

ALEXANDRE DIAS TAVARES COSTA

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Alexandre Dias Tavares Costa**.
Campinas, 06 de fevereiro de 2003.

Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugenio Vercesi
Orientador(a)



***PROTEÍNA DESACOPLADORA DE PLANTAS: EFEITO DO
ESTRESSE OXIDATIVO NA SUA EXPRESSÃO E ATIVIDADE
E RECONSTITUIÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA DE
Arabidopsis thaliana***

CAMPINAS

2003

608-160-482

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ALEXANDRE DIAS TAVARES COSTA

***PROTEÍNA DESACOPLADORA DE PLANTAS: EFEITO DO
ESTRESSE OXIDATIVO NA SUA EXPRESSÃO E ATIVIDADE
E RECONSTITUIÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA DE
Arabidopsis thaliana***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: ANIBAL E. VERCESI

CAMPINAS

2003

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

C823p Costa, Alexandre Dias Tavares
Proteína desacopladora de plantas: Efeito do estresse oxidativo na sua expressão e atividade e reconstituição funcional da isoforma de Arabidopsis thaliana. / Alexandre Dias Tavares Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Anibal Eugenio Vercesi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bioquímica vegetal. 2. Calor – Efeito fisiológico. 3. Biologia molecular. I. Anibal Eugenio Vercesi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C823p
V	EX
TOMBO BC/	56720
PROC.	16/11/04
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

CM00192980-1

BIBID. 309599

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Docente: Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

Instituição: Departamento de Patologia Clínica – FCM – UNICAMP

Docente: Prof. Dr. Marco Aurélio Pedron e Silva

Instituição: Departamento de Biologia Vegetal – CCB – Universidade Federal de Viçosa

Docente: Prof. Dr. Ivan Godói Maia

Instituição: Departamento de Genética – IB – Unesp Botucatu

Docente: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Instituição: Departamento de Fisiologia Vegetal – IB – UNICAMP

Docente: Prof. Dr. Marcelo Menossi

Instituição: Departamento de Genética – IB – UNICAMP

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciência Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), na UNICAMP, e no Laboratório de Biofísica do Transporte em Membranas do Dr. Petr Ježek, na Academia de Ciências da República Tcheca, em Praga, sob a orientação do Professor Anibal Eugênio Vercesi, e colaboração do Professor Dr. Paulo Arruda e do Dr. Petr Ježek, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-Unicamp).

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu filho Lucas.

(uma vã tentativa de justificar o tempo

que eu deixei de dedicar a ele)

Ao Professor Anibal E. Vercesi, por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência, e principalmente pelo monumental esforço em proporcionar material e ambiente adequados para meu desenvolvimento profissional.

Aos Drs. Paulo Arruda e Adilson Leite, pela utilização de seus respectivos laboratórios e conhecimentos nas questões de biologia molecular. Ao Dr. Petr Ježek, pela calorosa acolhida em Praga, pelos ensinamentos e pela enorme disposição em desenvolver toda e qualquer pesquisa relacionada à PUMP. Aos Drs. Ivan G. Maia e Jiri Borecký, do CBMEG, pelo auxílio cotidiano nos experimentos de biologia molecular.

Às secretárias Marlúcia, Marcinha e Carmem, pela paciência em indicar o correto encaminhamento dos documentos e responder às intermináveis dúvidas burocráticas.

À FAPESP, pelo inestimável auxílio financeiro, e tudo o que ele trouxe.

À Márcia, colega de bancada e conhecedora-mor das burocracias, pelas infinitas ajudas com os relatórios técnicos da Fapesp e do FAEP-Unicamp.

Aos colegas de laboratório Adriana, Alícia, Andréia Almeida, Andréa Damico, André, Celene, Cláudia, Denise, Evelise, Fabiane, Félix, Felipe, Giuliana, Graziela, Luciana, Natália, Renata, Ricardo, Roger, Rosana, Solange, pelas festas, brincadeiras, discussões, enfim, pelo aprendizado que só a convivência traz.

Às técnicas, Edilene e Elisângela, por conseguir manter alguma ordem no caos diário do laboratório.

À minha esposa Cinthia, pela dedicação e empenho, e pelo carinho nas horas mais difíceis. E, principalmente, por ter sido “pai” também durante algum tempo. Não deve ter sido fácil...

Aos meus amigos, Pim, Carol, Boial, Wally, Top, Carlinha, Matheus, Moça, Félix, pelos momentos de descontração (o Movimento Ninguém Merece Segunda-feira nunca morrerá!!!), pelas discussões filosóficas, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas verdades ditas, enfim por terem sido como amigos devem ser.

Aos meus pais Irani e Mari, pelo amor desmesurado e só agora compreendido, e por terem acreditado nas vontades do seu filho.

Aos meus irmãos Renata e Rafael, pelo constante apoio e preocupação.

Ao meu avô Hélio, que vive diariamente a força do pensamento e do conhecimento, e despertou em mim a curiosidade e a ânsia do verdadeiro pensar.

À Deus, ou qualquer outro nome que seja dado ao princípio de tudo, fonte inspiradora que me impele num incessante crescimento moral e intelectual através de suas leis universais. Minha compreensão de que fazemos parte de um todo indivisível e interconectado, ou seja, uma visão holística do mundo e de seus desafios, não é uma religião e sim uma filosofia de vida.

“Para aprender sobre o mundo, é necessário se aproximar dele. A espiritualidade que eu vejo na ciência está nessa aproximação, no constante processo de desvendar algo de novo sobre a natureza, nesse levantar dos véus. É nessa ressonância que reside o mistério, na agonia da dúvida e no êxtase da descoberta.”

Marcelo Gleiser

Science wants to know the mechanisms of the Universe.

Religion, the meaning.

The two cannot be separated.

Charles Townes (Prêmio Nobel 1964)

The problem of being on the cutting edge is that

occasionally you get sliced...

Clark Duncan

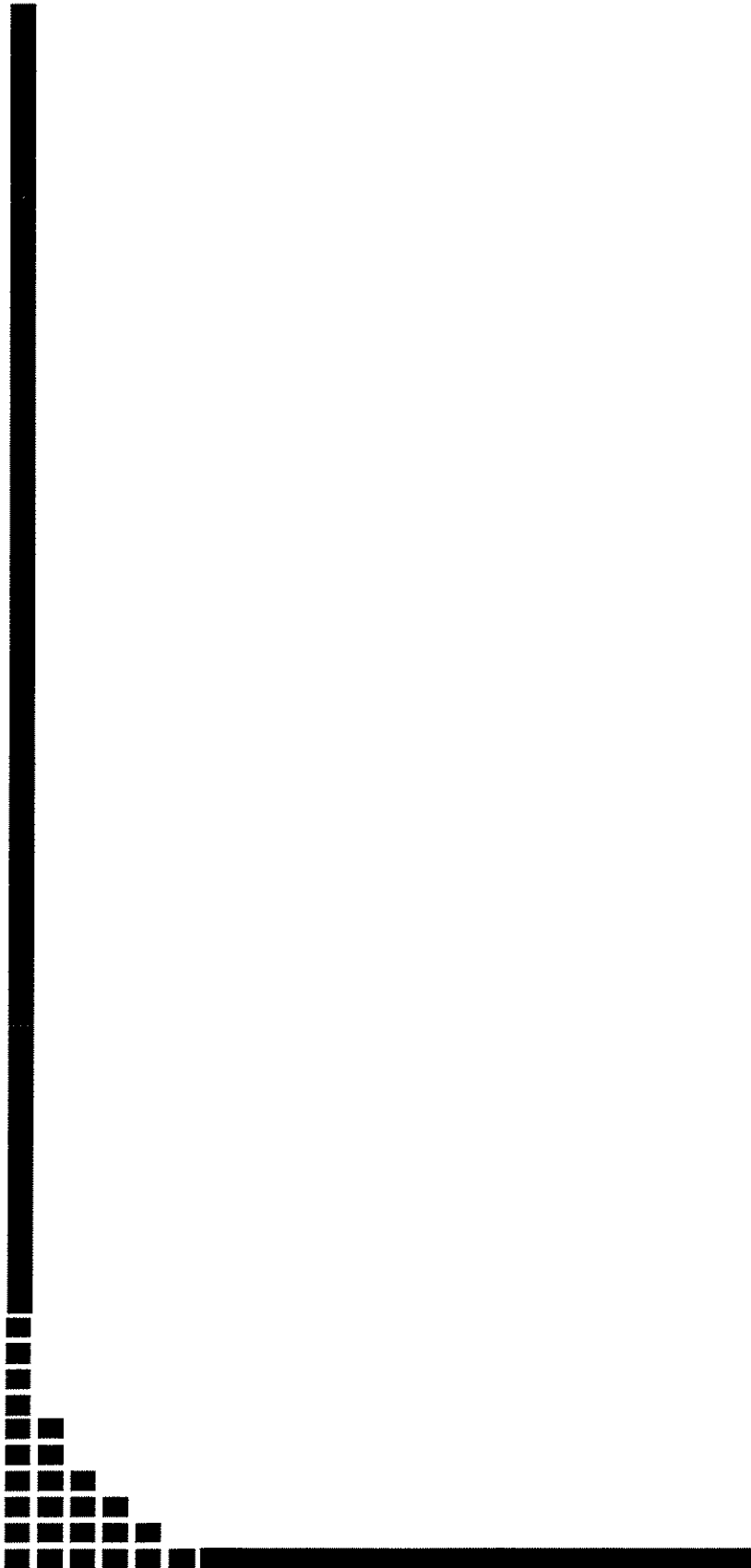
	PÁG.
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. METODOLOGIA.....	59
1. Material biológico e Reagentes químicos.....	61
2. Condições experimentais e isolamento de mitocôndrias de tubérculo de batata, tomate e coleóptiles de milho e de fígado de rato.....	61
3. Isolamento de esferoplastos e mitocôndrias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
4. Clonagem e expressão do gene <i>AtPUMP1</i> em <i>Escherichia coli</i> e <i>S. cerevisiae</i>	64
5. Reconstituição da proteína <i>AtPUMP1</i> em vesículas lipídicas e detecção fluorimétrica do fluxo de H^+	66
6. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e detecção imunoquímica.....	67
7. Sequenciamento do gene <i>ZmPUMP1</i> e software de comparação.....	68
8. Isolamento de RNA total e mRNA de diferentes tecidos de milho.....	69
9. PCR em Tempo Real.....	70
10. Medida do consumo de oxigênio, do potencial elétrico transmembrana e da peroxidação lipídica por mitocôndrias de coleóptiles de milho.....	73
11. Medida da geração de H_2O_2 por mitocôndrias de batatas através da oxidação da escopoletina.....	74

