplex Red na presença de 1 U/mL peroxidase de raiz forte (horseradish peroxidase - HRP). A fluorescência da sonda foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 450 nm, respectivamente.

A presença de succinato no meio de reação sustenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da via sensível à antimicina A. Os ânions superóxidos formados são então reduzidos a peróxido de hidrogênio através da enzima superóxido – dismutase (SOD).

Na presença da peroxidase de raiz forte, o Amplex Red reage com o H_2O_2 na estequiometria de 1:1, sendo oxidado a resorufina e ocorrendo assim um aumento da fluorescência da sonda.

2.7- ANÁLISE DOS DADOS

Todos os experimentos mostrados são representativos de pelo menos uma série de três repetições idênticas. As médias, regressões lineares e desvios foram calculados utilizando o software Origin® (Microcal Inc.)



3- RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES

3.1- PERMEABILIDADE DAS MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS A ÍONS K^+

A fim de estudar a permeabilidade das mitocôndrias de plantas a íons K^+ , nós inicialmente incubamos mitocôndrias de batata em tampão hiposmótico contendo diferentes sais de cloreto e inibidores de cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Figura 6). Nestas condições, as mitocôndrias apresentarão um inchamento coloidosmótico acompanhado pela queda de absorbância da suspensão se a membrana interna da organela for permeável aos íons do tampão, uma vez que o Cl^- é transportado para a matriz mitocondrial através do canal aniônico PIMAC (BEAVIS e VERCESI, 1992). Verificamos que a condutância da membrana interna foi decrescente para os íons na seguinte ordem: $K^+ \gg Li > Na^+$, sugerindo uma via de condutância específica para os íons K^+ . A adição de valinomicina, um ionóforo de K^+ , aumenta significativamente o inchamento da organela, indicando que a variação do volume matricial é limitada pelo transporte de K^+ e não pela captação de Cl^- pelo PIMAC.

Para verificar se a permeabilidade a íons K^+ destas mitocôndrias se deve a um $mitoK_{ATP}$, testamos a sua inibição na presença de ATP e $ATP + Mg^{2+}$, já que a presença de íons magnésio é necessária para a inibição do canal em mitocôndrias de mamíferos (GARLID et al., 1996), mas não em mitocôndrias de trigo (Pastore et al., 1999). Observamos que o inchamento pode ser parcialmente inibido por ATP (Figura 7A), de modo semelhante ao observado por PASTORE et al. (1999). Porém, essa inibição não foi observada quando as mitocôndrias de batata foram incubadas na presença de BSA (Figura 7B). Estes experimentos foram reproduzidos nas mesmas condições experimentais, utilizando-se mitocôndrias de tomate (Figura 8) e milho (Figura 9). Estas mitocôndrias apresentam o mesmo efeito das de tubérculos de batata, isto é, inibição parcial do inchamento por nucleotídeos na ausência de BSA no meio de reação e ausência de efeito de ATP nas mitocôndrias incubadas com BSA.

A entrada de K^+ em mitocôndrias de plantas, na ausência de diferença de potencial eletroquímico transmembrânico, pode ocorrer tanto pelo canal de K^+ ou pelo trocador K^+/H^+ , bastante ativo em vegetais (esquema 1). No caso da entrada de K^+ pelo trocador K^+/H^+ , o ciclamento de H^+ é mantido através da reentrada de prótons promovida

pela proteína desacopladora de plantas (PUMP - VERCESI et al., 1995). A presença de BSA remove ácidos graxos do tampão, essenciais para o transporte de H^+ pela PUMP (JEZEK et al., 1996), e impede a ocorrência deste segundo mecanismo de transporte. Como na presença do BSA ainda ocorre um inchamento significativo, mas não inibido por ATP, concluímos que as mitocôndrias de batata são permeáveis a potássio, mas não possuem um $mitoK_{ATP}$.

3.2- EFEITO DA CAPTAÇÃO DE K^+ SOBRE O CONSUMO DE O_2 POR MITOCÔNDRIAS DE BATATA

Para confirmar que o inchamento mitocondrial insensível a ATP observado na presença de BSA se deve a um transportador de K^+ , realizamos medidas de consumo de oxigênio mitocondrial em condições em que há diferença de potencial eletroquímico transmembrânico, o que previne a entrada de K^+ pelo trocador K^+/H^+ . Como pode ser observado na Figura 10, a adição de K^+ a essas suspensões mitocondriais (com respiração e um gradiente de prótons transmembrânico sustentados por succinato) promove um aumento da velocidade respiratória. Este aumento do consumo de oxigênio é devido ao ciclo regulado do íon (Garlid, 1996), isto é, a captação dos íons pelos canais de K^+ e sua posterior troca por H^+ através do trocador K^+/H^+ , bastante ativo em mitocôndrias de plantas (Diolez et al., 1995). Assim, a diminuição do $\Delta\psi$ resulta num aumento da velocidade respiratória na tentativa da organela reestabelecer este potencial.

3.3- DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN DOS CANAIS POR ÍONS K^+

A determinação experimental da constante de Michaelis – Menten (K_m) dos canais de K^+ de mitocôndrias de tubérculos de batata foi obtida a partir da medida da velocidade de consumo de oxigênio na presença de diferentes concentrações de KCl (Figura 11A). A partir dos valores das velocidades respiratórias obtidas, traçou-se um gráfico duplo recíproco de cinética de transporte do íon (Figura 11B). Os valores da

constante de Michaelis – Menten e a velocidade máxima de consumo de O₂ foram obtidos através da equação da reta do gráfico:

$$\frac{1}{dV_{resp}} = a + b \left(\frac{1}{[K^+]} \right)$$

onde: dV_{resp} = variação da velocidade respiratória.

$[K^+]$ = concentração de potássio.

A resposta respiratória apresentou uma relação hiperbólica com a concentração de íons K⁺, sugerindo a existência de um canal específico para o transporte do íon, com Km em torno de 25.25 mM (média = 29.584, SEM ± 1.628).

3.4- INIBIÇÃO DOS CANAIS DE K⁺ EM MITOCÔNDRIAS VEGETAIS POR QUININA

Confirmando os resultados de inchamento mitocondrial, o efeito do K⁺ na respiração não foi alterado pela adição de 1 mM de ATP (Figura 12), indicando que este canal presente em mitocôndrias de batata não é um mitoK_{ATP}.

Para uma melhor caracterização deste transporte de K⁺ em mitocôndrias de batata, nós testamos o efeito de vários compostos que conhecidamente regulam os canais de K⁺ mitocondriais e da membrana plasmática já descritos (Figura 13). Verificamos que o canal não é regulado pelos inibidores farmacológicos de mitocôndrias de mamíferos como o 5-hidroxidecanoato ou glibenclamida (JABUREK et al., 1998); NADH, um inibidor fisiológico dos canais em mitocôndrias de plantas (PASTORE et al., 1999); ou ainda reagentes tíóicos como o NEM e a diamida, que regulam os canais da membrana plasmática (GRIGORIEV et al., 1999). Entretanto, o canal foi inibido por quinina, um inibidor de amplo espectro sob os canais presentes nas membranas biológicas (Beavis, 1988). Na Figura 14A observa-se que a velocidade respiratória de mitocôndrias em condições controle é progressivamente diminuída pela presença de concentrações crescentes de quinina no meio de reação. A partir dos valores de velocidade respiratória foi

determinada experimentalmente a constante de inibição dos canais de K^+ pela quinina (Figura 14B) de modo análogo ao cálculo da constante de Michaelis- Menten.

A fim de excluir a possibilidade do composto atuar na inibição da respiração e não na captação do íon, nós testamos o efeito do composto em experimentos de inchamento mitocondrial na ausência da respiração, demonstrando que a quinina está agindo sob os canais de K^+ (Figura 15). O inchamento da organela também foi monitorado em meio de tiocianato de potássio (KSCN) excluindo-se a possibilidade do composto ter ação sob o PIMAC (Figura 16).

3.5- INIBIÇÃO DA GERAÇÃO MITOCONDRIAL DE H_2O_2 POR K^+

A entrada dos íons K^+ na matriz mitocondrial e sua posterior troca por H^+ através do trocador K^+/H^+ faz com que ocorra uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial e conseqüente aumento da respiração. Como visto na Figura 17, a produção de H_2O_2 pelas mitocôndrias de batata em meio de sacarose na presença de succinato e rotenona diminui sensivelmente após a adição de 20 mM de KCl. A entrada de K^+ nas mitocôndrias permite que os elétrons fluam mais rápido através da cadeia respiratória, evitando a formação de ânion superóxido ao nível da coenzima Q e complexo I (PASTORE et al., 1999). A diminuição da vida útil da coenzima Q provavelmente previne a formação do ânion superóxido, que é convertido a peróxido de hidrogênio através da enzima superóxido – dismutase (SOD) (MCCORD e FRIDOVICH, 1969).



4- DISCUSSÃO

O íon K^+ é um elemento essencial às células vegetais, sendo o cátion mais abundante na matriz mitocondrial e citoplasma, onde sua concentração é estimada em 140 mM (HANSON, 1985). O íon desempenha uma função importante na osmorregulação da organela, haja vista que o volume matricial é alterado em resposta a passagem de K^+ através da membrana interna. A causa primária da entrada do cátion na matriz é a difusão passiva, uma vez que a fosforilação requer altos valores de potencial de membrana para a produção de ATP, fazendo com que ocorra um influxo eletroforético do íon. Mais recentemente, foram identificados canais de K^+ altamente sensíveis a nucleotídeos de adenina ($mitoK_{ATP}$), similares aos presentes na membrana plasmática, que medeiam a entrada do íon para o interior da organela. A saída do cátion é catalisada através do trocador K^+/H^+ , cuja existência foi prevista inicialmente por MITCHELL (1961) e depois demonstrada por BRIERLEY (1978). Estes dois sistemas de transporte de K^+ , atuando em conjunto, controlam a concentração do íon na matriz mitocondrial (GARLID, 1980), possibilitando assim a manutenção do volume da organela e, conseqüentemente, regulando processos fisiológicos. O ciclo regulado do íon (GARLID, 1996) nas mitocôndrias vegetais permite ainda um desacoplamento entre a respiração e a fosforilação, fazendo com que a energia química contida no $\Delta\mu H^+$ seja dissipada na forma de calor.

Interessados nestes canais, nós decidimos estudá-los em maior detalhe utilizando mitocôndrias de plantas onde os outros sistemas dissipadores de energia têm sido extensivamente estudados. Assim, nós iniciamos uma série de experimentos a fim de caracterizar e quantificar o transporte do íon em mitocôndrias de batata. Este estudo estendeu-se posteriormente a outras espécies vegetais (tomate e milho), obtendo-se resultados similares aos obtidos em tubérculos de batata.

A técnica do inchamento é empregada no estudo de diversos sistemas de transporte mitocondriais, como por exemplo o trocador K^+/H^+ (BEAVIS et al., 1993; BRIERLEY et al., 1994). Utilizando-se este método, obteve-se a primeira evidência da presença de um canal específico para o transporte de K^+ em mitocôndrias de batata. Como observado na Figura 6, um inchamento bastante significativo da organela ocorre em tampão contendo KCl, mas não em outros sais de cloreto, como o de Na^+ e Li^+ . Uma vez que a permeabilidade da membrana interna a estes compostos é baixa, sugere-se que esta entrada

se dê essencialmente através de canais presentes na membrana mitocondrial interna da organela. Este inchamento em meio contendo KCl foi ainda incrementado pela presença de um ionóforo de K^+ , a valinomicina, indicando que este transporte possui uma velocidade menos pronunciada que a entrada de Cl^- pelo PIMAC.

A confirmação da presença de um transportador específico para o K^+ foi obtida através de medidas do consumo de O_2 estimulado pela entrada do íon. A relação hiperbólica encontrada entre a entrada do íon e o aumento da respiração indica a presença de canais eletroforéticos para a entrada do íon e não um simples vazamento iônico.

O passo seguinte do trabalho foi verificar a regulação destes canais presentes nas mitocôndrias de tubérculos. Inesperadamente, o canal mostrou-se insensível a nucleotídeos, moduladores fisiológicos e farmacológicos que regulam o canal de K^+ sensível a ATP (mitoK_{ATP}) em outros modelos (BAJGAR et al., 2000; KOWALTOWSKI et al., 2001; PASTORE et al., 1999). Estes resultados indicam que o presente canal não possui regulação similar ao mitoK_{ATP}, sugerindo a existência de um novo transportador do íon na membrana mitocondrial interna destas mitocôndrias.

Além da ausência de sensibilidade a estes compostos, outro ponto que apóia a idéia de um novo canal refere-se à cinética de transporte do íon. O mitoK_{ATP} presente nas mitocôndrias de trigo apresenta um valor de K_M por K^+ de aproximadamente 2 mM (PASTORE et al., 1999), enquanto foram obtidos valores de $27.9 \text{ mM} \pm 1.628$ em nosso sistema. Uma vez que a concentração citosólica de K^+ está em torno de 140 mM, este canal pode estar operando em condições fisiológicas.

Apesar da insensibilidade aos compostos mencionados acima, o canal apresentou uma inibição dose-dependente por quinina, uma droga catiônica anfifílica, que possui um efeito inibitório sob uma grande variedade de canais presentes nas membranas biológicas. Esta inibição se dá provavelmente através de uma ligação inespecífica do composto à unidade reguladora mitoKIR do canal de K^+ , impedindo o fluxo do íon através da proteína.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTR
SEÇÃO CIRCULAN

As espécies reativas de oxigênio são naturalmente geradas nas células aeróbicas como subprodutos de reações de metabólitos e, sobretudo, pela respiração. Inibidores do transporte de elétrons, particularmente do complexo bc1, como a antimicina A, aumentam a produção mitocondrial de EROs através do acúmulo da semiquinona, a maior fonte de geração de ânion superóxido na mitocôndria (TURRENS, 1977; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Por outro lado, protonóforos e sistemas dissipadores de energia, como a PUMP e a AOX, diminuem a produção destes compostos através do aumento da velocidade respiratória. Este aumento provoca uma diminuição do tempo de vida da semiquinona e diminuição da tensão de oxigênio nos tecidos, resultando numa diminuição da probabilidade de doação de elétrons da UQ^- para o O_2 . Nossos experimentos mostram que o ciclo de K^+ também pode mediar o desacoplamento, proporcionando diminuição bastante significativa da produção de EROs, como observado em outros modelos (SCHULACHEV, 1996).

Experimentos de microcalorimetria (CHAIMOVICH, BIANCONI, KOWALTOWSKI, ANDRADE, resultados não publicados) demonstraram que o aumento da condutância de H^+ devido ao ciclo de K^+ promove um acréscimo na quantidade de calor liberado pela organela. De acordo com nossos dados, este efeito do K^+ não foi inibido por ATP. Paralelamente às medidas calorimétricas, quantificou-se o consumo de O_2 mitocondrial, obtendo-se uma correlação linear entre a dissipação de calor e consumo de O_2 pela organela. Acreditamos que como a PUMP, o canal possa estar envolvido em eventos fisiológicos que requerem termogênese, tais como o amadurecimento de frutos, exalação de perfume pelas flores e germinação de sementes. Estes fenômenos apresentam como evento inicial um aumento da velocidade respiratória associada à produção de calor (DAY e WISKICH, 1995; KRAB, 1995).

A presença de um novo canal com a função primária dissipativa na membrana interna de mitocôndrias de plantas é uma surpresa, uma vez que dois sistemas distintos já foram descritos (PUMP e AOX). Neste sentido, uma investigação mais detalhada da ação e regulação de cada via no metabolismo vegetal, bem como suas atuações nos diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, tornam-se imprescindíveis para uma melhor caracterização destes mecanismos dissipadores de energia.

Uma vez que a ativação dos canais de K^+ gera calor, testou-se o efeito da exposição ao frio neste transporte (resultados não mostrados). Nós observamos que a refrigeração dos tubérculos de batata por dois ou três dias não apresentou efeito sob o transporte do K^+ , não ocorrendo mudança da afinidade do canal pelo cátion ou alteração de sua atividade. Assim, a geração de calor pode não ser a função primária destes canais.

Uma hipótese para a existência de vários sistemas dissipadores de energia nas mitocôndrias de plantas é a idéia que estes mecanismos são necessários para a regulação metabólica das plantas (SLUSE e JARMUSZKIEWICZ, 2002). Além de sua função catabólica, estas mitocôndrias também possuem funções anabólicas, sobretudo durante o dia. Os vegetais são autótrofos e necessitam assimilar nitrogênio para a síntese de macromoléculas. Os esqueletos carbônicos requeridos neste processo são derivados do ciclo do ácido cítrico. Conseqüentemente, este ciclo necessita reverter-se independente do estado bioenergético da célula. Assim, as mitocôndrias destas células fotossintetizantes possuem vários sistemas dissipativos para lidar com o excesso de equivalentes redutores, fazendo com que ocorra a transferência de elétrons através da cadeia respiratória sem a concomitante produção de ATP, permitindo que o ciclo reverta-se. Estudos complementares referentes à regulação do transporte endógeno de K^+ e sua interação com os outros sistemas dissipadores de energia ajudarão a determinar a função exata de cada mecanismo.