3. RESULTADOS.....	75
1. Curva de crescimento de leveduras após expressão da proteína <i>AtPUMP1</i>	77
2. Potencial de membrana de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	78
3. Expressão da proteína <i>AtPUMP1</i> fusionada com MBP e clivagem do produto de expressão <i>AtPUMP1</i> :MBP.....	78
4. Expressão da <i>AtPUMP1</i> em corpúsculos de inclusão.....	79
5. Transporte de H^+ em proteolipossomos e inibição por nucleotídeos.....	80
6. Cinética de transporte de H^+ mediado por vários ácidos graxos em proteolipossomos e lipossomos para cálculo de K_m e V_{max}	81
7. Cinética da inibição do transporte de H^+ pela <i>AtPUMP1</i> por nucleotídeos de purina.....	82
8. Sequência de aminoácidos da <i>ZmPUMP1</i> e comparação com outras UCP/PUMP.....	84
9. Potencial de membrana de mitocôndrias de coleóptiles de milho.....	85
10. Curva de concentração o cofator Mg^{2+} para amplificação do amplicon <i>ZmPUMP1</i> em mRNA coleóptile de milho.....	85
11. Variação do mRNA da <i>ZmPUMP1</i> e da ubiquitina em coleóptiles submetidos a estresses frio e salino.....	86
12. Razão ADP/O de mitocôndrias de milho submetido a estresses frio e salino.....	86
13. Peroxidação lipídica (TBARS) em mitocôndrias de milho submetido a estresses frio e salino.....	87
14. Detecção imunoquímica com anticorpos anti- <i>SlPUMP</i> de mitocôndrias de milho submetido a estresses frio e salino.....	88
15. Consumo de oxigênio por mitocôndrias de tomates mantidos em atmosfera hiperoxigenada.....	89

16. Detecção imunoquímica com anticorpos anti- <i>Sr</i> PUMP de mitocôndrias de tomate submetidos a atmosfera hiperoxigenada.....	90
17. Efeito de inibidores e ativadores da <i>Sr</i> PUMP na geração de H ₂ O ₂ pela respiração de mitocôndrias de batata.....	90
18. Efeito de inibidores e ativadores da <i>Sr</i> PUMP na geração de H ₂ O ₂ pela respiração de mitocôndrias de batata na presença de Ca ²⁺	91
4. FIGURAS.....	93
5. DISCUSSÃO.....	111
6. CONCLUSÕES.....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
8. APÊNDICES.....	151

LISTA DD ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
AOX	oxidase alternativa
AT(D)P	adenosina tri (di) - fosfato
BHAM	ácido benzohidroxâmico
BSA	albumina soro bovina
DTT	ditiotreitól
EAOs	espécies ativadas de oxigênio
ESTs	etiquetas de seqüências de expressão
GT(D)P	guanosina tri (di) – fosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
kDa	kilodalton
NAD(P)	nicotinamida adenina di – fosfato
ORFs	fases abertas de leitura
Pi	fosfato inorgânico
PPAR- α (γ)	ativador do receptor de proliferação de peroxissomos
PUMP	Plant Uncoupling Mitochondrial Protein
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	fator de necrose tumoral
UCP	uncoupling protein
UT(D)P	uridina tri (di) – fosfato
$\Delta\mu\text{H}^+$	gradiente eletroquímico de prótons



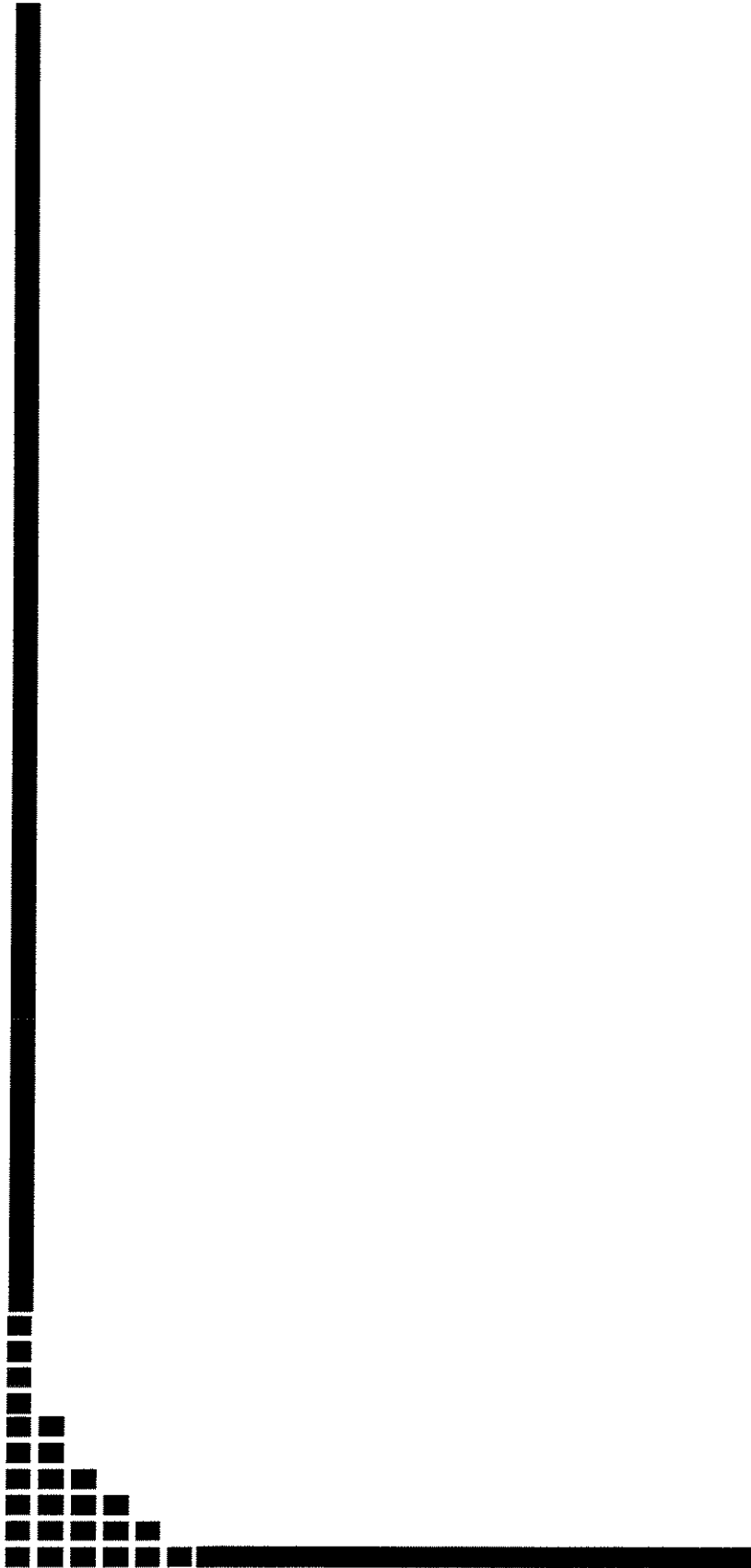
RESUMO

O presente trabalho está dividido em duas partes: a reconstituição funcional de uma proteína desacopladora de *Arabidopsis thaliana* e a medida da expressão e da atividade de uma proteína desacopladora em resposta a diversos estresses abióticos.

A expressão do gene *AtPUMP1* em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* permitiu a confirmação de que este gene realmente codifica uma proteína desacopladora, capaz de dissipar energia do gradiente eletroquímico de H^+ . Num ambiente termoneutro (28 °C), células expressando a *AtPUMP1* cresceram mais lentamente que células controle, enquanto sob baixa temperatura (14 °C) a taxa de crescimento de ambas as células foi semelhante. Quando expressa em um sistema procariótico e reconstituída em vesículas lipídicas, a *AtPUMP1* mostrou características cinéticas semelhantes às descritas para as outras proteínas desacopladoras. O transporte de H^+ foi induzido por diferentes ácidos graxos, de uma maneira dependente do tamanho da cadeia de carbonos e do número de insaturações na mesma. Este transporte de H^+ foi inibido por nucleotídeos de purina, sendo que mudanças no pH do meio externo alteraram a afinidade da *AtPUMP1* por nucleotídeos. Através dos experimentos de reconstituição, verificamos que as constantes de afinidade e velocidade máxima de transporte (K_m e $V_{máx}$) são similares às obtidas para outras proteínas desacopladoras vegetais e também para as UCP2 e 3.

A expressão e a atividade da proteína desacopladora também foi estudada em situações de estresse abiótico, como excesso de sal, temperatura baixa e atmosfera hiperoxigenada, situações que sabidamente geram estresse oxidativo. Em coleóptiles de milho, a expressão do mRNA para a proteína desacopladora aumenta durante o estresse salino e permanece inalterada durante o estresse por frio. Entretanto, a expressão da proteína e a disponibilidade de substratos aumentaram significativamente nos dois casos, sugerindo uma regulação pós-transcricional para este gene. Observamos ainda que mitocôndrias isoladas de coleóptiles de milho submetidos a estresse salino e por frio possuem uma razão ADP/O diminuída, que retorna para níveis controle na presença de BSA ou GTP. Em situações de aumento intracelular de Ca^{2+} , observamos também que ativadores da proteína desacopladora inibem a geração mitocondrial de EAOs e que seus inibidores aumentam esta geração.

Considerando os resultados aqui apresentados, podemos, portanto, concluir que a *AtPUMP1* é uma verdadeira proteína desacopladora, capaz de afetar o crescimento celular, induzindo um desacoplamento mediado por ácidos graxos e inibido por nucleotídeos de purina. É possível sugerir ainda que a proteína desacopladora desempenhe um papel importante em situações de estresse abiótico, diminuindo a geração mitocondrial de EAOs de forma a proteger o organismo do estresse oxidativo resultante.



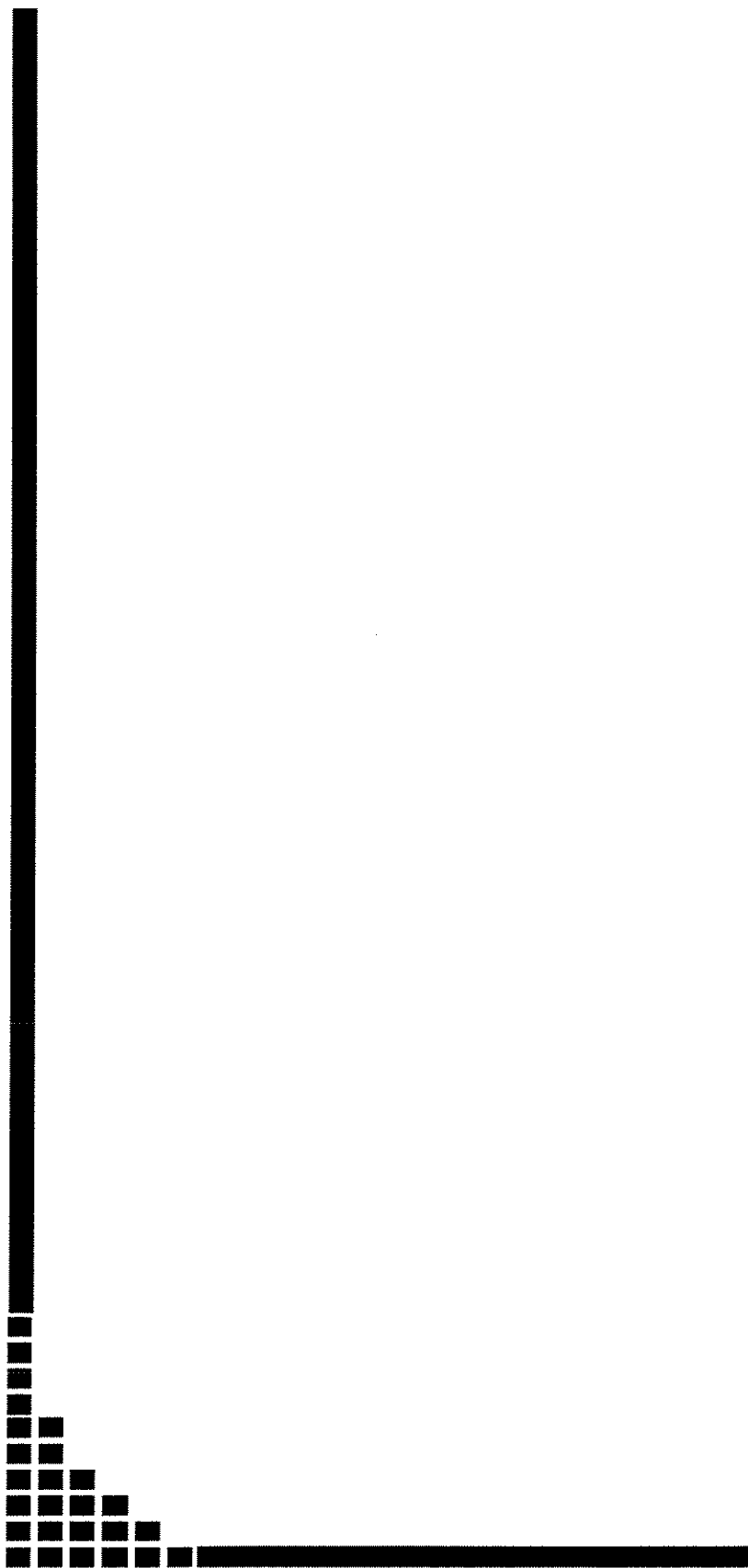
ABSTRACT

The present work is divided in two parts: the functional reconstitution of the *Arabidopsis thaliana* uncoupling protein 1 (*AtPUMP1*) and the expression and activity of the uncoupling protein under several abiotic stresses.

AtPUMP1 expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* allowed us to confirm that this gene codes for a true uncoupling protein, able to divert energy of the proton electrochemical gradient. In a thermoneutral environment (28 °C), *AtPUMP1* expressing cells grew slower than control cells, while under low temperatures (14 °C) growth rates were similar. When expressed in a prokaryotic system and reconstituted in lipid vesicles, *AtPUMP1* showed similar biochemical patterns to those already described for other uncoupling proteins. H⁺ transport was induced by several fatty acids and was dependent on the length and insaturations of the alkyl chain of the substrates. Purine nucleotides were able to inhibit this proton transport, while changes in external pH alter *AtPUMP1* affinity for the nucleotides. Reconstitution experiments helped us to determine the K_m and the V_{max} for *AtPUMP1*. The values are within the physiological levels and very similar to those already obtained for other uncoupling proteins.

We also studied the expression and activity of the uncoupling protein under situations of abiotic stresses, such as salinity, low temperature (chilling) and hyperoxygenated atmosphere. These situations are known to generate an oxidative stress. In maize coleoptiles, *ZmPUMP* mRNA expression increases under salt stress and does not change under chilling. However, protein expression and availability of substrates increased significantly on both situations, suggesting a post – transcriptional regulation for this gene. Moreover, mitochondria isolated from salt and cold stressed maize coleoptiles showed smaller ADP/O ratio, which returns to control levels in the presence of BSA or GTP. In tomatoes submitted to a hyperoxygenated atmosphere, PUMP concentration and AOX activity patterns were similar to those already described for post-harvest ripening. However, preliminary experiments show increase in lipid peroxidation, resulting in a release of free fatty acids, and consequent AOX inhibition and PUMP activation, even with a decrease in PUMP protein content. Under situations of high intracellular Ca²⁺, we are able to observe also that uncoupling protein activators inhibit the mitochondrial generation of Reactive Oxygen Species (ROS) and that its inhibitors increased this generation.