5- CONCLUSÕES

1. Nossas descobertas experimentais sugerem a existência de um canal específico a íons K^+ na membrana mitocondrial interna de tubérculos de batata, tomate e milho.
2. Diferentemente do observado em outros modelos vegetais (PASTORE et al., 1999), este transporte não foi inibido por ATP ou outros compostos reguladores de canais de K^+ previamente descritos (BAJGAR et al., 2000; KOWALTOWSKI et al., 2001).
3. Os canais de K^+ presentes nestas mitocôndrias vegetais foram completamente inibidos por quinina.
4. A abertura dos canais de K^+ em plantas possibilita um aumento da velocidade respiratória e conseqüente diminuição da produção das espécies reativas de oxigênio.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRA
SEÇÃO CIRCULANTE

***6- REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling protein-sustained respiration during post harvest ripening of tomato fruit. **Plant Physiol**, 119: 1323-1329, 1995.
- BAJGAR, R.; SEETHARAMAN, S.; KOWALTOWSKI, A.J.; GARLID, K.D.; PAUCEK, P. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP- sensitive potassium channel in brain. **J Biol Chem**, 276: 33369-33374, 2001.
- BEAVIS, A.D. On the inhibition of the mitochondrial inner membrane anion uniporter by cationic amphiphiles and other drugs. **J Biol Chem**, 264: 1508-1515, 1998.
- BEAVIS, A.D.; VERCESI, A.E. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. **J Biol Chem**, 267: 3079-3087, 1992.
- BEAVIS, A.D.; LU, Y.; GARLID, K.D. On the Regulation of K^{+} uniport in intact mitochondria by adenine nucleotides and nucleotide analogs. **J Biol Chem**, 268: 997-1004, 1992.
- BELISLE, E.; KOWALTOWSKI, A.J. Opening of mitochondrial K^{+} channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. **J Bioener Biomem**, 34: 285-298, 2002.
- BERTHOLD, D.A.; ANDERSSON, M.E.; NORDLUND, P. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. **Biochim Biophys Acta**, 1460: 241-254, 2000.
- BIENENGRAEBER, M.; ECHTAY, K.S.; KLINGENBERG, M. H^{+} transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. **Biochemistry**, 37: 3-8, 1998.
- BOSS O., SAMEC, S., PAOLONI-GIACOBINO, A., ROSSIER, C., DULLOO, A., SEYDOUX, J. et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett**, 408: 39-42, 1997.
- BRIERLEY, G.P.; JURKOWITZ, M.; CHAVEZ, E.; JUNG, D.W. Energy-dependent contraction of swollen heart mitochondria. **J Biol Chem**, 252: 7932-7939, 1977.

- CLARKSON, A.B.; BIENEN, E.J.; POLLAKIS, G.; GRADY, R.J. Respiration of blood-stream forms of the parasite *Trypanosoma brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. **J Biol Chem**, 264: 17770-17776, 1989.
- COSTA, A.D.T.; NANTES, I.L.; JEZEK, P.; LEITE, A.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. **J Bioener Biomem**, 31: 527-533 1999.
- DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. **J Bioenerg Biomembr**, 27: 379-385, 1995.
- DIOLEZ, P.; MOREAU, F. Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, 806: 56-63, 1985.
- DIWAN, J.J. Effect of quinine on mitochondrial K^+ and Mg^{2+} flux. **Bioch Biophys Res Comm**, 135: 830-836, 1986.
- SANTOS, P. dos; KOWALTOWSKI, A.J.; LACLAU, M.N.; SEETHARAMAN, S.; PAUCEK, P.; BOUDINA, S. et al. Mechanism by which opening ATP- sensitive K^+ channel protects the ischemic heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 238: H1-H12, 2002.
- DULLOO, A.G.; SAMEC, S. Uncoupling Proteins: do they have a role in body weight regulation? **News Physiol Sci**, 15: 313-318, 2000.
- FERRANTI, R.; DA SILVA, M.M.; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel opening decreases reactive oxygen species generation. **FEBS Lett**, 26936: 1-5, 2003.
- FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C. et al. Uncoupling protein-2, a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature Genetics**, 15: 383-389, 1997.
- GARLID, K.D. Cation transport in mitochondria - the potassium cycle. **Biochim Biophys Acta**, 1275: 123-126, 1996.
- GARLID, K.D. Unmasking the mitochondria K^+/H^+ exchanger: swelling-induced K^+ -loss. **Biochem Biophys Commum**, 83: 1450-1455, 1978.

- GARLID, K.D.; PAUCEK, P.; YAROV-YAROVY, V.; SUN, X.; SCHINDLER, P.A. The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. **J Biol Chem**, 271: 8796-8799, 1996.
- GARLID, K.D.; OROSZ, D.E.; MODRIANSKY, M.; VASSANELLI, S.; JEZEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J Biol Chem**, 271: 2615-2620, 1996.
- GONG, D.W.; HE, Y.; KARAS, M.; REITMAN, M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β_3 -adrenergic agonists, and leptin. **J Biol Chem**, 272: 24129-24132, 1997.
- GORNALL, A.G.; BARDWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J Biol Chem**, 177: 751, 1949.
- GRIGORIEV, S.M.; SKARGA, Y.Y.; MIRONOVA, G.D.; MARINOV, B.S. Regulation of mitochondrial K_{ATP} channel by redox agents. **Biochim Biophys Acta**, 1410: 91-96, 1999.
- GÜÇLÜ, J.; PAULIN, A.; SOUDAIN, P. Changes in polar lipids during ripening and senescence of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum*): relation to climateric and ethylene increases. **Plant Physiol**, 77: 413-419, 1989.
- GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GAVIN, C.E. Mitochondria calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am J Physiol**, 267: C313-C339, 1994.
- HALESTRAP, A.P. Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume. **Biochem Soc Trans**, 22: 522-529, 1994.
- HANSON, J.B. In **Encyclopedia of Plant Physiology. Higher Plant Cell Respiration**. Springer, Berlin: Ed. Douce, R.; Day, D.A., 1985. p. 248-280.
- HUQ, S.; PALMER, J.M. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. **FEBS Lett**, 95: 217-220, 1978.
- INOUE, I.; NAGASE H.; KISHI, K.; HIGUTI, T. ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondria inner membrane. **Nature**, 352: 244-247, 1991.

- JABŮREK, M.; YAROV-YAROVY, V.; PAUCEK, P.; GARLID, K.D. State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecane. **J Biol Chem**, 273: 13578-13582, 1998.
- JABŮREK, M.; VARECHA, M.; JEŽEK, P.; GARLID, K. Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. **J Biol Chem**, 276: 31897-31905, 2001.
- JARMUSKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE, F.E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. **J Biol Chem**, 274: 23198-23202, 1999.
- JARMUSKIEWICZ, W.; MILANI, G.; FORTES, F.; SCHEIBER, A.Z.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. **FEBS Lett**, 467: 145-149, 2000.
- JEZEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Evidence for an anion- translocating plant uncoupling protein in potato mitochondria. **J Biol Chem**, 271: 32743-3278, 1996.
- JEZEK, P.; COSTA, A.D.; VERCESI, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **J Biol Chem**, 272: 24272-24278, 1997.
- JEZEK, P.; MODRIANSKY, M.; GARLID, K.D. Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. **FEBS Lett**, 408: 161-165, 1997.
- JUNG, W. D.; BRIERLEY, P.G. The permeability of uncoupled heart mitochondria to potassium ion. **J Biol Chem**, 259: 6904- 6911, 1984.
- KAPLAN, R.S.; PENDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, 212: 279-288, 1983.
- KLINGENBERG, M. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. **TIBS**, 15: 108-112, 1990.
- KLINGENBERG, M.; NELSON, D.R. Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. **Biochim Biophys Acta**, 1187: 241-244, 1994.

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRA SEÇÃO CIRCULANTE

- KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Activation of the potato plant uncoupling protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Lett**, 425: 213- 216, 1998.
- KOWALTOWSKI, A.J.; SEETARAMAN, S.; PAUCEK, P.; GARLID, K.D. Bioenergetics consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 280: H649- H657, 2001.
- KRAB, K. Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative oxidase in plant respiration. **J Bioenerg Biomembr**, 27: 387-396, 1995.
- KRAMER, R. Structural and functional aspects of the phosphate carrier from mitochondria. **Kidney Int**, 49: 974-952, 1996.
- LAMBOWITZ, A.M.; SABOURIN, J.R.; BERTRAND, H.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Mol Cell Biol**, 1989:1362-13644, 1989.
- MAATHUIS, F.J.M.; ICHILDA, A.M.; SANDERS, D.; SCHOEDER, J. Roles of higher plant K^+ channels. **Plant Physiol**, 114: 1141-1149, 1997.
- MACEDO, D.V.; FERRAZ, V.L.; PEREIRA DA SILVA, L.; VERCESI, A.E. **Integration of Mitochondrial Function. Ca^{2+} -dependent $NAD(P)^+$ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria.** New York: Ed. J. Lemasters Plenum, 1988. p. 535-542.
- MAO, W.; YU, X.X.; LI, A.Z.W.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. **FEBS Lett**, 443: 326-330, 1999.
- MANON, S.; ROUCOU, X.; RIGOLET, M.; GUÉRIN, M. Stimulation of oxidative phosphorylation by electrophoretic K^+ entry associated to an electroneutral K^+/H^+ exchange in yeast mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, 1231: 282-288, 1995.
- MANON, S., GUÉRIN, M. Evidence for three different electrophoretic pathways in yeast mitochondria: ion specificity and inhibitor sensitivity. **J Bioenerg Biomembr**, 25: 671-678, 1992.

- MARTINS, I.S., VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. **Biochem Biophys Res Comm**, 129: 943-948, 1985.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. **J Biol Chem**, 22: 6049-6055, 1969.
- MIRONOVA, G.D.; SKARGA Y.Y.; GRIGORIEV, S. M.; NEGODA, A. E.; KOLOMYTKIN, O.V.; MARINOV, B.S. Reconstitution of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel into bilayer lipid membrane. **J Bioenerg Biomembr**, 31: 159-163, 1999.
- MIROUX, B.; FROSSARD, V.; RAIMBAULT, S.; RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. **EMBO J**, 12: 3739-3745, 1993.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148, 1961.
- MOLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G.; FREDLUND, K.M. NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductases in plant mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 25: 377-384, 1993.
- MOORE, A.L.; BONNER, W.D.; RICH, P.R. The determination of the proton-motive force during cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 186: 298-306, 1978.
- NICHOLLS, D.G.; BERNSON, V.S.; HEATON, G.M. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. **Experientia Suppl**, 32: 89-93, 1978.
- NICHOLLS, D.G., FERGUSON, S.J. (1982) **Bioenergetics 2**. Academic Press Inc. London, UK.
- PASTORE, D.; STOPPELLI M.C.; DI FONZO, N.; PASSARELLA, S. The existence of the K^+ channel in plant mitochondria. **J Biol Chem**, 274: 26683-26690, 1999.

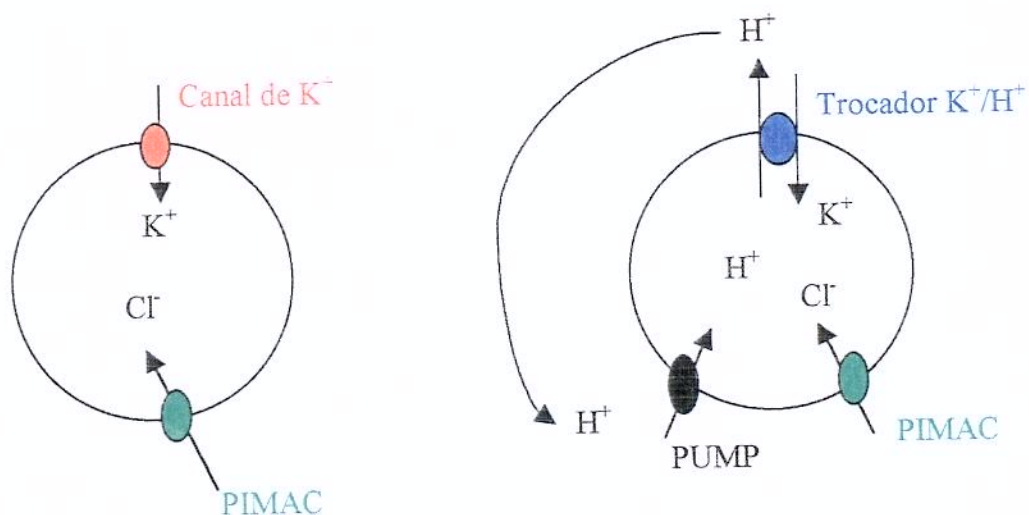
- PAUCEK, P.; MIRONOVA, G.; MAHDI, F.; BEAVIS, A.D.; WOLDEGIORGIS G.; GARLID, K.D. Reconstitution and partial purification of the glybenclamide-sensitive, ATP-dependent K channel from rat liver and beef heart mitochondria. **J Biol Chem**, 266: 26062-26069, 1992.
- PAUCEK, P.; YAROV-YAROVY, V.; SUN, X.; GARLID, K.D. Inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by long-chain acyl-coa esters and activation by guanine nucleotides. **J Biol Chem**, 271: 32084-32088, 1996.
- PETRUSSE, E.; CASOLO, V.; BRAIDOT, E.; CHIANDUSSI, E.; MACRÌ, F.; VIANELLO, A. Cyclosporin A induces the opening of a potassium- selective channel in higher plant mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 33: 107-117, 2000.
- POPOV, V.N.; SIMONIAN, R.A.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. **FEBS Lett**, 415: 87-90, 1997.
- RASCIO, A.; PLATINI, C.; SCAFALDI, G.; TONTI, A.; DI FONZO, N. The accumulation of solutes and water binding strength in durum wheat. **Physiol Plantarum**, 90: 715-721, 1994.
- RICH, P.R. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase **FEBS Lett**, 96: 252-256, 1978.
- ROUET-MAYER, M.A.; VALENTOVA, O.; SIMOND-COTE, E.; DAUSSANT, J.; THEVENOT, C. Critical analysis of phospholipid hydrolyzing activities in ripening tomato fruits. Study by spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography. **Lipids**, 30: 739-746, 1995.
- SAKAJO, S.; MINAGAWA, N.; KOMIYAMA, T.; YOSHIMOTO, A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **Biochim Biophys Acta**, 1090: 102-108, 1991.

- SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M. et al. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. **J Biol Chem**, 273: 34611-34615, 1998.
- SCHONBAUM, G.R.; BONNER, W.D. JR.; STOREY B.T.; BAHR J.T. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. **Plant Physiol**, 47: 124-128, 1971.
- SCHWANSTECHER, M.; SIEVERDING, C.; DÖRSCHNER, H.; GROSS, I.; BRYAN, L.D.; SCHWANSTECHER, C.; BRYAN, J. (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. **EMBO J**, 19: 5529- 5535, 1998.
- SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L. Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. **Plant Cell**, 7: 821-831, 1995.
- SKULACHEV, V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Lett**, 294: 158-162, 1991.
- SKULACHEV, V.P. Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanism to eliminate superoxide-production mitochondria and cell. **FEBS Lett**, 397: 7-10, 1996.
- SKULACHEV, V.P. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. **J. Bioenerg. Biomembr**, 31: 431-445, 1996.
- SLUSE, F.E.; ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; VERCESI, A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS Lett**, 433: 237-240, 1998.
- UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. **Plant Physiol**, 103: 845-854, 1993.
- UMBACH, A.L.; WISKICH, J.T.; SIEDOW, J.N. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. **FEBS Lett**, 348: 181-184, 1994.

- VAN DEN BERGEN, C.M.V.; WAGNER, A.M.; KRAB, K.; MOORE, A.L. The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone-reducing pathways. **Eur J Biochem**, 226: 1071-1078, 1994.
- VIDAL-PUIG, A.; SOLANES, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J.S.; LOWELL, B.B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, 235: 79-82, 1997.
- VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, 357: 24, 1995.
- YAMADA, M.; ISOMOTO, S.; MATSUMOTO, S.; KONDO, C.; SHINDO, T.; HORIO, Y.; KURACHI, Y. (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. **J Physiol**, 499: 715-720, 1997.
- YAROV-YAROVY, V.; PAUCEK, P.; JABUREK, M.; GARLID, K.D. The nucleotide regulatory sites on the mitochondria K_{ATP} channel face of cytosol. **Biochim Biophys Acta**, 1321: 128-136, 1997.
- WALKER, D. **The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis**. University of Sheffield Print Unit, Sheffield, 1987. p. 1-16.
- WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. **J Biol Chem**, 269: 2508-2515, 1994.
- WISEMAN, T.; WILLINSTON, S.; BRANDTS, J.T. (1989) **Arch Biochem Biophys**, 114: 1137-1140, 1989.