Considering all the above results, we can conclude that *AtPUMP1* is a true uncoupling protein able to influence cell growth through an uncoupling mechanism mediated by fatty acids and inhibited by purine nucleotides. It is also possible to suggest that plant uncoupling proteins have a significant role under abiotic stress situations, decreasing mitochondrial ROS generation and thus protecting the tissue from the resulting oxidative stress.



1. INTRODUÇÃO

Considerando a célula como unidade fisiológica funcional de um organismo, podemos dizer que as mitocôndrias são as suas usinas de energia. As mitocôndrias são as organelas responsáveis por transferir e armazenar a energia contida nas ligações químicas dos alimentos para ligações químicas em compostos fosfatados de alta energia, como por exemplo, o ATP e o GTP, largamente utilizados nos processos celulares.

Durante muitos anos os pesquisadores procuraram, sem sucesso, por um composto químico que intermediasse a transferência de energia realizada pelas mitocôndrias, correlacionando a cadeia transportadora de elétrons com a fosforilação oxidativa do ADP. Finalmente, em 1961, Peter Mitchell postulou a Teoria Quimiosmótica, segundo a qual a transferência e o armazenamento da energia extraída dos alimentos somente seria possível devido à geração de um gradiente eletroquímico através da membrana interna da mitocôndria. A redução do O_2 a H_2O pela cadeia respiratória resultando na formação de um gradiente de prótons (H^+) através da membrana interna foram os fundamentos que levaram Mitchell a postular sua teoria. A presença de bombas de H^+ na cadeia transportadora de elétrons, ativadas pela passagem dos elétrons através dos intermediários redox da cadeia respiratória, gera um gradiente elétrico e químico entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos alimentares e a utilização desta energia pela célula. O fluxo de H^+ de volta à matriz mitocondrial através do complexo enzimático F_0F_1 -ATP sintetase, desta vez a favor do gradiente de concentração, estaria diretamente acoplado à fosforilação do ADP em ATP (Nicholls e Ferguson, 1982).

Além de permitir o armazenamento de energia nas ligações químicas dos compostos fosfatados, a formação do gradiente eletroquímico transmembrânico também é aproveitada pelos cloroplastos na fotossíntese de ATP (Gardestrom e Lernmark, 1995). Alguns processos que não dependem da síntese de ATP também são realizados pelas mitocôndrias aproveitando o gradiente de H^+ , como por exemplo as trocas eletroforéticas de ATP^{4-} por ADP^{3-} (Klingenberg, 1990), a redução do $NAD(P)^+$ pela transidrogenase específica (Hoek e Rydstöm, 1988) e o transporte eletroforético de Ca^{2+} do citoplasma para a matriz mitocondrial (Gunter e Gunter, 1994).

1. HOMEOSTASE INTRACELULAR E MITOCONDRIAL DO ÍON CÁLCIO

A captação do íon cálcio pelas mitocôndrias é utilizada pela célula como um dos mecanismos de regulação da concentração deste íon no citosol. A concentração de Ca^{2+} livre no citosol é cerca de 10^4 vezes menor que na matriz extracelular, e esta diferença é essencial para a função deste íon como mensageiro de sinais bioquímicos ao interior celular (Berridge, 1997). A concentração do cálcio intracelular, por sua vez, é precisamente regulada por canais na membrana plasmática, e pelas organelas retículo endo(sarco)plasmático, núcleo e mitocôndria.

Os processos de entrada do íon cálcio através da membrana plasmática são mediados por canais voltagem dependentes ou regulados por mensageiros secundários (Berridge, 1997); o efluxo, por sua vez, é promovido por uma Ca^{2+} -ATPase, com gasto energético de uma molécula de ATP por íon translocado (Carafoli, 1989; 1994), ou por um sistema de translocação Na^+/Ca^+ , que utiliza a energia do potencial eletroquímico de Na^+ (Reeves e Hale, 1984). Em tecidos excitáveis, o segundo mecanismo é significativamente mais ativo, podendo inclusive influenciar o influxo celular de Ca^{2+} (Carafoli, 1989; Reeves e Hale, 1984).

O retículo endo(sarco)plasmático é considerado o principal reservatório intracelular de Ca^{2+} , possuindo vias independentes de transporte do íon. A entrada do íon é mediada por uma Ca^{2+} -ATPase, que hidrolisa uma molécula de ATP para cada par de íons translocados. A ativação de canais de Ca^{2+} é estimulada pelo mensageiro intracelular inositol-1,4,5- trifosfato, liberando o íon que atuará, então, como segundo mensageiro intracelular (Berridge, 1987; 1997).

O transporte de cálcio pela mitocôndria é conhecido desde a década de 60. Sabe-se hoje que este transporte é o saldo líquido do transporte mediado por dois mecanismos: o de influxo e o de efluxo, este último ocorrendo por duas vias, uma Na^+ -dependente (Crompton et al, 1976) e outra Na^+ - independente (Rottemberg e Scarpa, 1974; Gunter e Pfeiffer, 1990; Gunter e Gunter, 1994). O influxo do íon ocorre em resposta ao potencial elétrico de membrana, por um processo eletroforético (Gunter e Pfeiffer, 1990; Gunter e Gunter, 1994). O processo de saída Na^+ - dependente é mais ativo em células

excitáveis, trocando um íon Ca^{2+} interno por dois íons Na^+ externos (Brand, 1985b; Li e col., 1992). O efluxo Na^+ - independente ocorre em mitocôndrias de todos os organismos, trocando dois H^+ externos por um Ca^{2+} interno (Nicholls, 1978; Brand, 1985a). A habilidade das mitocôndrias, particularmente na presença de Mg^{2+} e ATP, em controlar a concentração de Ca^{2+} muito próxima da concentração que se acreditava estar presente no citosol, levou diversos pesquisadores a propor uma função significativa para esta organela na regulação da concentração de cálcio livre no citosol (Fiskum e Lehninger, 1979; Akerman e Nicholls, 1983). Entretanto, estudos subsequentes revelaram que a concentração do cálcio mitocondrial total de células normais *in vivo* era incompatível com as características cinéticas dos transportadores envolvidos no processo de regulação mitocondrial do Ca^{2+} citosólico, indicando que o influxo do íon seria inoperante (Somlyo e col., 1985; McCormack e col., 1990).

Desta forma, aceita-se atualmente que a principal função do transporte do íon cálcio pelas mitocôndrias é regular a concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial em faixas de concentração compatíveis com o estímulo da atividade de determinadas enzimas regulatórias do ciclo de Krebs (Carafoli, 1987; McCormack e col., 1990). Quando a concentração citosólica de Ca^{2+} aumenta em resposta a estímulos externos que demandam energia, como por exemplo sob a ação de hormônios que ativam processos de secreção ou contração, o sistema de captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias se torna operante. Com o aumento da concentração de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, três desidrogenases do ciclo de Krebs (pirúvica, cetoglutarica e isocítrica) tem sua atividade estimulada, resultando no aumento da produção de ATP, necessário para suprir a demanda energética do processo celular iniciado pelo hormônio (Hansford, 1985; McCormack e Denton, 1986).

2. SISTEMAS DISSIPADORES DE ENERGIA EM MITOCÔNDRIAS

Além de ser utilizada para diversos processos fisiológicos mitocondriais, como citado anteriormente, a energia do potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) pode ainda ser utilizada para a produção de calor (Nicholls e Ferguson, 1982), consumindo O_2 sem produção de ATP. Foster e Frydman (1978) mostraram que, em animais devidamente

letroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$) pode ainda ser utilizada para a produção de calor (Nicholls e Ferguson, 1982), consumindo O_2 sem produção de ATP. Foster e Frydman (1978) mostraram que, em animais devidamente adaptados ao frio, o tecido adiposo marrom, estimulado por norepinefrina, respira a uma velocidade cerca de 60 vezes maior que uma massa equivalente de tecido hepático, estabelecendo a relação entre a termogênese e o tecido adiposo marrom (Foster e Frydman, 1978). Estes autores mostraram que o fluxo sanguíneo para o tecido adiposo marrom aumenta significativamente durante a termogênese induzida por norepinefrina, identificando-o como tecido dominante na termogênese animal. Desta forma, o tecido adiposo marrom concentrou as atenções dos pesquisadores durante muito tempo.

A energia do potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$) pode ser também dissipada através do escape de prótons através da membrana e/ou proteínas nela embebidas. A recente observação do escape de prótons (H^+ slip) pela citocromo c oxidase em situações de alto potencial protônico, que favorecem a geração de EAOs, tem sido sugerida como uma forma de regular a atividade geral do organismo de forma a evitar danos oxidativos (Kadenbach e col., 2000).

2.1. Proteínas desacopladoras de mamíferos: a UCP1 e as novas UCPs

As bases moleculares da geração de calor pelo tecido adiposo marrom começaram a ser esclarecidas com a demonstração da presença de uma proteína de 32 kDa na membrana mitocondrial interna dos adipócitos, complementado com um amplo estudo sobre suas principais características fisiológicas, como o aumento do consumo de O_2 , o transporte de ânions monovalentes e os efeitos provocados pelos nucleotídeos de purina e pela albumina de soro bovina (BSA), quelante de ácido graxos (Nicholls e Lindberg, 1973; Nicholls, 1974, 1976, 1979; Locke e col., 1982). Rial e Nicholls (1984) demonstraram que a expressão desta proteína (então chamada de termogenina, ou proteína desacopladora) estaria relacionada com o rigor do estresse térmico ao qual o animal é submetido.

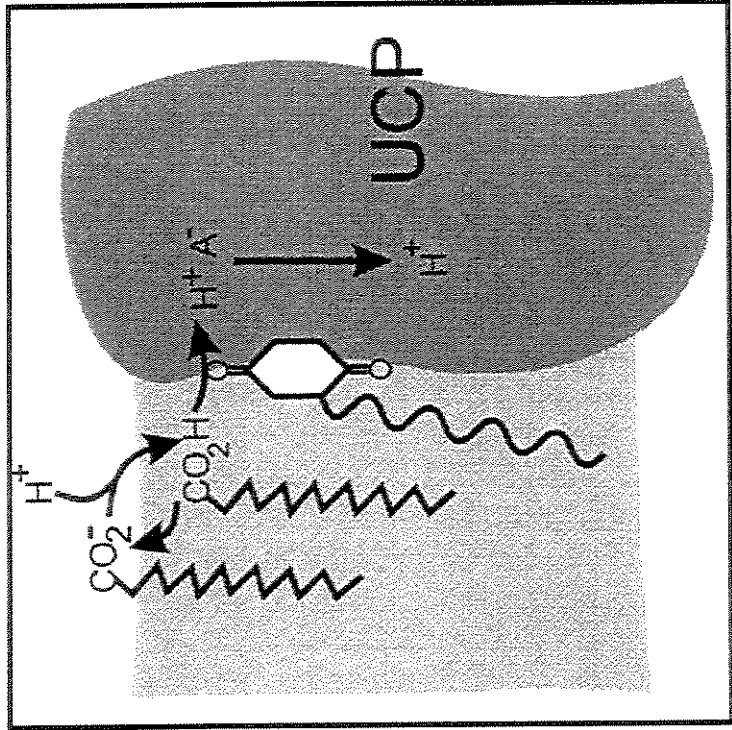
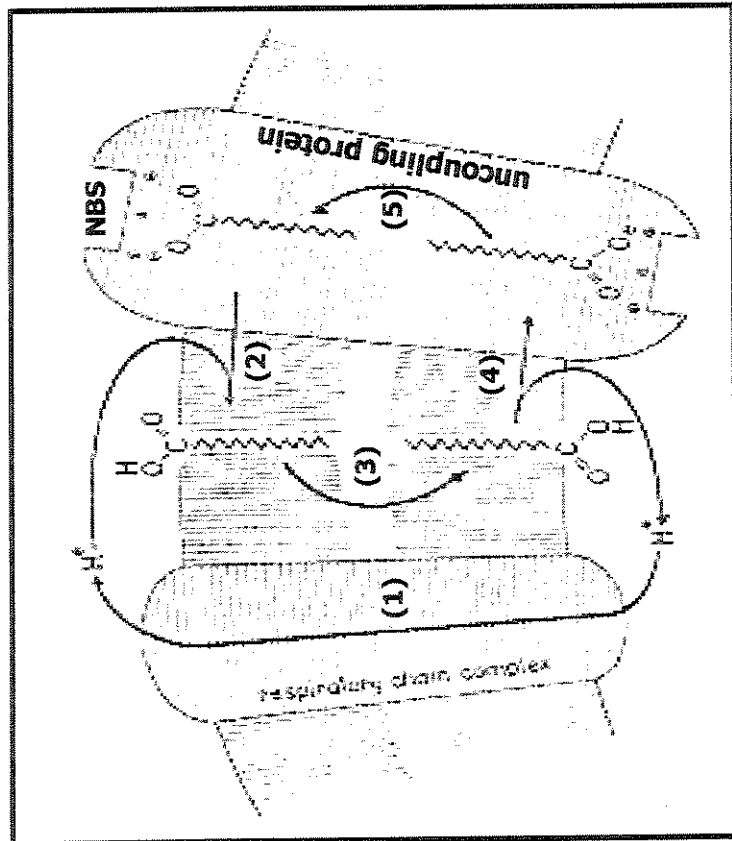
organismos, como pássaros (Vianna e col., 2001), plantas (Laloi e col., 1997; Maia e col., 1998; Ježek e col., 2000a), amebas (Jarmuszkiewicz e col., 1999a), insetos (Hanák e Ježek, 2001), fungos (Jarmuszkiewicz e col., 1999b), e parasitas (Uyemura e col., 2000). Além disso, diversos outros genes de UCPs foram identificados no organismo humano como os de UCP2 (Fleury e col., 1997), UCP3 (Boss e col., 1997; Vidal-Puig e col., 1997), UCP4 (Mao e col., 1999) e UCP5 (Sanchis e col., 1998). Desta forma, a UCP encontrada no tecido adiposo marrom foi chamada de UCP1. Estudos recentes postulam que a UCP4 seja a proteína ancestral, à partir da qual evoluíram as outras UCPs (Hanák e Ježek, 2001). Os autores chegaram a esta conclusão após busca em bancos gênicos pelas assinaturas e motivos típicos das UCPs e por terem encontrado similaridades significativas entre a sequência da UCP4 e sequências presentes em vários genomas, o que sugere que a UCP4 surgiu evolutivamente num ancestral comum aos seres vivos (Ježek e Urbánková, 2000; Hanák e Ježek, 2001).

2.1.1. Possíveis mecanismos de funcionamento das proteínas desacopladoras

A proteína desacopladora de mamíferos (UCP1) tem por principal função dissipar o gradiente eletroquímico de prótons das mitocôndrias para gerar calor para o organismo, desacoplando a cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa. O desacoplamento regulado mediado pelas proteínas desacopladoras aumenta a condutância de H^+ através da membrana mitocondrial interna, reduzindo apenas ligeiramente o potencial de membrana de maneira que possa ocorrer simultaneamente produção de ATP e de calor (Nicholls e Berson, 1977). Demonstrou-se recentemente que a UCP, como outros membros da sua família de proteínas, são translocadores de ânions inibidos por nucleotídeos de purina (Garlid e col., 1996; Klingenberg, 1990; Ježek e col., 1990; Nicholls, 1979). Os nucleotídeos de purina são considerados reguladores alostéricos fisiológicos do processo da termogênese (Nicholls, 1979; Klingenberg, 1990). Sabe-se que o desacoplamento promovido pela UCP1 é dependente da presença de ácidos graxos livres, que também participam do processo de termogênese (Nicholls, 1979; Locke e col., 1982; Klingenberg, 1990; Garlid e col., 1998).

Atualmente, dois modelos têm sido propostos para explicar o mecanismo através do qual os ácidos graxos ativam o transporte de prótons via UCP: o Modelo Tamponante (Winkler e Klingenberg, 1994; Rial e González-Barroso, 2001; Klingenberg e col., 2001) e o Modelo Protonoforético (Garlid e col., 1998; 2000; Jabůrek e col., 2001)(veja figura na página seguinte).