7- FIGURAS



Esquema 1 – Inchamento de mitocôndrias em KCl. Em mitocôndrias vegetais incubadas em solução hiposmóticas de KCl, íons Cl^- entram na matriz mitocondrial através do canal aniônico PIMAC (Beavis e Vercesi, 1992). O K^+ pode tanto entrar pelo canal de K^+ como pelo trocador de K^+/H^+ , desde que o transporte de H^+ seja mantido pela proteína desacopladora PUMP (Vercesi et al., 1995).

Espaço intermembranas

Matriz

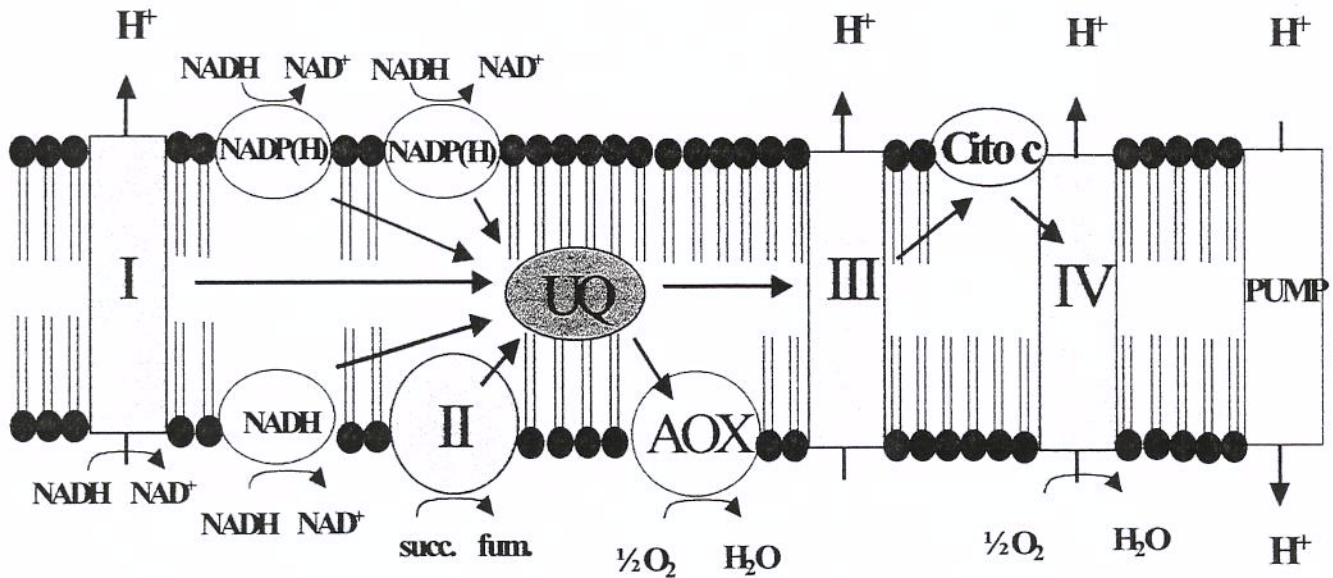
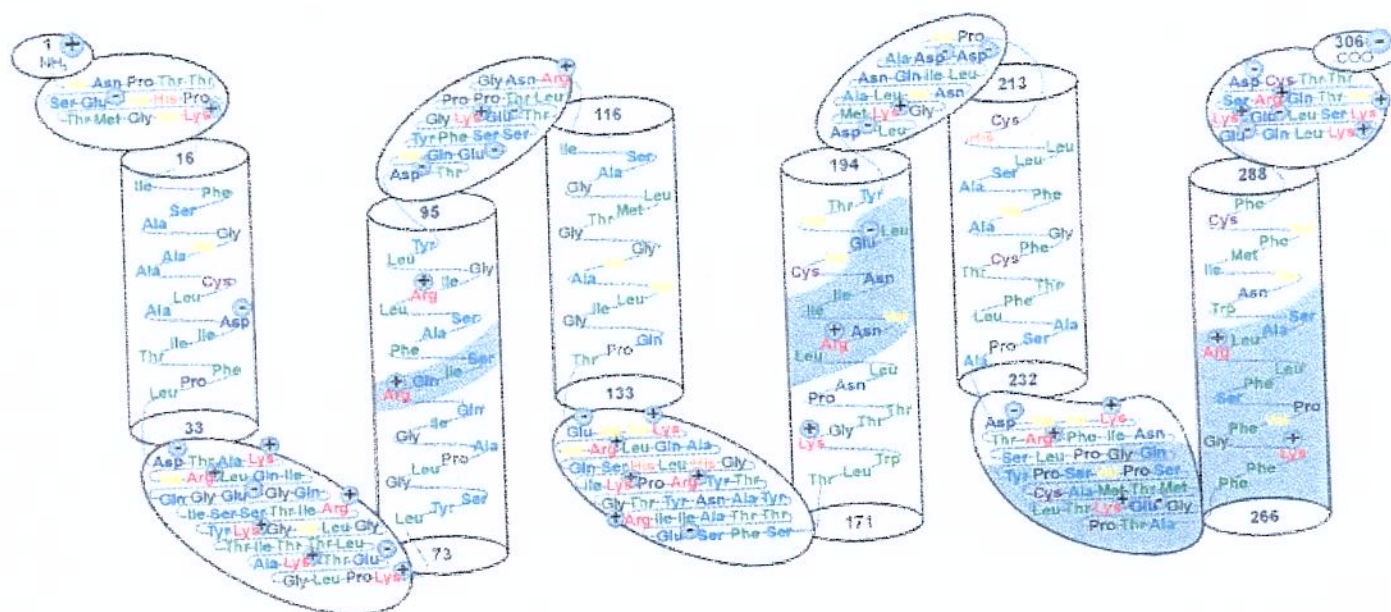


Figura 1 – Representação esquemática da cadeia respiratória de plantas. Além das proteínas de transporte de elétrons comuns a todos os seres vivos, observa-se a presença de três NAD(P)H desidrogenases adicionais que não são conversores de energia, da oxidase alternativa e da PUMP.

Espaço internembranas



Matriz

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da proteína desacopladora (UCP) segundo JEZEK et al., 1998. As seis α – hélices estão representadas pelos cilindros. As áreas sombreadas são os *loci* de interação entre a proteína e os nucleotídeos de purina.

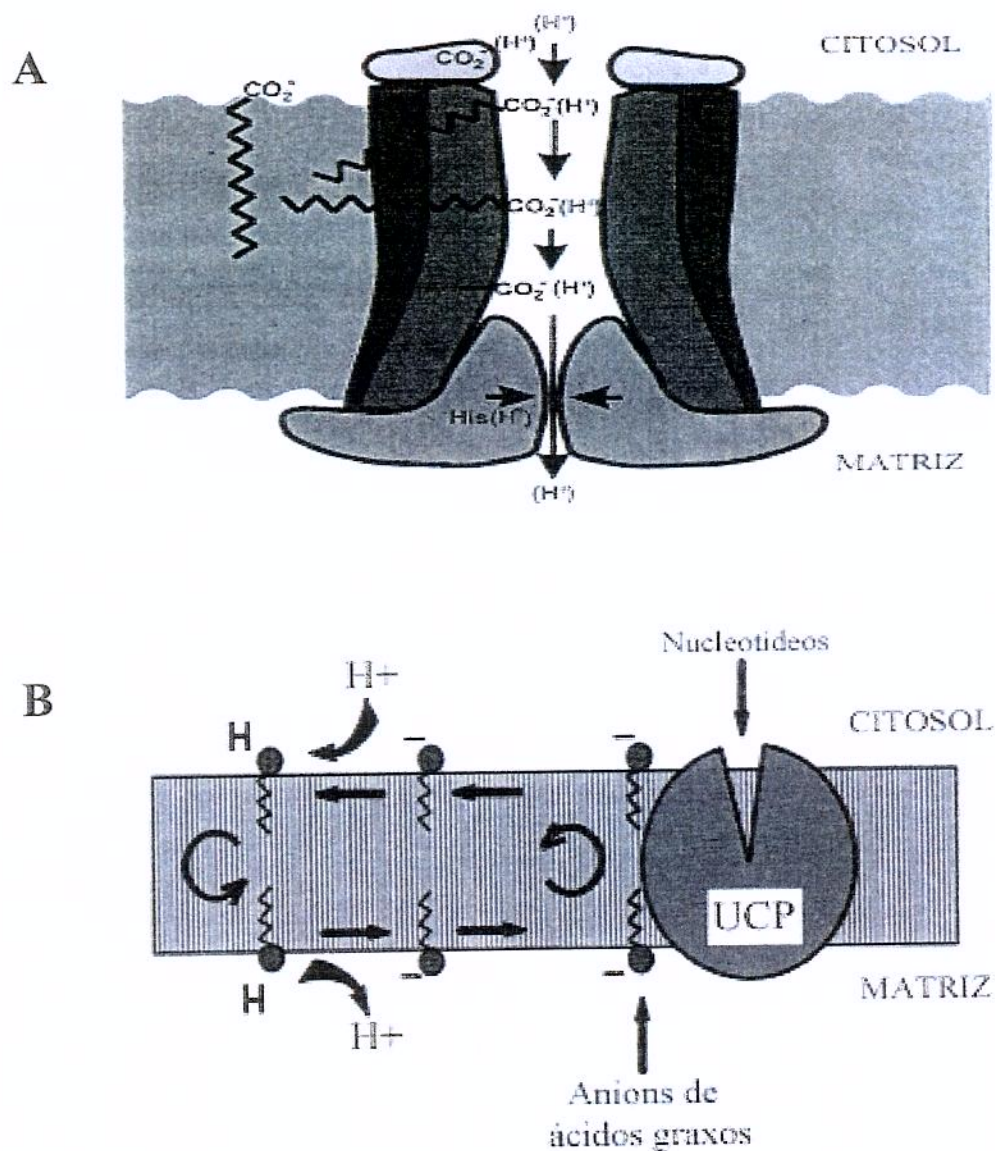


Figura 3 – Modelos propostos de mecanismo de ação da UCP1. No painel A (KLINGENBERG, 2001) a UCP1 funciona como transportador de H^+ . No painel B (GARLID, 2001) a UCP1 age como um carreador de ânions de ácidos graxos da matriz para o citosol. Os ácidos graxos são então protonados retornando à matriz através do mecanismo de “flip-flop”.

**Espaço
intermembranas**

**Membrana
mitocondrial
interna**

Matriz

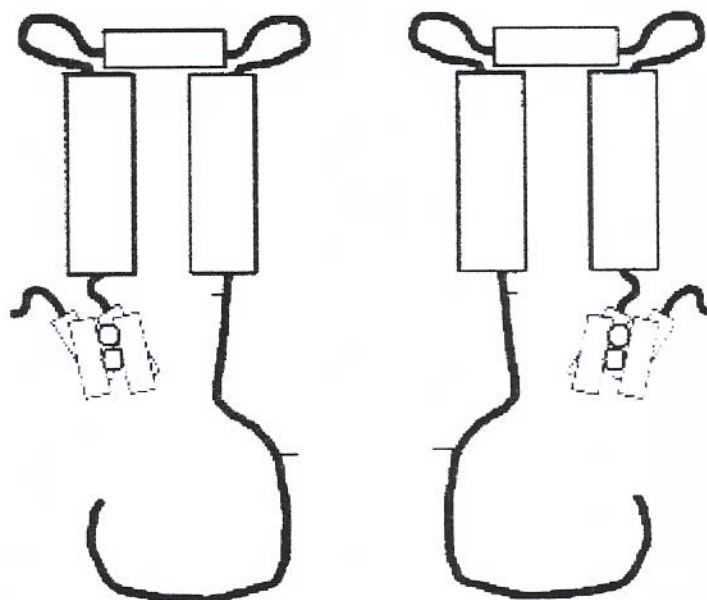


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura da oxidase alternativa segundo SLUSE e JARMUSZKIEWICZ, 1998. Cada monômero possui duas porções hidrofóbicas que ligam a proteína à bicamada lipídica (retângulos grandes), um sítio ativo formado por um centro diférrico (círculos), ligado a quatro hélices empacotadas (retângulos pequenos) que constituem a região hidrofílica da proteína.

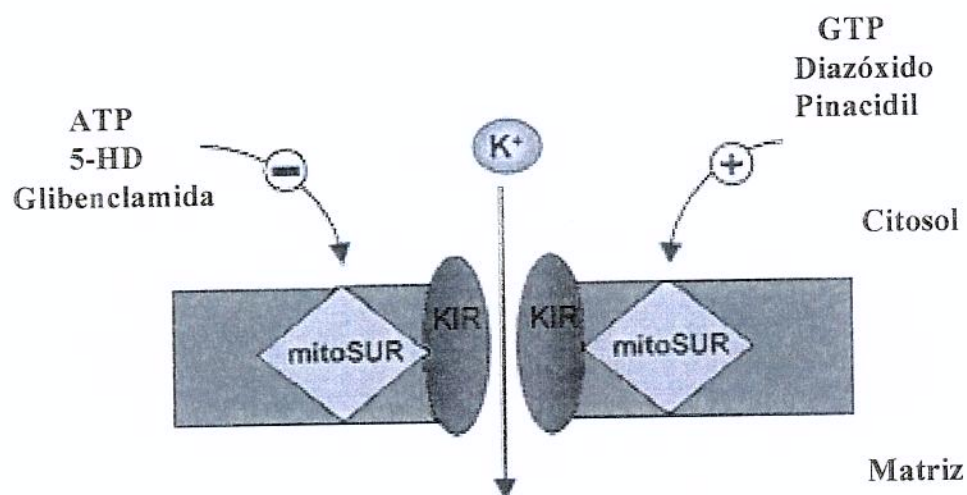


Figura 5 – Representação esquemática do canal de K⁺ segundo SZEWCZYK e WOJTCZAK, 2002 (modificada). Os círculos representam as subunidades mitoKIR, que formam o poro e a unidade regulatória do canal. Os trapézios constituem as subunidades receptoras de sulfoniluréia (mitoSUR) e os retângulos a membrana mitocondrial interna. As setas com os sinais positivo e negativo referem-se aos abridores e inibidores do canal, respectivamente.

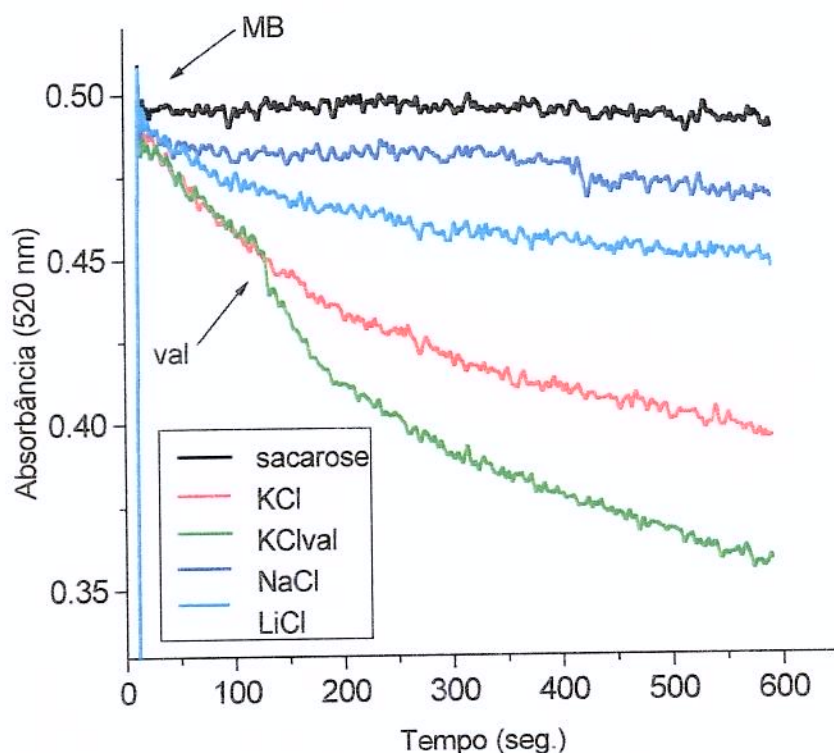


Figura 6 - Permeabilidade de mitocôndrias de batata a íons K^+ . Mitocôndrias isoladas de batata (MB – 0,2 mg/mL) foram adicionadas a tampão de HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo 50 mM dos sais indicados, antimicina 2 μ M e oligomicina 1 μ g/mL. Valinomicina (val – 1 μ M) foi adicionada onde indicado pela seta. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

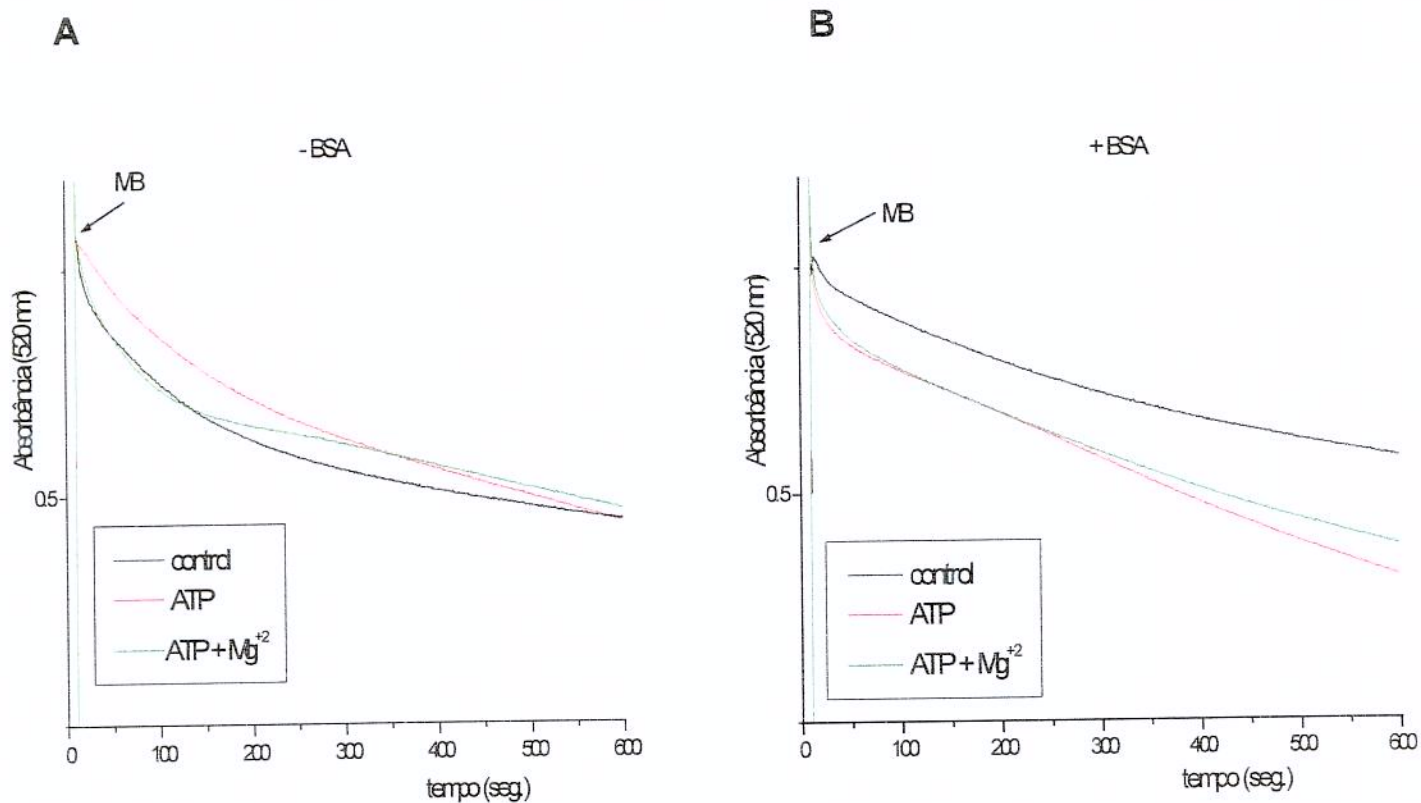


Figura 7 – Efeito de ATP e Mg^{2+} no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^+ . Mitocôndrias isoladas de batata (MB – 0,2 mg/mL) foram adicionadas a tampão HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo 50 mM de KCl, antimicina 2 μ M e oligomicina 1 μ g/ mL, na presença de 1% de BSA, ATP 1 mM e/ou Mg^{2+} , conforme indicado. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

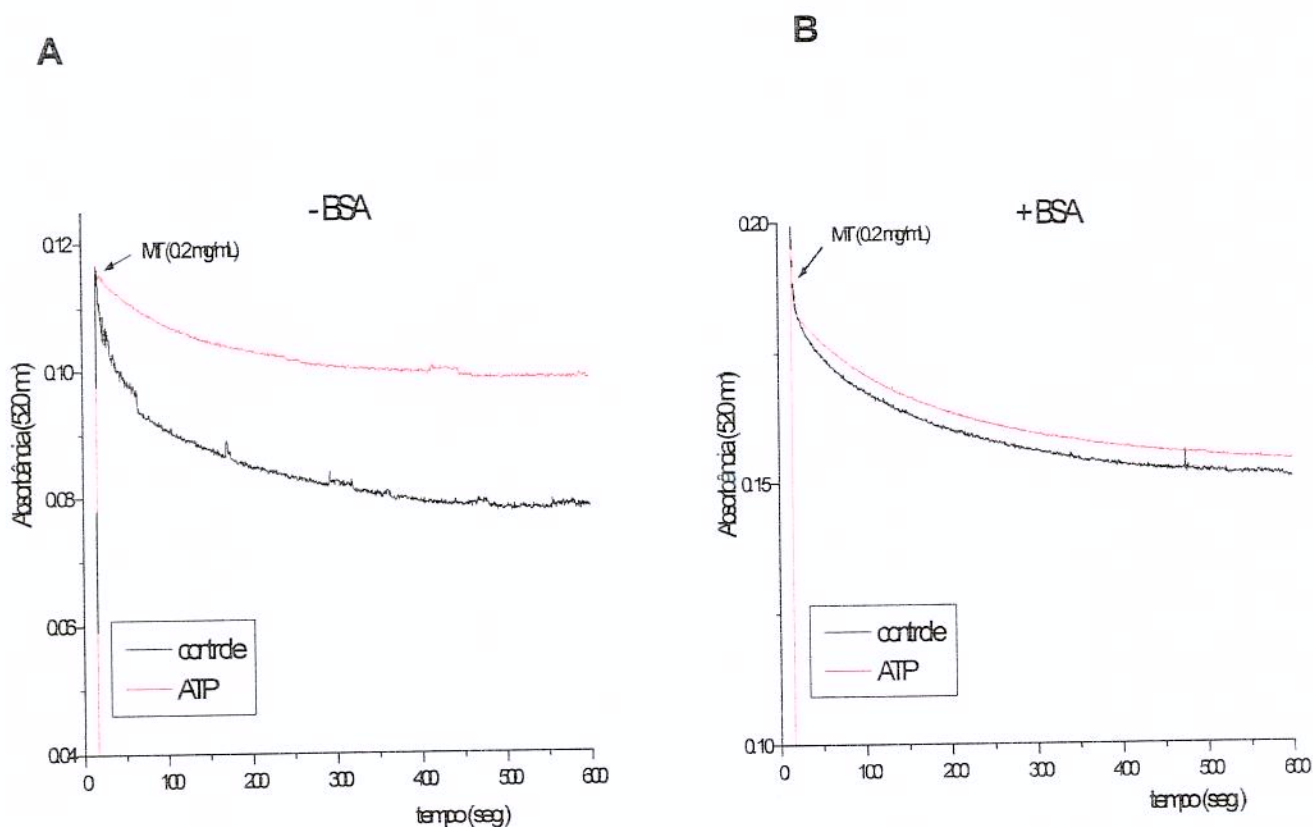


Figura 8 – Efeito do ATP no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^+ .

Mitocôndrias isoladas de tomate (MT – 0,2 mg/mL) foram adicionadas a tampão HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo 50 mM de KCl, antimicina 2 μ M e oligomicina 1 μ g/mL, na presença ou ausência de 1% de BSA e 1 mM de ATP, conforme indicado. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

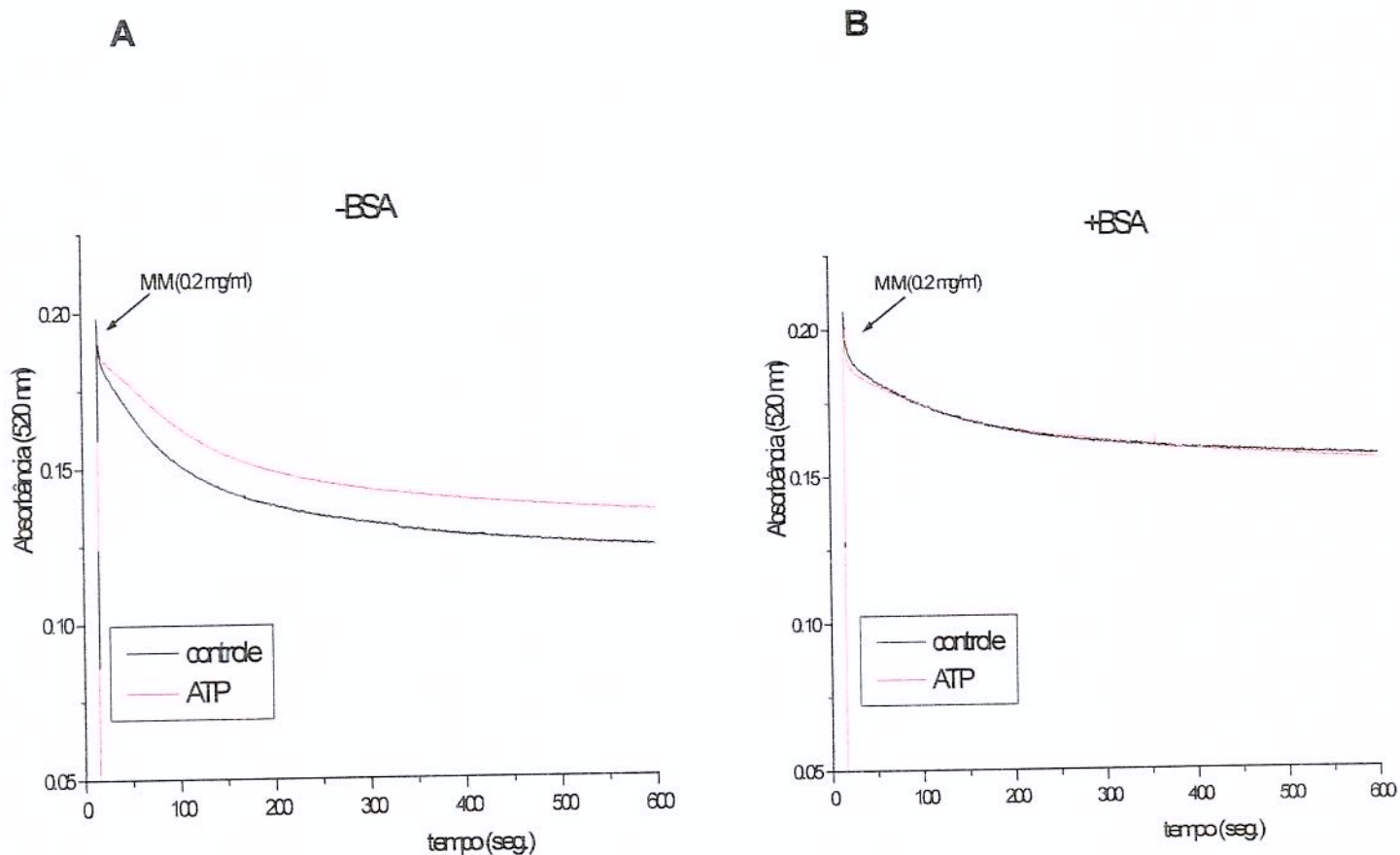


Figura 9 – Efeito de ATP no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^+ .

Mitocôndrias de milho (MM – 0,2 mg/mL) foram adicionadas a tampão HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo 50 mM de KCl, 2 μ M e oligomicina 1 μ g/mL, na presença ou ausência de 1% de BSA e 1 mM de ATP, conforme indicado. Este experimento é representativo de uma série de 2 repetições semelhantes.

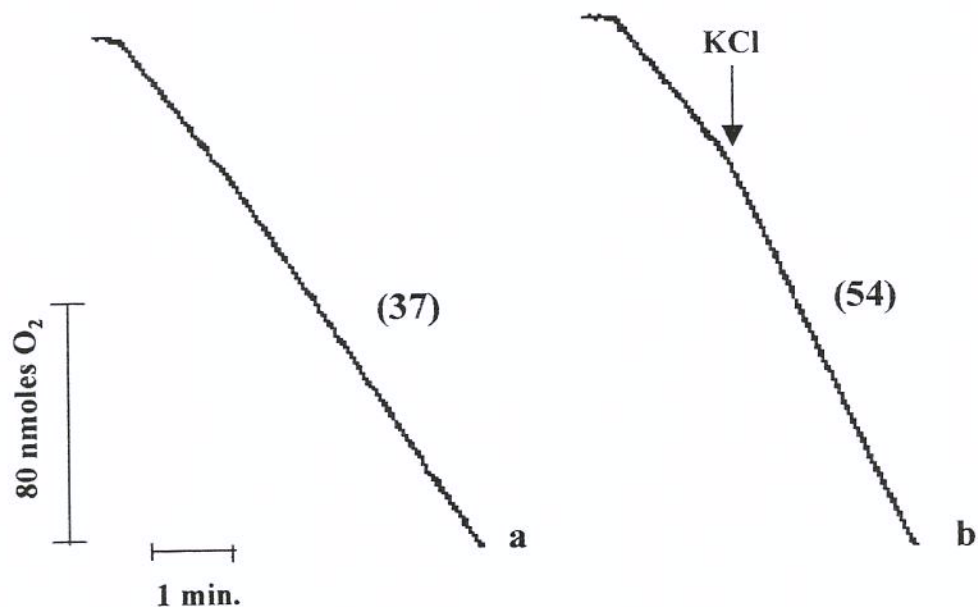


Figura 10 – Medida do consumo de oxigênio de mitocôndrias de batata sustentadas por succinato. A respiração de mitocôndrias de batata (1 mg/mL) foi medida em tampão contendo sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, BSA 1%, succinato 2 mM, oligomicina 1 µg/mL e rotenona 2 µM, pH 7,2. A respiração em condições controle (traço a) é significativamente aumentada pela adição de 30 mM de KCl (traço b). Os números entre parênteses representam o consumo de O₂ em nmoles . min⁻¹ . mg proteína⁻¹. Este experimento é representativo de uma série de 5 repetições semelhantes.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

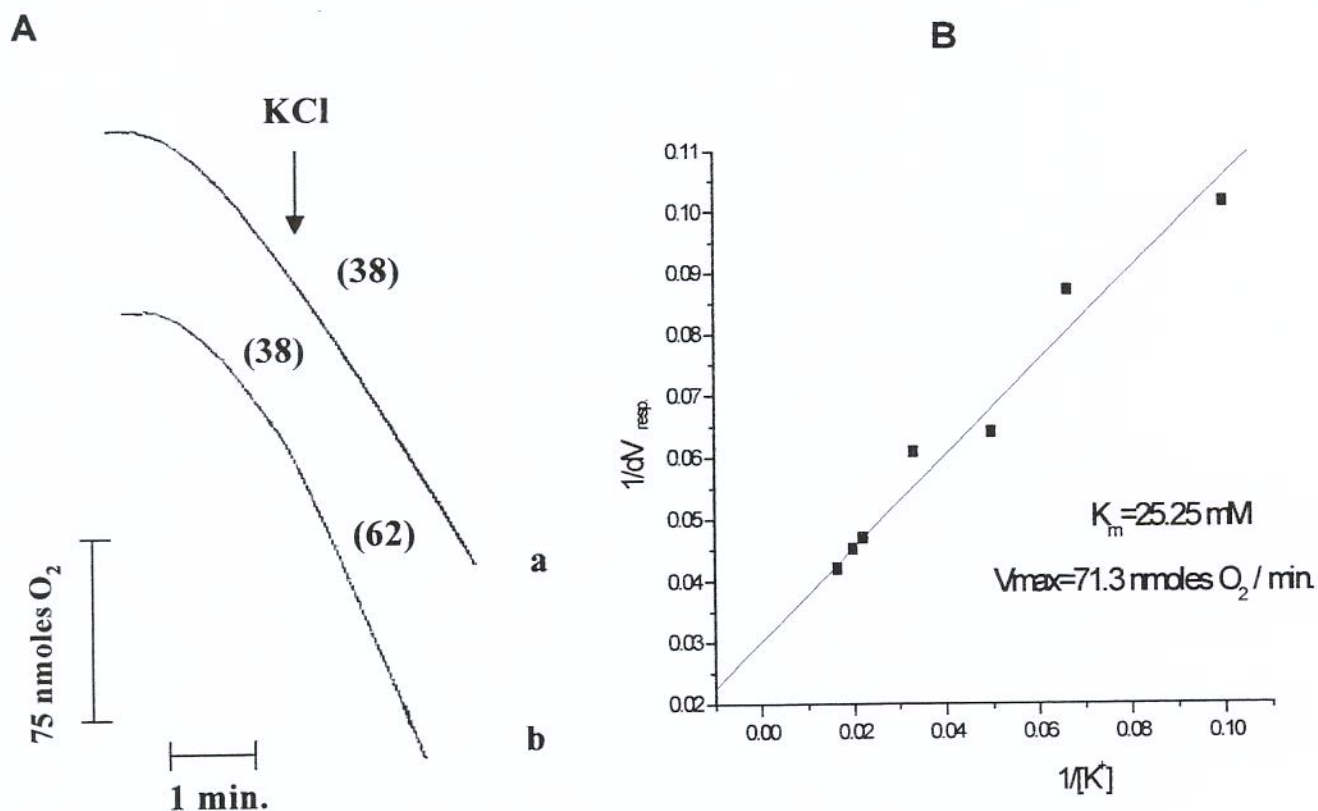


Figura 11 – Medida do consumo de oxigênio de mitocôndrias de batata sustentadas por succinato. No painel A, respiração de mitocôndrias de batata (1 mg/mL) foi medida em tampão contendo sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, BSA 1%, succinato 2 mM, oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$ e rotenona 2 μM , pH 7,2. A respiração em condições controle (traço a) foi significativamente aumentada por concentrações crescentes de KCl: 20 mM, 30 mM, 50 mM e 60 mM (traço b). Os números entre parênteses representam o consumo de O_2 em $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. No painel B, resposta a K^+ apresentou um $K_m = 25,25 \text{ mM}$. Este experimento é representativo de uma série de 5 repetições semelhantes.