O Modelo Tamponante (Winkler e Klingenberg, 1994) propõe que ácidos graxos se ligariam a sítios localizados perto do canal de prótons da UCP, principalmente em resíduos de histidinas, criando grupos aceptores/doadores de elétrons que facilitariam o transporte de H^+ . Estes autores demonstraram que mutações nas His¹⁴⁵ e His¹⁴⁷ aboliram o transporte de prótons, o que os levou a concluir que estes aminoácidos fazem parte do hipotético canal de prótons (Bienengraeber e col., 1998). A interpretação destes resultados pelos autores levou-os a predizer que a UCP2 não seria capaz de transportar prótons por não conter histidinas nas respectivas posições, e que a UCP3 seria capaz apenas de um transporte menor. Entretanto, a proteína desacopladora de plantas presente em batatas não possui nenhuma das histidinas e é capaz de catalizar desacoplamento e transporte de prótons dependente de ácidos graxos de forma bastante eficiente (Ježek e col., 1996, 1997a; Laloi e col., 1997). Recentemente, o grupo do Dr. Martin Klingenberg demonstrou que a baixa atividade das proteínas desacopladoras UCP2 e UCP3 quando expressas em *E. coli* é devida à falta de um cofator, a coenzima Q (ou ubiquinona)(Echtay e col., 2000; 2001). De acordo com estes novos dados, a coenzima Q, bastante hidrofóbica, poderia penetrar mais profundamente na bicamada lipídica, formando uma ponte para os ácidos graxos protonados entrarem na bicamada para doar H^+ para os resíduos aceptores no hipotético canal de H^+ da UCP (Echtay e col., 2000; 2001).



Possíveis mecanismos de ação da proteína desacopladora. No **Modelo Protonoforético** (à esquerda), os prótons ejetados pela cadeia respiratória (1) neutralizam os grupamentos carboxila dos ácidos graxos na membrana mitocondrial (2). Através de um movimento de “flip-flop” (3), os ácidos graxos neutros cruzam a membrana, se dissociando no lado da matriz mitocondrial (4). As proteínas desacopladoras catalizariam a passagem dos ácidos graxos agora negativos através da bicamada lipídica (5), completando um ciclo fútil de H^+ (Garlid e col., 1998). No **Modelo Tamponante** (à direita), existiria a formação de uma ponte entre o sítio de ligação na UCP (His^{145} e His^{147}), a coenzima Q e ácidos graxos protonados, formando uma passagem para os H^+ através da membrana mitocondrial (Echtay e col., 2001). NBS = Nucleotide Binding Site.

Entretanto, as hipóteses levantadas por estes autores encontram dificuldades para explicar a independência entre o transporte de Cl^- e a presença de ácidos graxos (a não ser que existam dois caminhos possíveis, um para H^+ e outro para Cl^-), bem como para conciliar a inibição pelos nucleotídeos e a falta de competitividade entre estes e os ácidos graxos. Porém, este modelo guarda certa semelhança com o mecanismo de transporte de H^+ pela bacteriorrodopsina, onde uma base de Schiff é o translocador central de H^+ (Butt e col., 1989).

O Modelo Protonoforético propõe um ciclo fútil de ácidos graxos através da bicamada lipídica, por um mecanismo de "flip-flop" (Skulachev, 1991, 1999). Ácidos graxos aniônicos presentes no interior das mitocôndrias particionam-se na membrana mitocondrial com seus grupamentos hidrofílicos abaixo do nível das outras cabeças lipídicas, se difundindo lateralmente na membrana e alcançando o sítio de ligação na UCP (Garlid e col., 1996; 2000). A proteína desacopladora catalisa o transporte do ânion, deixando o grupamento hidrofílico exposto para o citoplasma. No exterior das mitocôndrias, os ácidos graxos se desligam do sítio de ligação se difundindo lateralmente na membrana, se protonam e, na forma neutra, retornam rapidamente para a matrix mitocondrial por um mecanismo de "flip-flop", resultando num ciclo fútil com transporte líquido de um H^+ para cada ciclo (Garlid e col., 1996; 2000). Garlid e col. (1996) mostraram ainda que o tamanho da cadeia hidrofóbica do ácido graxo influencia sua velocidade de flip-flop, provavelmente pelo fato do ácido graxo de cadeia mais longa alcançar mais rapidamente o sítio hidrofóbico de ligação na UCP. Existem evidências de que ácidos graxos protonados difundem-se rapidamente ($K < 1 \text{ seg}^{-1}$) através de bicamadas de fosfolipídios (Kamp e Hamilton, 1993). Estudos demonstraram a existência de ácidos graxos aniônicos incapazes de fazer "flip-flop", porém capazes de se inserir na membrana (Ježek e col., 1997b). Num estudo subsequente, Ježek e col. (1997c) mostraram que os ácidos graxos considerados inativos não eram substratos para a UCP. Através destes estudos, o Modelo Protonoforético se tornaria inválido se um ácido graxo ativasse o transporte de H^+ pela UCP, mas fosse incapaz de acidificar o interior vesicular por "flip-flop". Entretanto, se um ácido graxo fosse capaz de fazer "flip-flop" e não induzisse o transporte de H^+ pela UCP o modelo não seria contradito, porém este ácido graxo ainda não foi encontrado (Ježek e col., 1997c).

A evidência mais forte favorecendo o Modelo Protonoforético é a ação de uma classe de substratos para as proteínas desacopladoras, os alquilsulfonados. Estes análogos dos ácidos graxos (que possuem um grupamento SO_3^- em substituição à carboxila) são inibidores competitivos do transporte de Cl^- , de maneira sensível a nucleotídeos (Garlid e col., 1996). Devido a seu pK_a bastante baixo, esta classe de moléculas raramente se encontra protonada (neutra) no meio de reação, não podendo atravessar a bicamada lipídica (flip-flop) e realizar transporte de prótons (Garlid e col., 1996). Eliminando-se esta imposição química, os alquilsulfonados seriam capazes de induzir transporte de H^+ através da bicamada lipídica (ou desacoplamento). Recentemente, Jabůrek e colaboradores (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 sensível a GDP em mitocôndrias de tecido adiposo marrom de hamsters, indicando que a UCP1 cataliza o transporte de ânions, e o transporte de H^+ acontece durante o flip-flop na membrana lipídica (Jabůrek e col., 2001).

2.1.2. Regulação da atividade e da expressão das proteínas desacopladoras de mamíferos

Centenas de trabalhos têm sido publicados nos últimos anos relatando diversos reguladores da expressão das proteínas desacopladoras. Uma simples busca na base de dados PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) resulta em mais de 300 citações para os últimos 5 anos. Uma surpreendente gama de receptores e elementos responsivos de DNA, somados à participação de diversos fatores de transcrição, se mostraram importantes fontes de variação na expressão das proteínas desacopladoras.

Entre os principais reguladores da expressão do gene da UCP1, podemos destacar a norepinefrina (Foellmi-Adams e col., 1996; Jansky, 1995), os hormônios tireoideanos (Gong e col., 1997; Jekabsons e col., 1999), ácido retinóico (Puigserver e col., 1996; Chevillotte e col., 2001), insulina (Klaus e col., 1995), leptina (Zhou e col., 1997; Gong e col., 1997), e $\text{TNF-}\alpha$ Faggioni e col., 1998). Dentre os receptores nucleares

envolvidos com a regulação da expressão das UCPs, podemos citar o PPAR- α (Camirand e col., 1998) e o PPAR- γ (Chevillotte e col., 2001), além dos receptores retinóicos (Carmona e col., 1998).

Recentemente, um tipo de regulação pós-transcricional foi descrito para o gene da UCP2 (Pecqueur e col., 2001). Estes autores mostraram que a presença de Fases Abertas de Leitura (ORFs) à montante (“upstream”) do gene *UCP2* inibe fortemente a tradução do mRNA em proteína. Quando mutadas e inseridas num sistema de expressão, a tradução do mRNA em proteína aumenta até 50 vezes, o que talvez explique a falta de correlação entre os níveis de mRNA e proteína encontrados nos tecidos (Pecqueur e col., 2001). Considerando que a UCP2 é mais expressa no estômago e nos pulmões (tanto mRNA quanto proteína), sua tradução seria rapidamente aumentada utilizando o “pool” de mRNA existente em situações de aumento da concentração intracelular de EAOs (Pecqueur e col., 2001). Desta forma, as conclusões obtidas por estudos baseados somente na quantificação de mRNA devem ser revistas, uma vez que os níveis das proteínas desacopladoras nos tecidos podem não ser diretamente proporcionais à quantidade de mRNA (Pecqueur e col., 2001). Apoiando a hipótese de regulação pós-transcricional, estes autores observaram que outras duas proteínas desacopladoras pouco expressas nos tecidos, a UCP3 e a UCP5, também possuem ORFs à montante de seus genes.