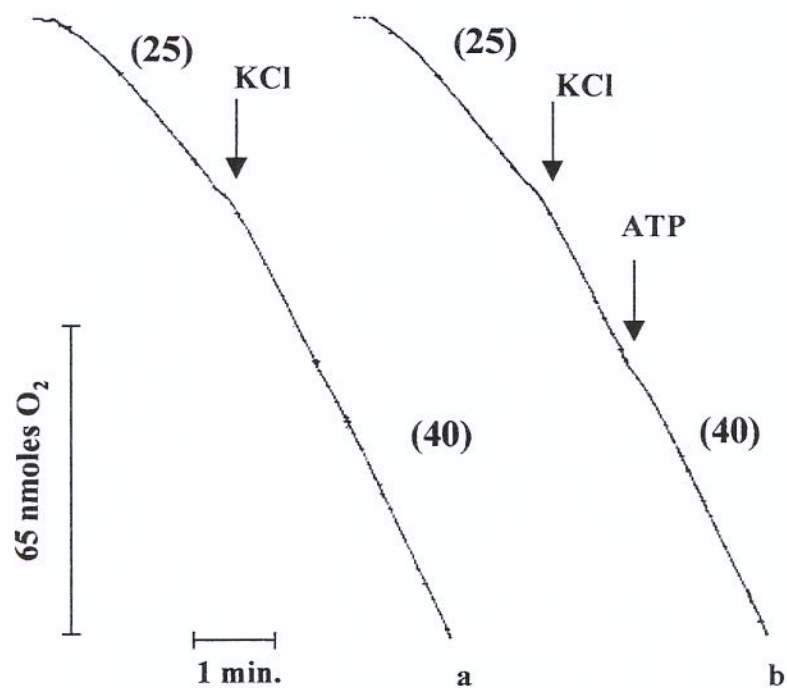


Figura 12 - Medida da taxa de consumo de oxigênio de mitocôndrias de batata sustentadas por succinato. A respiração de mitocôndrias de batata (1mg/mL) foi medida em tampão contendo sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, BSA 1%, succinato 2 mM, oligomicina 1 μ M e rotenona 2 μ M, pH 7,2. A adição de 30 mM de KCl (traços a e b) provoca um aumento significativo da taxa respiratória, de modo não prevenido pela presença de ATP 30 mM (traço b). Os números entre parênteses representam o consumo de O_2 em $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$. Este experimento é representativo de uma série de 5 repetições semelhantes.

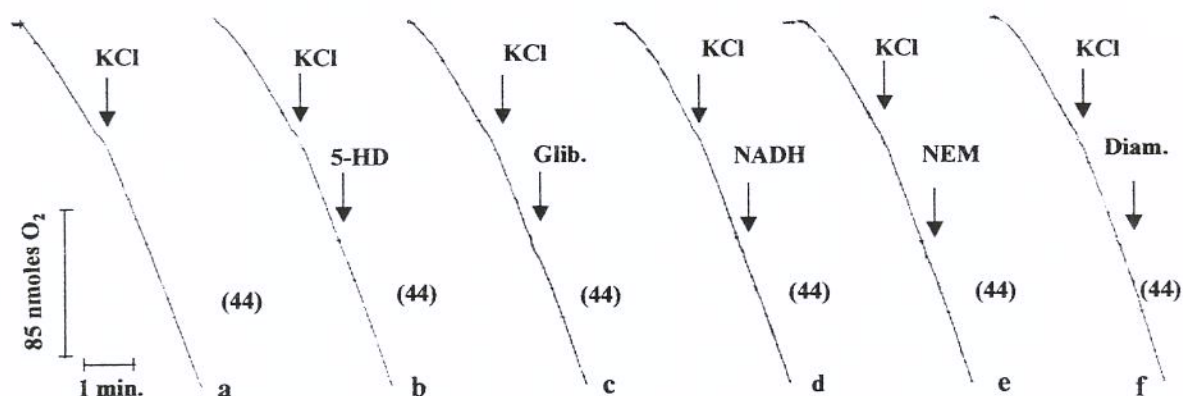


Figura 13 – Ausência de inibição da respiração por compostos que regulam o canal de K⁺ em outros modelos. A respiração de mitocôndrias de batatas (1 mg/mL) foi medida em condições idênticas à figura 4. A respiração em condições controle não sofreu alteração após a adição de 100 µM de 5-hidroxidecanoato (traço b), 100 µM de glibenclamida (traço c), 1 mM de NADH (traço d) ou aos reagentes tiólicos NEM (2 mM) (traço e) e 1 mM de diamida (traço f). Os números entre parênteses representam o consumo de O₂ em nmoles . min⁻¹ . mg proteína⁻¹.

Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

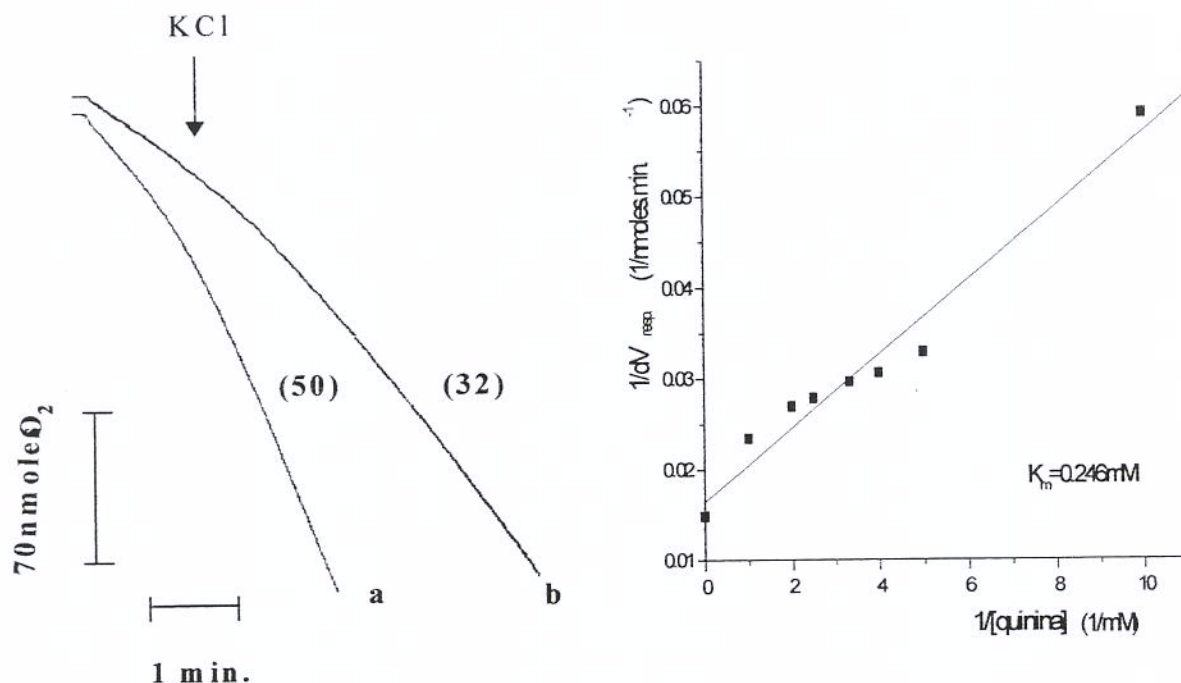


Figura 14- Inibição do canal de K^+ em mitocôndrias de batata por quinina. A respiração de mitocôndrias de batata (1 mg/mL) foi medida em condições idênticas à figura 4. A respiração em condições controle (traço a) foi significativamente diminuída por concentrações crescentes de quinina: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,25 mM (traço b), 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM e 1 mM. Os números entre parênteses representam o consumo de O_2 em $\text{nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. A resposta a quinina apresentou um $K_i = 0,248 \text{ mM}$. Este experimento é representativo de uma série de 5 repetições semelhantes.

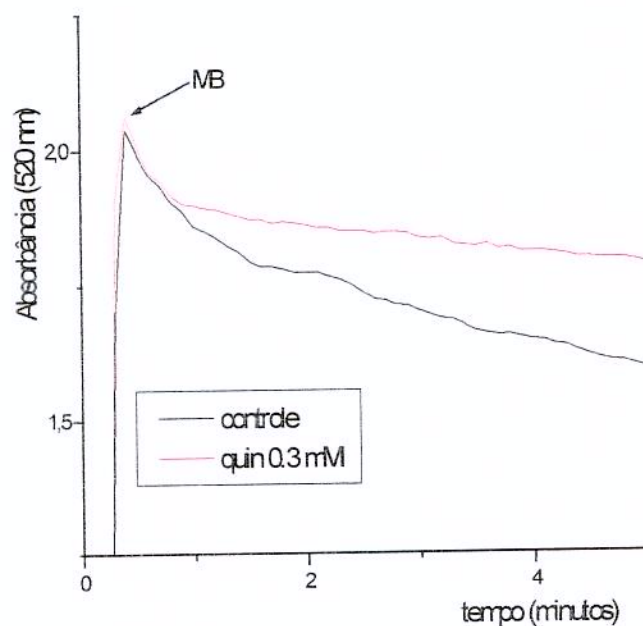


Figura 15 – Inibição do fluxo de K^+ em mitocôndrias de batata por quinina. Mitocôndrias de isoladas de batata (MB – 0,2 mg/mL) foram adicionadas a tampão de HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo 50 mM de KCl, antimicina 2 μ M e oligomicina 1 μ g/mL. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

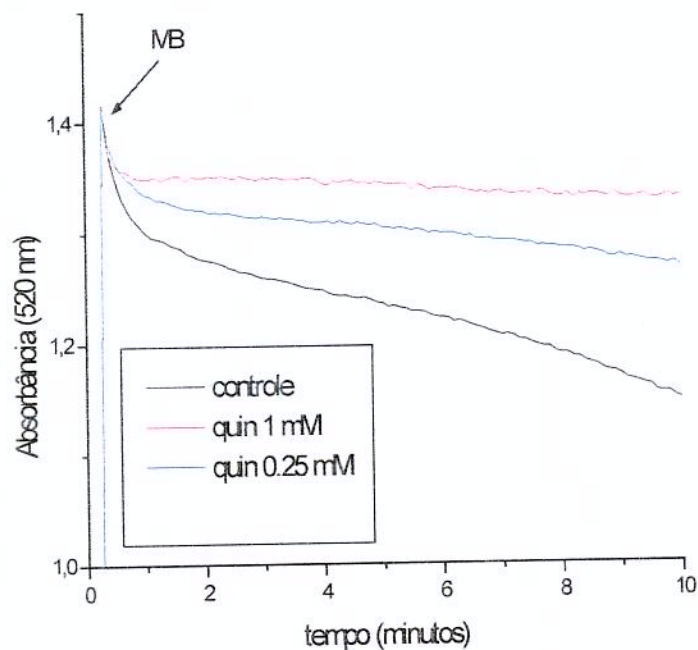


Figura 16 – Inibição do fluxo de K^+ em mitocôndrias de batata por quinina. Mitocôndrias de isoladas de batata (MB – 0,2 mg/mL) foram adicionadas a tampão de HEPES 10 mM, pH 7.2, contendo 50 mM de KSCN, antimicina 2 μ M e oligomicina 1 μ g/mL. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

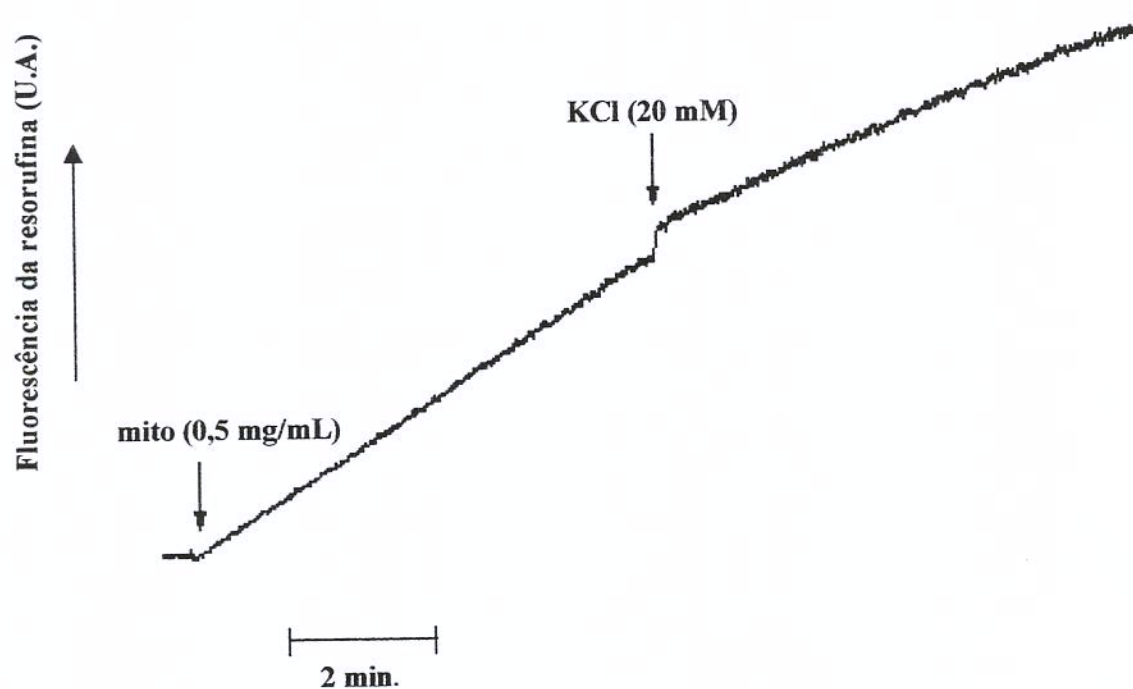


Figura 17 – Diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio promovida pela adição de K^+ a mitocôndrias de batata. Mitocôndrias de batata (0.5 mg/mL) foram adicionadas a tampão de HEPES 10 mM, pH 7.2, contendo 250 mM de sacarose, 2 mM de succinato e 2 μ M de rotenona na presença de 30 μ M de Amplex Red e 50 μ M de peroxidase de raiz forte. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.



8- APÊNDICE

A HIGHLY ACTIVE ATP-INSENSITIVE K⁺ IMPORT PATHWAY IN PLANT MITOCHONDRIA

Fernando Ruy¹, Anibal E. Vercesi¹, Paula B. M. Andrade², M. Lúcia Bianconi³,
Hernan Chaimovich² and Alicia J. Kowaltowski²

¹Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

³Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Running Title: K⁺ Transport in Plant Mitochondria

Key Words: potassium channel, *Solanum tuberosum*, reactive oxygen species, uncoupling, heat.

Address correspondence to: Alicia J. Kowaltowski, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil, Fax: +55 11 3815 5579, e-mail: alicia@iq.usp.br

Abstract

We describe here a regulated, highly active K^+ uptake pathway in potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and maize (*Zea mays*) mitochondria. K^+ transport was not inhibited by ATP, NADH or thiol reagents, which regulate ATP-sensitive K^+ channels previously described in plant and mammalian mitochondria. However, K^+ uptake was completely prevented by quinine, a broadspectrum K^+ channel inhibitor. Increased K^+ uptake in plants leads to mitochondrial swelling, respiratory stimulation, heat release and the prevention of reactive oxygen species formation. Since this newly described ATP-insensitive K^+ import pathway is capable of uncoupling respiration from oxidative phosphorylation, it is potentially involved in metabolism regulation and prevention of oxidative stress.

Introduction

The impermeability of the mitochondrial inner membrane to ions plays an important role in bioenergetics and is essential for adequate mitochondrial function. It ensures that the redox energy released through substrate oxidation can be maintained as a proton gradient, which fuels ATP synthesis (Mitchell, 1961). Moreover, the proton gradient can also be used in other processes such as Ca^{2+} transport (Gunter et al., 1994) or heat production, mediated by the mammalian brown adipose tissue uncoupling protein (UCP1 - Nicholls et al., 1978).

Surprisingly, plant mitochondria present the ability to dissipate or prevent the formation of the proton gradient. Two energy-dissipating systems that can significantly decrease the efficiency of oxidative phosphorylation have been described in plant mitochondria: the plant uncoupling protein (PUMP - Vercesi et al., 1995) and the alternative oxidase (AOX - Huq and Palmer, 1978; Rich, 1978).

Similarly to UCP1, PUMP stimulates proton gradient dissipation by promoting H^+ reentry into the mitochondrial matrix through a fatty acid cycle. In this cycle, PUMP catalyses the transport of anionic fatty acids from the matrix to citosol. The return of these fatty acids in the protonated form, via a “flip-flop” mechanism (Skulachev, 1991; 1999), results in a futile H^+ cycle, dissipating protonmotive force (Jezek et al., 1996). PUMP-stimulated proton cycling is sensitive to allosteric inhibition by purine nucleotides such as ATP and GTP, and, *in vitro*, is strongly inhibited by BSA, which binds free fatty acids (Jezek et al., 1996; Sluse et al., 1998).

AOX shunts electrons from the cytochrome pathway at the level of ubiquinone, reducing oxygen to water and avoiding H^+ transport from the matrix into the intermembrane space. Thus, electron flux through AOX is not coupled to ATP synthesis, dissipating energy as heat. The activity of AOX is insensitive to cytochrome pathway inhibitors such as antimycin or cyanide, but can be inhibited by benzohydroxamate or linoleic acid, an abundant free fatty acid in plants (Sluse et al., 1998).

Although both energy dissipating systems in plant mitochondria lead to the same effect (uncoupling of respiration from oxidative phosphorylation), there is a basic difference between these pathways: while PUMP decreases the proton gradient, AOX

prevents its formation. Another difference is the opposite effect of free fatty acid regulation. PUMP is activated, but AOX is inhibited by free fatty acids. Thus, both systems seem not to work at their maximal activity simultaneously. Most probably, these energy-dissipating systems work sequentially during plant development (Almeida et al., 1998).

Recently, a new dissipative mechanism has been described in plant mitochondria, involving K^+ import into the mitochondrial matrix coupled to K^+/H^+ exchange (Pastore et al., 1999, Paucek et al., 2002). Thus K^+ , the most abundant cation in the cytosol, may also regulate coupling between mitochondrial respiration and ATP synthesis in plant mitochondria. The K^+ import pathway has been studied in detail in durum wheat mitochondria, but also evidenced in spinach, potato and barley. In these plants, the pathway appears to be inhibited by ATP, suggesting the channel is similar to mammalian ATP-sensitive K^+ channels (mitoK_{ATP}). The discovery of a mitoK_{ATP} in plant mitochondria brought new implications to the physiology of this organelle, because the existence of a K^+ import channel acting together with a potent K^+/H^+ exchanger in these mitochondria (Diolez et al., 1985) would allow proton potential regulation through a K^+ cycle (Garlid et al., 1996).

We decided to study K^+ transport in plant mitochondria in more detail, using plants in which the roles of PUMP and AOX are well established. Surprisingly, we did not find an ATP-sensitive K^+ channel. Instead, we now report the existence of a highly active ATP-insensitive K^+ import pathway in potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and maize (*Zea mays*) mitochondria.

Experimental Procedures

Mitochondrial isolation - Potato mitochondria were isolated by differential centrifugation as described by Beavis and Vercesi (1992). Green stage tomato mitochondria were isolated as described by Almeida et al. (1999) and purified on a Percoll gradient (Van der Bergen et al., 1994). Maize mitochondria were prepared following Martins and Vercesi (1985). Protein content in the mitochondrial suspension was determined using the Biuret method (Gornall et al., 1949).

Swelling Measurements - Increases in matrix volume of deenergized plant mitochondria were measured by following the decrease in light scattering of the mitochondrial suspension at 520 nm, using a SLM Aminco DW 2000 or a Multispec Shimadzu 1501 spectrophotometer.

O₂ consumption measurements - Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments) in a temperature-controlled chamber (25°C).

Mitochondrial H₂O₂ release - H₂O₂ production was assessed at 25°C by the oxidation of Amplex Red in the presence of extramitochondrial horseradish peroxidase bound to H₂O₂. Amplex Red fluorescence was monitored at excitation wavelengths of respectively 365 nm and 450 nm, on a F4500 fluorimeter. *Isothermal titration calorimetry* - Isothermal titration calorimetry experiments were conducted in a VP-ITC microcalorimeter from Microcal Llc (Northampton, MA, USA). The implementation principles of isothermal titration calorimetry were described by Wiseman et al. (1989). The experiments were started by injecting mitochondria after the reaction medium reached equilibrium at 30°C in the 1.45 mL sample cell. Total heat (QT) released in the reactions was calculated by integrating the total area under the peak of the calorimetric thermograms for the first 6 min after injection.

Data Analysis - Traces shown are representative data of at least three similar experiments. Linear regression fits were calculated using Origin® software. Averages and standard errors (SEM) were determined using SigmaStat® (n ≥ 3).

Results

Potato mitochondria are permeable to K^+ ions.

In order to assess inner membrane permeability to K^+ in plant mitochondria, we suspended deenergized potato mitochondria in hyposmotic media. Under these conditions, mitochondria suspended in Cl^- salts swell if their inner membrane is permeable to the cation, since Cl^- is transported into the plant mitochondrial matrix by a highly active channel (PIMAC - Beavis and Vercesi, 1992). We observed that the inner membrane conductance for ions followed the order: $K^+ \gg Li > Na^+$ (Fig. 1), indicating the presence of a selective K^+ ion transport pathway in the inner membrane of potato mitochondria. The addition of valinomycin, a K^+ ionophore, enhanced ion uptake (line e), suggesting that mitochondrial swelling is limited by K^+ transport rates and not Cl^- transport through PIMAC (Beavis and Vercesi, 1992).

To investigate if mitochondrial K^+ permeability was due to an ATP-sensitive K^+ channel (mitoKATP), we tested if K^+ -induced swelling was inhibited by ATP (which inhibits durum wheat mitoKATP – Pastore et al., 1999) or ATP plus Mg^{2+} (which inhibit mammalian mitoKATP - Garlid et al., 1986). Under conditions similar to those used by Pastore et al. (1999), we observed an inhibitory effect of ATP (Fig. 2A, line a) or a partial inhibitory effect of ATP + Mg^{2+} (line b) on control K^+ uptake (line c). However, in plant mitochondria incubated under these conditions, K^+ uptake may occur both through a K^+ uniporter or the K^+/H^+ antiporter, very active in plants (Diolez et al., 1985, Fig. 3). In the latter uptake mechanism, H^+ cycling is maintained by PUMP (Vercesi et al., 1995). In order to avoid K^+ transport through the second mechanism, which cannot occur in the presence of physiological membrane potentials, we added BSA to the reaction medium, removing fatty acids essential for H^+ transport by PUMP. As seen in Fig. 2B, swelling occurs in the presence of BSA (line a), and is not inhibited by ATP (line b) or ATP + Mg^{2+} (line c). Therefore, potato mitochondria are permeable to K^+ ions, but this permeability is not prevented by ATP. Swelling inhibition observed in the absence of BSA is probably due to the inhibitory effect of ATP on PUMP-mediated H^+ transport.

We reproduced the potato mitochondrial swelling experiments using tomato (*Lycopersicon esculentum*) and maize (*Zea mays*), as shown in Fig. 4. Tomato and maize mitochondria swell in KCl, in a manner insensitive to ATP unless BSA was absent from the incubation medium. Thus, ATP-insensitive K^+ uptake seems to be present in a variety of plant mitochondria. To confirm that mitochondrial swelling in the presence of BSA is not due to the K^+/H^+ exchanger, we measured mitochondrial oxygen consumption in the presence of BSA and under conditions that allow the build up of a membrane potential and further prevent the uptake of K^+ ions by the K^+/H^+ antiporter. Fig. 5A shows that uptake of externally added K^+ by the mitochondrial suspension respiring on succinate (plus rotenone) promotes an increase in O_2 consumption due K^+ cycling (K^+ entry mediated by the ATP-insensitive K^+ pathway and exchange for H^+ by the K^+/H^+ antiporter). Respiratory increases were not observed after the addition of equal amounts of NaCl, indicating that they are not due to osmotic changes in the media (not shown). The increase in respiratory rates promoted by K^+ salts exhibits a hyperbolic dependence with ion concentration, as expected for channel mediated K^+ transport (Fig. 5B), with $K_{1/2} = 27.9 \pm 1.628$ mM for K^+ ($n = 5$) and maximal respiratory stimulation of 70.82 ± 1.25 nmoles $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$. This is a significant increment in respiratory rates, capable of diminishing oxidative phosphorylation and reflecting K^+ transport rates at least 5 times higher than those found for mammalian mitoK_{ATPS} (Bajgar et al., 2001).

Regulation of K^+ uptake.

The K^+ effect on respiratory rates was not affected by the addition of 1 mM ATP (Fig. 6, Table I) or ATP + Mg^{2+} (not shown), confirming that the K^+ channel in potato mitochondria is not a mitoK_{ATP}. Thus, we tested a variety of compounds that regulate other K^+ channels. We observed that the potato channel is not regulated by NADH or pharmacological inhibitors such as 5-hydroxydecanoate or glybenclamide (not shown), but is sensitive to quinine, a broad-spectrum K^+ channel inhibitor (Fig. 6, Table I). Quinine inhibited potato mitochondrial K^+ transport in a dose-dependent manner (not shown), with $K_{1/2} = 254 \pm 10$ μM , $n = 3$.

Unfortunately, quinine doses above 150 μM decrease maximal respiratory rates (not shown). In order to exclude the possibility that quinine acts inhibiting respiration and not K^+ transport, we tested the compound using non-respiring mitochondrial swelling experiments, and found that quinine inhibits K^+ transport in the absence of respiration (Fig. 7A, Table I). Since under these conditions the inhibitory effect of quinine could be due to PIMAC inhibition (Beavis and Vercesi, 1992), we also monitored mitochondrial swelling in KSCN buffer (Fig. 7B), in which swelling depends only on K^+ uptake (the mitochondrial inner membrane is permeable to SCN^-). The inhibitory effect of quinine on mitochondrial swelling in KSCN confirms that the drug directly inhibits K^+ uptake, strongly suggesting this uptake is mediated by a quinine-sensitive channel.

K^+ transport increases heat and decreases reactive oxygen release.

Since plant mitochondrial K^+ transport significantly increased mitochondrial respiration in the absence of oxidative phosphorylation, we hypothesized that it acts as a proton potential dissipative pathway in conjunction with the K^+/H^+ exchanger. In order to confirm this hypothesis, we measured heat release promoted by the K^+ channel under conditions in which other plant mitochondrial dissipative pathways (PUMP and AOX) were inhibited through the use of BSA and benzohydroxamate (Schonbaum et al., 1971). Fig. 8A shows typical traces of heat release from potato mitochondria measured using isothermal titration calorimetry. In the absence of K^+ , total heat release after 6 min was -7.8 mcal (trace a). Adding K^+ to the reaction media promoted a marked stimulation of mitochondrial heat release (trace b, $\text{QT} = -9.5$ mcal), suggesting that K^+ transport in potato mitochondria promotes futile H^+ cycling and generates heat.

In addition to regulating metabolism and generating heat, H^+ cycling has the beneficial effect of preventing mitochondrial reactive oxygen formation due to increased respiratory rates (Korshunov et al., 1997, Kowaltowski et al., 1998). Indeed, we found that potato mitochondria incubated in K^+ salts generated significantly less H_2O_2 (Fig. 8B, line b) when compared to mitochondria incubated in the absence of K^+ (line a). Thus, the prevention of mitochondrial oxidative stress may be an additional function of plant mitochondrial K^+ import pathways.

Discussion

We describe here a highly active K^+ import pathway in plant mitochondria, which promotes mitochondrial swelling, increases respiratory rates, stimulates heat release and decreases mitochondrial reactive oxygen species generation. All these characteristics are typical of a pathway that dissipates the mitochondrial proton potential and decreases the efficiency of oxidative phosphorylation.

K^+ uniporters in the inner mitochondrial membrane have been previously described in mammalian tissue, and are strongly inhibited by Mg^{2+} -ATP and Mg^{2+} -ADP (Garlid, 1996, Kowaltowski et al., 2001, Bajgar et al., 2001). These channels present structural similarities to plasma membrane ATP-sensitive channels, which are inhibited by Mg^{2+} -ATP-induced phosphorylation (Brayden, 2002). A striking characteristic of mitoK_{ATPS} in mammalian tissue is their low conductivity – although they increase inner membrane permeability to K^+ , the transport rate of the ion is so low that the overall change in membrane potential is often undetectable (Kowaltowski et al., 2001, Bajgar et al., 2001), and changes in the efficiency of oxidative phosphorylation are probably minimal.

In contrast to K^+ transport characteristics in mammalian mitochondria, Pastore et al. (1999) reported that K^+ was imported at high rates into plant mitochondria, uncoupling respiration from oxidative phosphorylation. These authors also reported that ATP inhibited the import pathway, in the absence of Mg^{2+} . However, we found here that the inhibition reported by these authors is only observed in the absence of the fatty acid quencher BSA (Figs. 2 and 4, see scheme in Fig. 3). This suggested two possibilities to explain our conflicting data: (i) that plant mitoK_{ATP} depends on fatty acids or (ii) that ATP does not inhibit plant K^+ transport, and that the ATP effect observed previously is attributable to PUMP. The first possibility was excluded by the finding that mitochondria respiring in the presence of BSA increase their oxygen uptake rates when treated with K^+ (Fig. 5). K^+ enters the mitochondrial matrix even in the presence of a proton gradient and BSA, decreasing the membrane potential and increasing respiratory rates. These respiratory changes were not prevented by ATP or other known mitoK_{ATP} inhibitors (Fig. 6, Table I), further supporting the notion that plant mitochondria present a highly active ATP-insensitive K^+ import pathway. It is important to stress, however, that although our data

show that high K^+ transport rates in plant mitochondria appear to occur through an ATP-insensitive pathway, they do not exclude the concomitant existence of mitoK_{ATPS} in these mitochondria (Paucek et al., 2002), as long as these mitoK_{ATPS} present limited K^+ transport rates, as observed in mammalian tissue (Kowaltowski et al., 2001, Bajgar et al., 2001).

The ATP-insensitive K^+ import pathway described here exhibits saturation kinetics (Fig. 5), and can be inhibited by quinine (Fig. 6 and 7, Table I), supporting the idea that this transport is not a consequence of the inner membrane K^+ “leak”, but an inner membrane K^+ channel. The $K_{1/2}$ of this putative channel (~30 mM) and the fact that it is not inhibited by physiological quantities of ATP indicates it can be fully active within intact cells, since intracellular K^+ concentrations in plant mitochondria are approximately 140 mM (Hanson, 1985). In addition, K^+ transport promoted by this pathway is quite large compared to mammalian mitoK_{ATPS} (Kowaltowski et al., 2001, Bajgar et al., 2001), indicating that extensive quantities of K^+ can be imported into the plant mitochondrial matrix through this putative channel. This could promote mitochondrial swelling and even rupture if plant mitochondria did not present a highly efficient K^+/H^+ exchanger (Diolez et al., 1985), which removes matrix K^+ in a manner stimulated by mitochondrial swelling. In fact, maximal respiratory rates are maintained for long periods after the addition of K^+ to potato mitochondria (Fig. 5), suggesting no organelle rupture and cytochrome *c* loss occurs. As a result, the most evident effect of this K^+ transport *in vivo* is probably a decrease in the mitochondrial proton gradient, dissipating energy and avoiding ATP synthesis. Supporting this idea, K^+ transport in these mitochondria increases the heat release of the suspension (Fig. 8).