A estrita necessidade de ácidos graxos para o transporte de prótons pelas proteínas desacopladoras é um fato conhecido há vários anos (Nicholls, 1979; Garlid e col., 1998; Skulachev, 1999). Entretanto, como visto anteriormente, o mecanismo pelo qual os ácidos graxos estimulam o consumo de oxigênio mitocondrial ainda é motivo de controvérsia e discussão. Os ácidos graxos exercem um duplo efeito na bioenergética mitocondrial, funcionando como substratos respiratórios e como reguladores do acoplamento entre respiração e fosforilação. Este duplo efeito dos ácidos graxos sobre a termogênese, por exemplo, permite que animais como os ursos mantenham uma temperatura de cerca de 35°C durante vários meses de hibernação. No período que precede o início da hibernação, o urso armazena gordura que, com o estímulo adrenérgico causado pelo frio, fornece ácidos graxos livres como substratos respiratórios e estimuladores da UCP durante o período de hibernação. Neste período, os níveis de UCP também estão

elevados pela indução hormonal de sua expressão pelo frio (Nicholls e Locke, 1984; Jansky, 1995, Skulachev, 1999).

A regulação alostérica conferida por nucleotídeos de purina é largamente aceita para a UCP1 (Garlid e col., 1998; Garlid, 2000). Estudos de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) demonstraram a existência de dois sítios de ligação distintos para ácidos graxos e nucleotídeos de purina (Ježek e col., 1995). Estudos de mutações sítio-dirigidas (Modriansky e col., 1997) e de modificação química com 2,3-butadiona e fenilglyoxal (Katiyar e Shrago, 1989) demonstraram que três argininas (Arg⁸³, Arg¹⁸² e Arg²⁷⁶) são essenciais para a inibição do transporte de prótons por nucleotídeos. É de se notar que estas três argininas estão conservadas nas proteínas UCP2, UCP3 e *St*UCP (ou PUMP, proteína desacopladora de batatas), sendo que foi demonstrado, para a *St*UCP, que a modificação destas argininas por 2,3-butadiona abole completamente a inibição do transporte de prótons pelos nucleotídeos (Ježek e col., 2000b). Por outro lado, existem grandes diferenças entre o loop matricial que liga o quinto e o sexto domínio transmembrânico das proteínas, domínio este responsável pela especificidade do nucleotídeo inibidor. É de se esperar, portanto, que diferentes nucleotídeos possam ser capazes de inibir o transporte de H⁺ nas diferentes proteínas. Realmente, dados não publicados do grupo do Dr. P. Ježek apontam para uma inibição por UTP e UDP bastante acentuada do transporte de prótons pela UCP2 (Zázková e Ježek, manuscrito em preparação).

2.1.3. O papel das UCP na fisiologia mitocondrial

Em poucas palavras, a função fisiológica das UCP é catalisar um fluxo eletroforético de prótons através da membrana, através de um ciclo fútil de ácido graxos (Skulachev, 1991; 1999).

A proteína desacopladora de mamíferos está claramente relacionada com o controle do nível energético do organismo. Diversas situações metabólicas foram relacionadas com a presença da UCP, dentre as quais pode-se citar a adaptação ao frio, dietas e hibernação, nas quais a relação entre ácidos graxos livres e nucleotídeos de purina

regulam a atividade da proteína (Nicholls e Locke, 1984; Jansky, 1995). Entretanto, o controle bioenergético do organismo não é feito apenas através da termogênese estimulada por norepinefrina, mas depende também da termogênese de outros órgãos, estimulados por outros hormônios, como epinefrina, glucagon, esteróides e hormônios tireoidianos (Jansky, 1995).

Com a recente descoberta de outras proteínas desacopladoras em vários tecidos do corpo (Boss e col., 1997; Fleury e col., 1997; Vidal-Puig, 1997), o papel das proteínas desacopladoras tem sido revisto. Fleury e col. (1997), descobridores da UCP-2, propuseram que esta proteína desacopladora, presente em tecidos ricos em macrófagos e tecido adiposo branco, estaria relacionada com o diabetes melitus tipo II. A regulação de sua expressão está diretamente relacionada com o estado nutricional dos indivíduos e seu gene encontra-se em regiões do cromossomo humano 11 e cromossomo 7 de camundongos, já sabidamente relacionados com a hiperinsulinemia e obesidade (Fleury e col., 1997).

Demonstrou-se, recentemente, que a disrupção do gene da UCP2 leva a um aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias de macrófagos de ratos (Arsenijevic e col., 2000). Este estudo confirma resultados anteriores que mostravam que a expressão da UCP2 em células de mamíferos em cultura diminui a produção de EAOs (Nègre-Salvayre col., 1997). Ou seja, a UCP2 pode ter um importante papel na defesa contra estresses oxidativos, modulando a produção de EAOs e diminuindo o dano oxidativo. Esta capacidade também foi demonstrada para a oxidase insensível a cianeto (Popov e col., 1997; Maxwell e col., 1999) e para a proteína desacopladora de batatas (Kowaltowski e col., 1998). As UCPs podem também estar envolvidas com o processo de apoptose, uma vez que sua expressão aumenta significativamente (mais de 15 vezes) em células de tumores submetidas a estresse oxidativo por raios ultravioleta (Voehringer e col., 1998).

Uma outra proteína desacopladora, UCP3, estaria relacionada com o controle da temperatura do corpo em situações de estimulação hormonal da termogênese, pois foi localizada preferencialmente no tecido adiposo marrom e em músculos esqueléticos (Boss e col., 1997; Vidal-Puig e col., 1997). Alguns estudos apontam também para um papel na homeostase do peso corporal, situação na qual a UCP3 (possivelmente também a UCP2)

atuaria não apenas como dissipadora do potencial transmembrânico, mas principalmente como reguladora do consumo de lipídeos pelo metabolismo mitocondrial (Gong e col., 1997; Dulloo e Samec, 2000). Neste sentido, um possível papel para a UCP3 seria impedir o acúmulo de ácido graxos livres não passíveis de oxidação pela mitocôndria e portanto passíveis de lipoperoxidação, especialmente em situações nas quais a oferta de ácidos graxos excede o consumo (Schrauwen e col., 2001). Novos estudos têm sido realizados para desvendar o papel de cada uma das UCPs na bioquímica do metabolismo energético e da obesidade, bem como na regulação gênica em cada uma destas situações (Gong e col., 1997, Dullo e Samec, 2000).

2.1.4. Proteínas desacopladoras de plantas: descoberta, bioquímica e biologia molecular das isoformas conhecidas

Durante muitos anos, foi aceito que a alta permeabilidade a H^+ e ânions em mitocôndrias de plantas seria consequência de vazamento através de uma membrana alterada pelos procedimentos de isolamento (Douce e col., 1987). Entretanto, o desacoplamento de mitocôndrias vegetais não pode ser atribuído, exclusivamente, a artefatos de preparação. As plantas contêm altas concentrações de lipases, que liberadas ao meio após a ruptura celular, produzem quantidades significativas de ácidos graxos livres (Galliard, 1980). Ao mesmo tempo sabe-se que a adição de BSA aumenta o grau de acoplamento destas mitocôndrias (Day e col., 1980). O efeito do BSA não pode ser atribuído ao reparo de danos na membrana mitocondrial causados pela preparação. BSA complexa eficientemente ácidos graxos livres e, assim, o efeito reacoplador deve estar associado à diminuição da concentração destes no meio de ensaio mitocondrial.

Uma análise detalhada do controle respiratório de mitocôndrias de plantas, bem como o efeito acoplador do BSA associado ao ATP, levaram Beavis e Vercesi (1992) a propor a existência de um fator semelhante à UCP em plantas.

Beavis e Vercesi (1992) demonstraram que mitocôndrias vegetais possuem um canal semelhante ao canal de ânions da membrana de mitocôndrias animais (Inner Membrane Anion Channel, IMAC), sugerindo assim que a alta permeabilidade aniônica é devida aos IMACs. As diferenças cinéticas entre estes canais em plantas e animais levaram os autores a designar o canal de plantas como “Plant Inner Membrane Anion Channel” (PIMAC). Como resultado destas investigações, foi também proposto que estas mitocôndrias, além deste canal aniônico, possuem uma permeabilidade a H^+ independente de alterações estruturais da membrana (Beavis e Vercesi, 1992).

Com o prosseguimento das pesquisas, experimentos realizados por Vercesi e colaboradores indicaram que mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata têm seu potencial de membrana aumentado significativamente pela adição de BSA e de nucleotídeos de adenina e guanina (Silva, 1991; Leite, 1992). Estes resultados sugeriram que estas mitocôndrias possuíam um translocador com as características da proteína desacopladora do tecido adiposo marrom (Klingenberg, 1990).