The presence of a channel with a primarily dissipative function in the mitochondrial inner membrane is surprising, since two distinct dissipative pathways have previously been described in plant mitochondria: AOX and PUMP (Huq and Palmer, 1978, Rich, 1978, Jezek et al., 1996). It is thus interesting to investigate when each of these pathways acts. Since the activation of plant K^+ transport generates heat, we tested the effect of cold exposure on this transport. We found that refrigerating potatoes for 2-3 days prior to mitochondrial isolation did not increase K^+ transport, change the affinity for the ion or regulatory characteristics (not shown). Thus, heat generation may not be the primary role of plant K^+ transport. Indeed, similarly to both PUMP and AOX (Kowaltowski et al., 1998,

Popov et al., 1997), K^+ transport decreased mitochondrial reactive oxygen release (Fig. 8). This may be an important function for dissipative pathways, which prevent reactive oxygen release by decreasing the accumulation of electrons at initial steps of the respiratory chain, where they can generate superoxide radicals, and by decreasing the local oxygen tensions (Korshunov et al., 1997). Indeed, PUMP

knockout plants are more susceptible to oxidative stress, and exogenous additions of oxidants promote increased PUMP expression (Brandalise, M. Maia, I. Borecky, J., Vercesi, A.E. and Arruda, P., unpublished observations).

Finally, an interesting hypothesis for the existence of many dissipative pathways in plant mitochondria is the idea that these pathways are necessary for plant metabolic regulation (Sluse and Jarmuszkiewicz, 2002). When ATP levels in plants are elevated due to photosynthetic activity, citric acid cycle intermediates necessary for macromolecule synthesis would be unattainable if respiration was inhibited and NADH levels maintained high. PUMP, AOX and the putative K^+ channel can promote NADH oxidation even in the presence of high ATP levels, thus allowing plants to synthesize these intermediates and grow. Further studies determining endogenous K^+ transport regulation and its interaction with other dissipative pathways should help determine the exact role of each pathway.

References

- Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Khomsi H., Arruda P., Vercesi A.E., Sluse F. (1995) Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling proteins sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant. Physiol.* **119**: 1323-1330.
- Bajgar R., Seetharaman S., Kowaltowski A.J., Garlid K.D., Paucek P. (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J. Biol. Chem.* **276**: 33369- 33374.
- Beavis A.D., Vercesi A.E. (1992) Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.* **267**: 3079-3087.
- Brayden J.E. (2002) Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **29**: 312-316.
- Diolez P., Moreau F. (1985) Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **806**: 56-63.
- Garlid K.D. (1996) Cation transport in mitochondria - the potassium cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**: 123-126.
- Geraldes-Laakso S., Arrabaça J.D. (1997) Respiration and heat production by soybean hypocotyl and cotyledon mitochondria. *Plant. Physiol. Biochem.* **35**: 897-903.
- Gornall A.G., Bardwill C.J., David M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751.
- Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.S., Gavin C.E. (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* **267**: C313-C339.
- Hanson J.B. (1985) Higher Plant Cell Respiration. In R Dulce, DA Ray, eds, Encyclopedia of Plant Physiology. Springer, Berlin, pp 248-280.
- Huq S., Palmer J.M. (1978) Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett.* **95**: 217-220.
- Jezek P., Costa A.D.T., Vercesi A.E. (1996) Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**: 32743-32748.

- Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**: 15-18.
- Kowaltowski A.J., Costa A.D.T., Vercesi A.E. (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett.* **425**: 213-216.
- Kowaltowski A.J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K.D. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K⁺ channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H649-H657.
- Martins I.S., Vercesi A.E. (1985) Some characteristics of Ca²⁺ transport in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**: 943-948.
- Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-147.
- Nicholls D.G., Bernson V.S., Heaton G.M. (1978) The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl.* **32**: 89-93.
- Pastore D., Stoppelli M.C., Di Fonzo N., Passarella S. (1999) The existence of the K⁺ channel in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274**: 26683-26690.
- Paucek P., Dolgacova L., Garlid K.D. (2002) Purification and reconstitution of K_{ATP} channel (pmiK_{ATP}) of plant mitochondria. *Biophys. J.* **82**: 528.
- Popov V.N., Simonian R.A., Skulachev V.P., Starkov A.A. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* **415**: 87-90.
- Rich P.R. (1978) Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase. *FEBS Lett.* **96**: 252-256.
- Ricquier D., Gaillard J.L., Turc J.M. (1979) Microcalorimetry of isolated mitochondria from brown adipose tissue. Effect of guanosine-di-phosphate. *FEBS Lett.* **99**: 203-206.

- Schonbaum G.R., Bonner W.D. Jr, Storey B.T., Bahr J.T. (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.* **47**: 124-128.
- Skulachev V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **294**: 158-162.
- Skulachev V.P. (1999) Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 431-445.
- Sluse F.E., Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Vercesi A.E. (1998) Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett.* **433**: 237-240
- Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W. (2002) Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett.* **510**: 117-120
- Van den Bergen C.M.V., Wagner A.M., Krab K., Moore A.L. (1994) The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone-reducing pathways. *Eur. J. Biochem.* **226**: 1071-1078.
- Vercesi A.E., Martins I.S., Silva M.A.P., Leite H.M.F., Cuccovia I.M., Chaimovich H. (1995) PUMPing plants. *Nature* **357**: 24
- Wiseman T., Willinston S., Brandts J.F., Lin L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**: 131-137

Table 1*Regulation of K^+ transport in potato mitochondria.*

Drug	Effect on respiration	Effect on swelling
ATP (1 mM)	No inhibition	No inhibition
ATP (1 mM) + Mg^{2+} (2 mM)	No inhibition	No inhibition
ADP (1 mM)	No inhibition	No inhibition
NADH (1 mM)	No inhibition	No inhibition
Glybenclamide (100 μ M)	No inhibition	No inhibition
5-Hydroxydecanoate (100 μ M)	No inhibition	No inhibition
Diamide (1 mM)	No inhibition	No inhibition
N-ethylmaleimide (2 mM)	No inhibition	No inhibition
Quinine	Inhibition ($K_{1/2} = 254 \pm 10$ mM)	Inhibition ($K_{1/2} = 288.15$ mM)

Effects of various drugs (maximal doses tested are given in parenthesis) on mitochondrial K^+ uptake as measured by respiration increments conducted under conditions described for Fig. 5 or swelling prevention experiments, conducted under the conditions of Fig. 7A.

Figure Legends

Fig. 1 - Potato mitochondria swell in K^+ ions. Isolated potato mitochondria (PM, 0.2 mg/mL) were added to a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.2, 2 μ M antimycin, 1 μ g/mL oligomycin and 100 mM sucrose (line a), 50 mM NaCl (line b), 50 mM LiCl (line c) or 50 mM KCl (lines d and e). Valinomycin (val - 1 μ M) was added where indicated by the arrow (line e).

Fig. 2 - ATP-insensitive K^+ transport in potato mitochondria. Isolated potato mitochondria (PM - 0.2 mg/mL) were added to a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM KCl, 2 μ M antimycin and 1 μ g/mL oligomycin, in the absence (Panel A) or presence (Panel B) of 1% BSA. Swelling is shown under control conditions (lines c) and in the presence of 1 mM ATP (lines a) or 1 mM ATP plus 2 mM Mg^{2+} (lines b).

Fig. 3 - Pathways through which K^+ can enter plant mitochondria. In plant mitochondria incubated in hyposmotic KCl media, Cl^- ions enter the mitochondrial matrix through PIMAC. K^+ uptake may occur both through a K^+ uniporter or the K^+/H^+ antiporter, when H^+ cycling is maintained by PUMP.

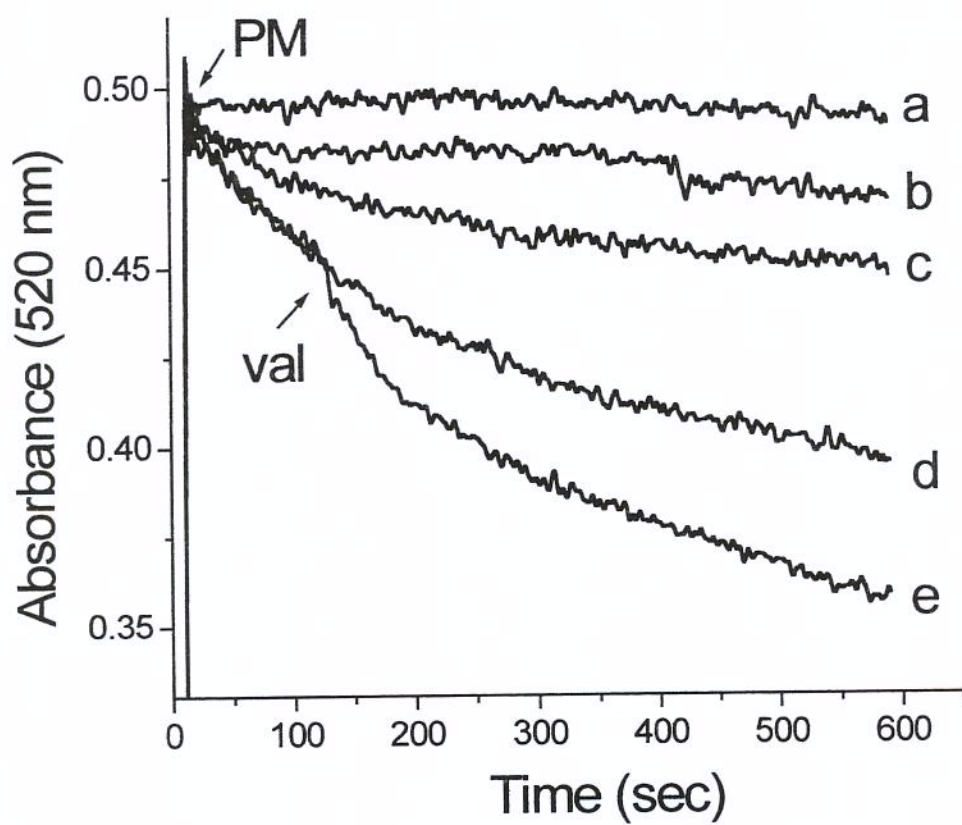
Fig. 4 - K^+ transport in tomato and maize mitochondria. Isolated tomato or maize mitochondria (TM or MM, 0.2 mg/mL) were added to a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM KCl, 2 μ M antimycin and 1 μ g/mL oligomycin in the absence (Panels A and B) or presence (Panels C and D) of 1% BSA, as indicated. ATP (1 mM) was present in lines a.

Fig. 5 - K^+ transport increases potato mitochondrial respiration. Potato mitochondrial (PM, 1 mg/mL) respiration was measured in a buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1% BSA, 2 mM succinate, 1 μ g/mL oligomycin and 2 μ M rotenone, pH 7.2. In Panel A, KCl (60 mM, line b) was added where indicated. In Panel B, changes in respiratory rates are plotted against $[K^+]$ added to the reaction media, using experimental conditions identical to Panel A.

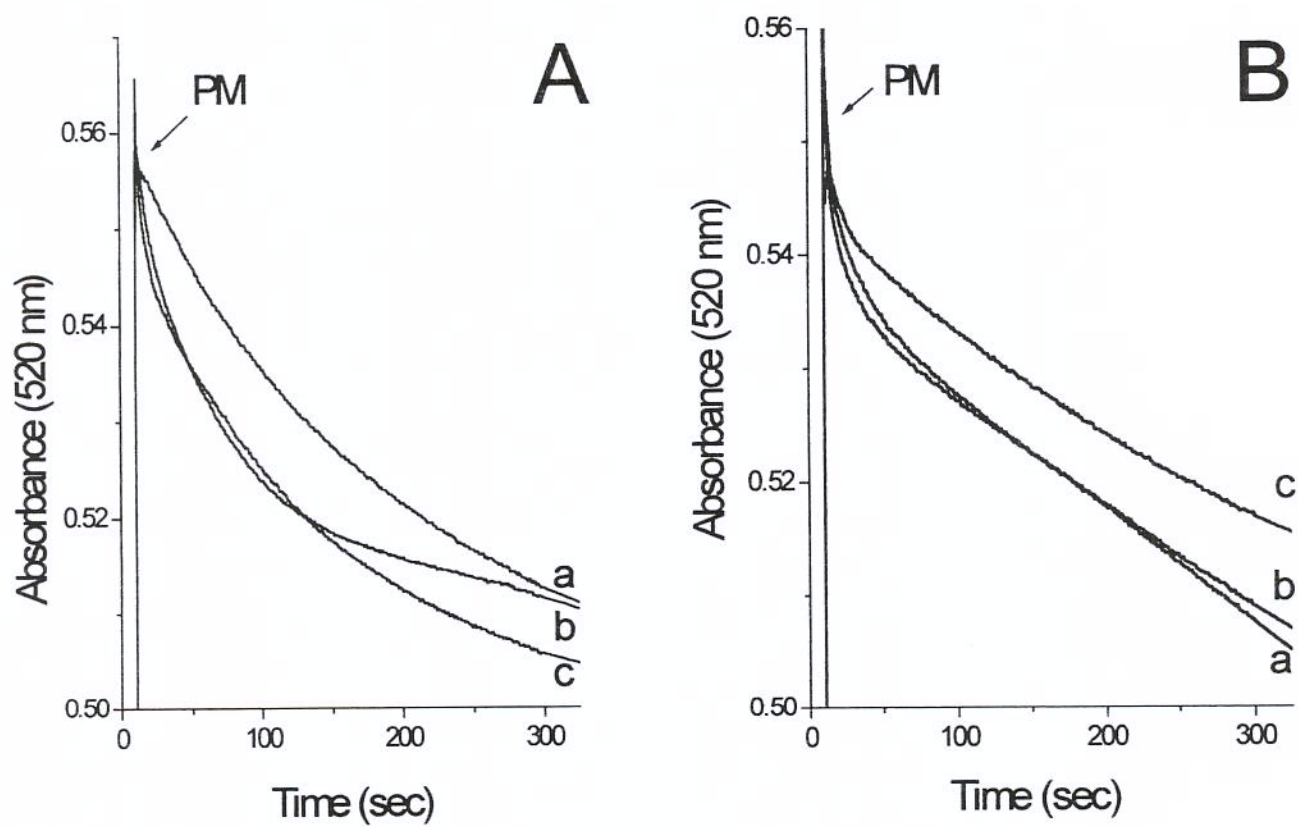
Fig. 6 - Regulation of K^+ -stimulated respiration. Potato mitochondrial (PM, 1mg/mL) respiration was measured under the conditions described in Fig. 5, in the presence of 150 mM quinine (line a), 30 mM ATP (line b) or no further additions (line c). KCl (30 mM) was added where indicated by the arrow.

Fig. 7 - K^+ -induced swelling is inhibited by quinine. Isolated potato mitochondria (PM, 0.2 mg/mL) were added to a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM KCl (Panel A) or 50 mM KSCN (Panel B), 2 μ M antimycin and 1 μ g/mL oligomycin. K^+ uptake was measured by following light scattering in the absence (lines b) or presence (lines a) of 1 mM quinine.

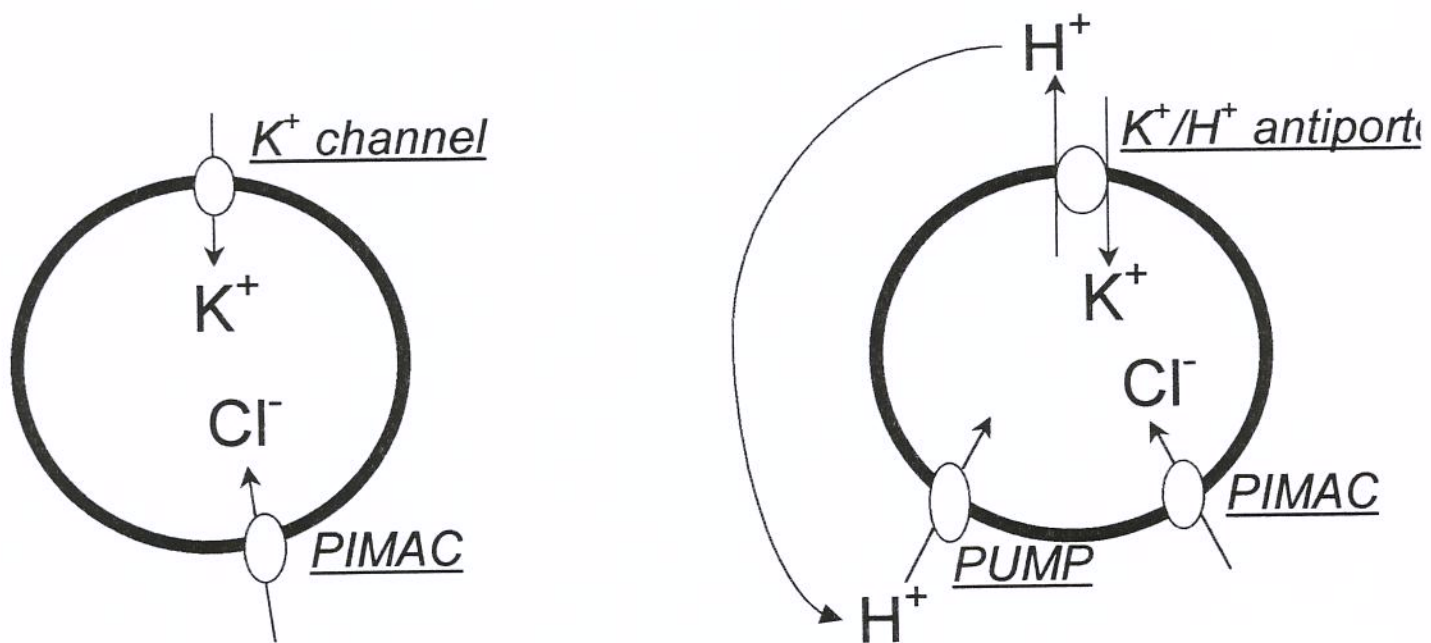
Fig. 8 - Heat and reactive oxygen release effects of K^+ transport. Where indicated, mitochondria (0.2 mg/mL) were added to a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.2, 250 mM sucrose, 2 mM succinate, 2 μ M rotenone and 1% BSA, in the presence (lines b) or absence (lines a) of 20 mM KCl. In Panel A, 2 mM BHAM was present in both traces, and heat changes were monitored as described in Experimental Procedures. In Panel B, 30 μ M Amplex Red and 1 U/mL horseradish peroxidase were present to monitor H_2O_2 release, as described in Experimental Procedures.



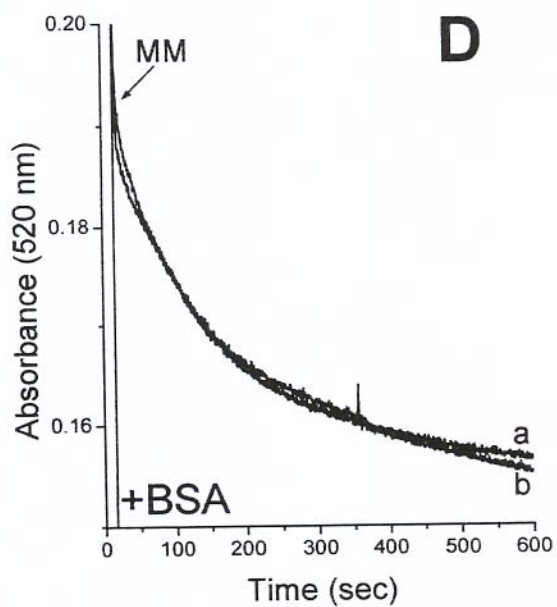
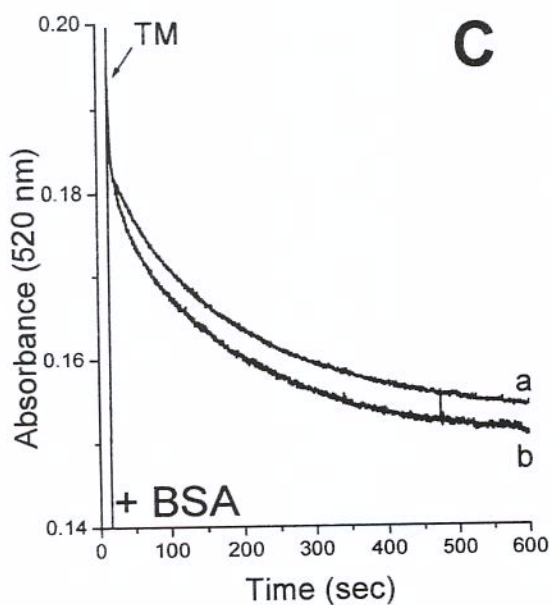
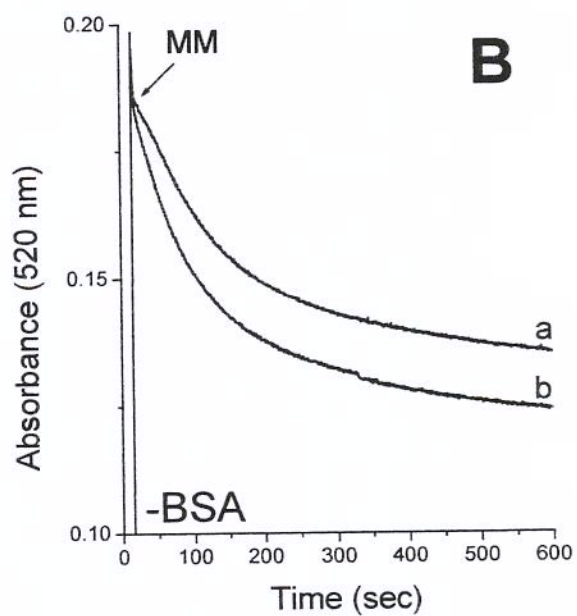
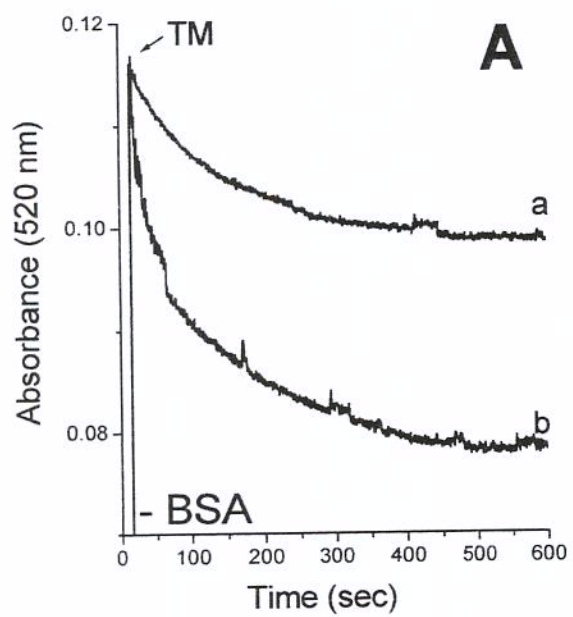
Ruy et al., 2003, Fig. 1.



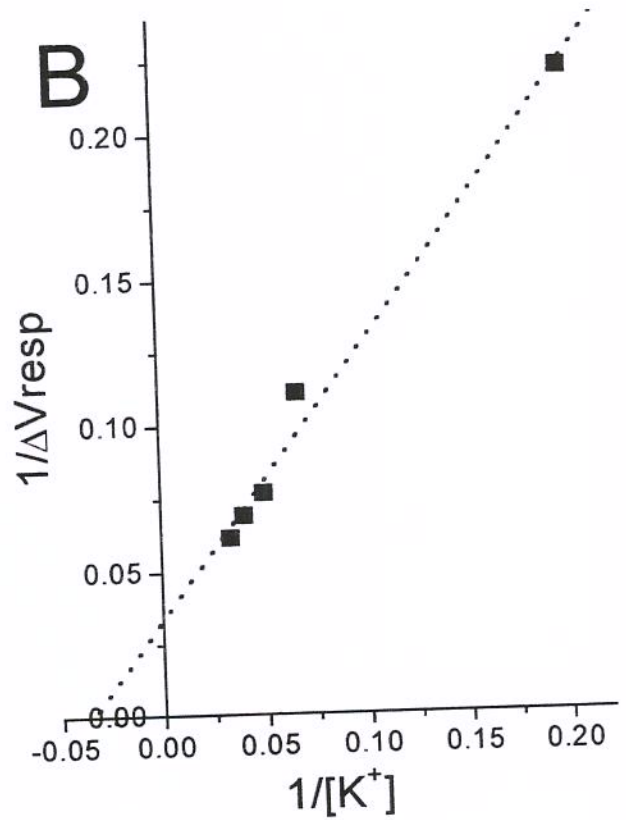
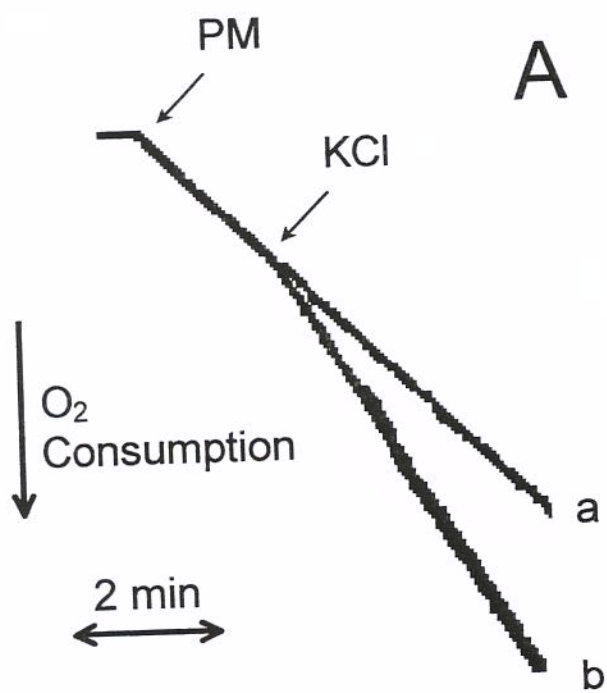
Ruy et al., 2003, Fig. 2.



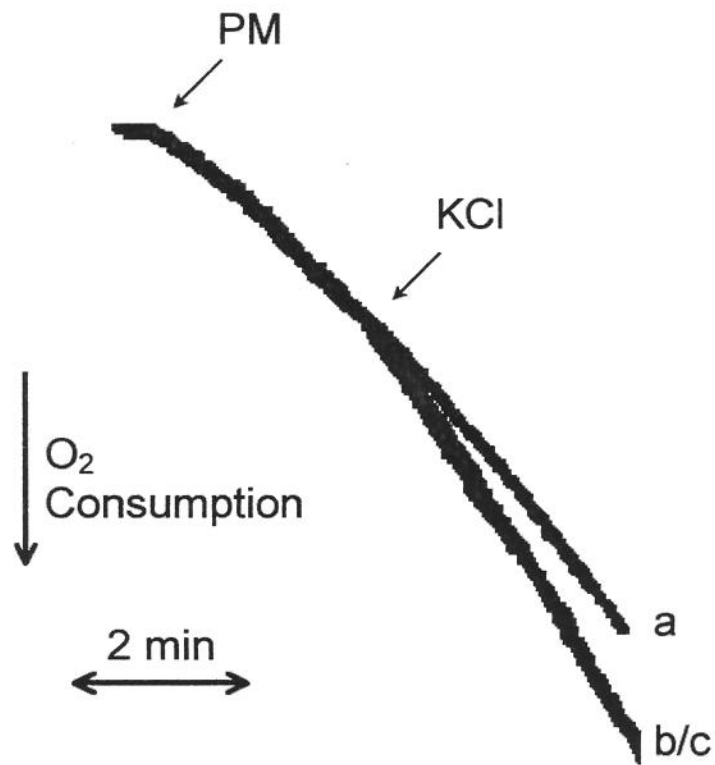
Ruy et al., 2003, Fig. 3.



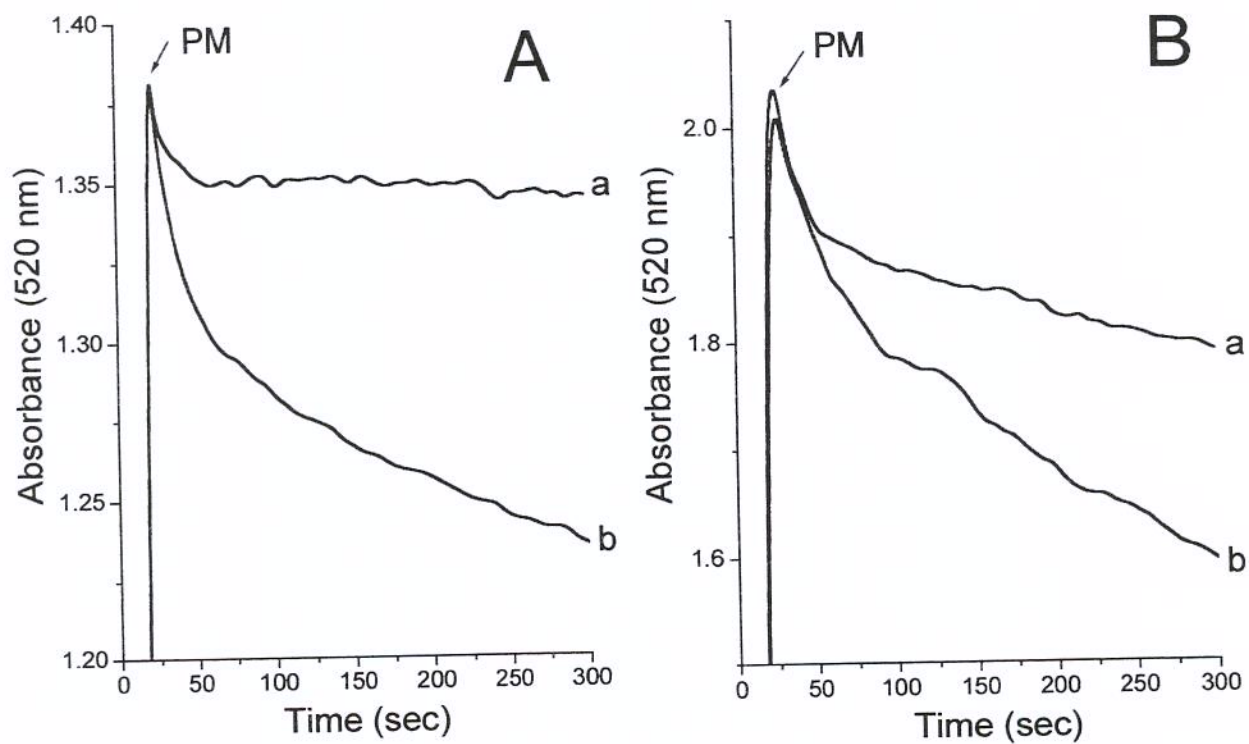
Ruy et al., 2003, Fig. 4.



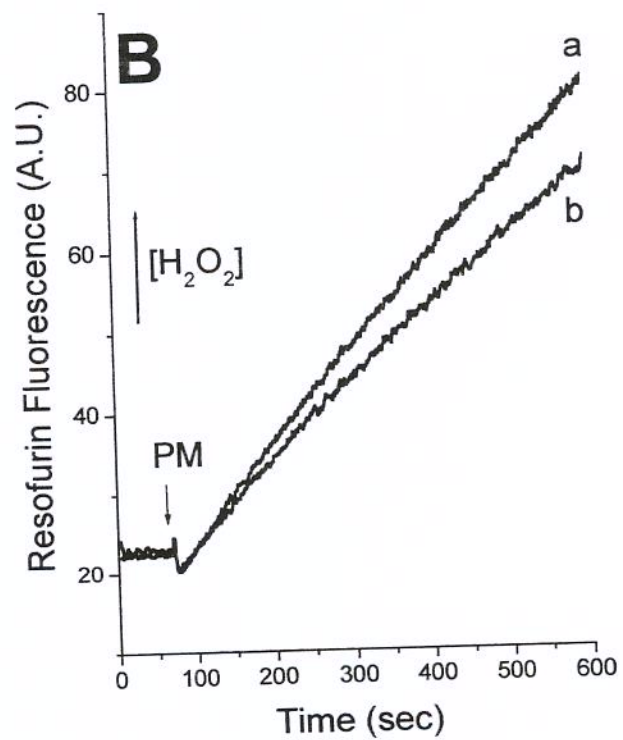
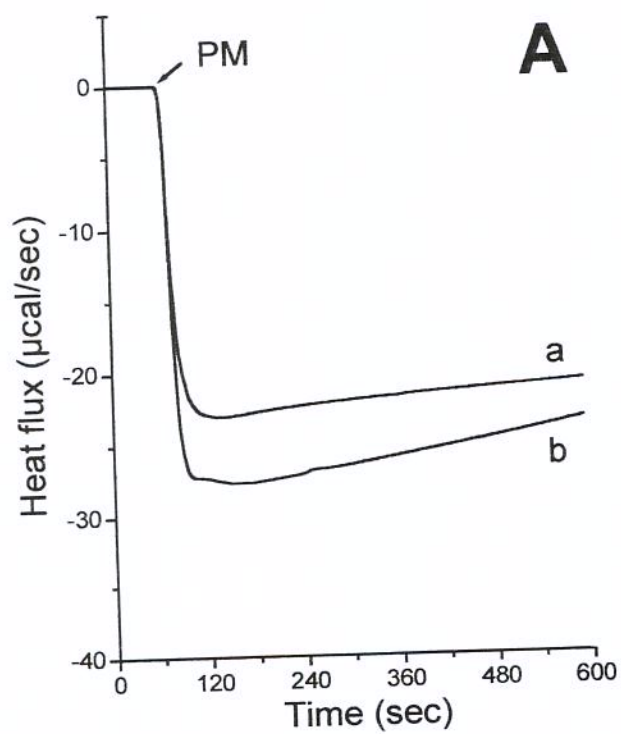
Ruy et al., 2003, Fig. 5.



Ruy et al., 2003, Fig. 6.



Ruy et al., 2003, Fig. 7.



Ruy et al., 2003, Fig. 8.