Subsequentemente, nosso laboratório demonstrou a existência de uma proteína semelhante à UCP em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* cv Binje)(Vercesi e col., 1995). Seguindo o método de isolamento da UCP (Klingenberg e Winkler, 1986), isolou-se esta proteína (chamada então de PUMP - Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) e, após sua incorporação em lipossomos, observou-se a alcalinização do meio externo em lipossomos carregados com PUMP ou com a UCP, e não em lipossomos livres. Esta observação sugeriu que a PUMP poderia estar facilitando o transporte de H^+ de uma maneira semelhante à UCP. Em eletroforese em gel de acrilamida, observou-se uma banda de 32 kDa, tanto em amostras de mitocôndrias de tecido adiposo marrom (representando a UCP) quanto em mitocôndrias de tubérculos de batata (representando a PUMP) (Vercesi e col., 1995). Demonstramos então os efeitos de ácidos graxos, alquilsulfonados e nucleotídeos de purina na bioenergética mitocondrial, assim como no consumo de oxigênio e no potencial elétrico de membrana, decorrentes da ativação ou inibição da PUMP (Ježek e col., 1996). Entretanto, diferentemente da UCP, a PUMP não transporta íons Cl^- (Ježek e col., 1996; Ježek e col., 1997a).

A presença de pelo menos dois sistemas dissipadores de energia em mitocôndrias vegetais (ver secções Oxidase Alternativa e Canais de K^+) nos levou a buscar uma explicação fisiológica para aquele aparente paradoxo: porque dois sistemas dissipadores e apenas um conservador de energia?

Estudos bioquímicos com mitocôndrias isoladas de tomates em diferentes estádios de amadurecimento demonstraram que o progressivo desacoplamento observado durante o amadurecimento pós-colheita destas frutas é devido ao aumento de ácidos graxos livres resultante da ação de lipases (Costa e col., 1999). Entretanto, em mitocôndrias de tomates isoladas em gradiente de Percoll na presença de BSA, a atividade da PUMP diminui com o amadurecimento pós-colheita, assim como o nível da proteína na mitocôndria (Almeida e col., 1999). Observou-se ainda uma acentuada inibição da via insensível a cianeto por ácido linoleico, um dos substratos da PUMP (Sluse e col., 1998). Estes resultados nos levaram à conclusão de que a oxidase alternativa (AOX) e a PUMP não atuam ao mesmo tempo, podendo ambas ter capacidade moduladora do nível energético celular em diferentes situações (Sluse e col., 1998; Almeida e col., 1999).

Utilizando o método da razão ADP/O em mitocôndrias de tomates, demonstrou-se que a proteína desacopladora é capaz de impedir eficientemente a conservação de energia da fosforilação oxidativa, especialmente quando a respiração do estado 3 (estado fosforilante) é progressivamente inibida (Sluse e col., 1998; Jarmuszkiewicz e col., 2000). Nosso grupo foi ainda capaz de detalhar o perfil temporal da atividade da proteína desacopladora e da oxidase alternativa durante o processo de amadurecimento de tomates, tanto pré- como pós- colheita. No processo de amadurecimento pós-colheita, as proteínas dissipadoras atuam sequencialmente, sendo a PUMP ativa nos estádios iniciais de crescimento do fruto e inibida nos estágios finais, enquanto o oposto se observa para a AOX (Almeida e col., 1999). Quando os tomates amadurecem na própria planta, a evolução das atividades destas proteínas é aparentemente oposta. Almeida e col. (submetido) conseguiram pela primeira vez observar em mitocôndrias isoladas o aumento da respiração que ocorre no amadurecimento de frutos climatéricos (ver seção Termogênese em plantas). Estes autores observaram que ocorre um aumento da concentração de ácidos graxos livres (substratos da PUMP e inibidores da

AOX) no momento do amadurecimento, indicando uma participação da PUMP e não da AOX durante a respiração climatérica *in vivo*, como têm sido sugerido na literatura (ver seção Oxidase Alternativa)(Almeida e col., submetido).

Recentemente, diversos genes codificando possíveis proteínas desacopladoras foram identificados nos mais variados organismos vegetais, como em *Arabidopsis* (Maia e col., 1998; Watanabe e col., 1999; Hanák e Ježek, 2001), no trigo (Murayama e Handa, 2000) e na flor termogênica *Symplocarpus phoetidus* (Ito, 1999). A análise dos genomas de cana de açúcar e de *Arabidopsis* permitiu a identificação das diversas isoformas de proteínas desacopladoras existentes, assim como em mamíferos. Em cana de açúcar foram identificadas 6 isoformas, e em *Arabidopsis* 4. (J. Borecký, comunicação pessoal) Além da identificação de proteínas desacopladoras através da busca do gene, demonstrou-se por imunodeteção usando anticorpos anti-*SlPUMP*, a presença da PUMP em diversas frutas, climatéricas ou não, tropicais ou não (Ježek e col., 1998). Demonstrou-se ainda que mitocôndrias de plantas de diversas classes (Ježek e col., 2000a) respondem a nucleotídeos de purina e ácidos graxos de maneira semelhante à observada em mitocôndrias de batata (Ježek e col., 1996) e tomate (Costa e col., 1999).

2.2. A oxidase alternativa (AOX)

A respiração insensível a cianeto foi observada pela primeira vez em 1929 em brotos de ervilha (Genevois, 1929). Entretanto, apenas no final dos anos 70 conseguiu-se isolar uma quinol oxidase insensível a cianeto a partir de mitocôndrias de *Arum maculatum*, então denominada oxidase alternativa (Huq e Palmer, 1978; Rich, 1978). Com a criação de anticorpos monoclonais contra a AOX de *Sauromatum guttatum*, foi possível identificar a presença da AOX em uma grande variedade de plantas (Day e Wiskich, 1995; Siedow e Umbach, 1995), assim como em fungos (Lambowitz e col., 1989; Sakajo e col., 1991), tripanossomatídeos (Clarkson e col., 1989) e ameba (Jarmurszkiewicz e col., 1997).

A AOX se ramifica da cadeia principal de transporte de elétrons ao nível da ubiquinona. Quando a AOX está ativa, o fluxo de elétrons é desviado dos complexos III e IV, ejetores de H^+ , e o gradiente eletroquímico final de H^+ é menor. A passagem de elétrons através da AOX pode ser especificamente inibida por vários compostos, como ácidos hidroxâmicos (Schonbaum e col., 1971), *n*-propilgalato (Siedow e Grivin, 1980) e dissulfirano (Grover e Laties, 1978).

A regulação da atividade da AOX ocorre no nível da expressão, em modificações no estado redox que afetam as propriedades do dímero, em efetores alostéricos e na disponibilidade de substrato.

Modificações na expressão e/ou atividade da AOX têm sido relatadas em eventos temporais, como desenvolvimento de folhas (McCabe e col., 1998), florescimento (Elthon e col., 1989) e amadurecimento de frutos (Cruz-Hernandez e Gómez-Lim, 1995). Além disso, a expressão da AOX também pode ser induzida em condições de estresse oxidativo (Maxwell e col., 1999), baixas temperaturas (Duque e Arrabaça, 1999) e ataque por vírus (Simons e col., 1999).

A atividade da AOX também pode ser regulada pelo seu estado redox. Os dois tipos de dímeros presentes – estado oxidado e estado reduzido – apresentam atividades diferentes, além de suas concentrações variarem consideravelmente entre os diferentes tecidos e plantas. A forma reduzida pode ser 4 a 5 vezes mais ativa que a forma oxidada (Umbach e Siedow, 1993). Além disso, a AOX possui também efetores alostéricos, como o piruvato, envolvido na regulação do estado redox (Vanlerberghe e col., 1998).

A disponibilidade de substrato e a concentração de O_2 são outros fatores que contribuem para a regulação da atividade da AOX. A concentração da ubiquinona (Q) na membrana mitocondrial interna, assim como a relação entre a Q reduzida e a Q oxidada interferem na atividade desta enzima (Day e Wiskich, 1995). Entretanto, como a afinidade da AOX por O_2 é baixa em comparação com a citocromo oxidase, a AOX somente está ativa quando a via dos citocromos está perto da saturação (Solomos, 1977).

Em resumo, a regulação do fluxo de elétrons através da AOX é bastante complexa: a atividade máxima desta via é uma função da quantidade e estado redox da proteína presente na membrana mitocondrial sendo que o engajamento da via é dependente da quantidade de ubiquinona (e do seu estado redox) assim como do estado alostérico da proteína, determinado pela concentração de piruvato e da concentração de O₂ livre no meio de reação.

2.3. Canais de K⁺

Recentemente, utilizando medidas da variação do volume mitocondrial e do potencial eletroquímico transmembrânico, observou-se que mitocôndrias de diversas plantas possuíam a capacidade de captar grandes concentrações de K⁺ do meio externo, o que é, *in vivo*, o citosol (Pastore e col., 1998). A inibição desta captação por ATP demonstrou a existência de um canal de K⁺ sensível a ATP em mitocôndrias vegetais, à semelhança do canal de K⁺ sensível a ATP presente em mitocôndrias de mamíferos (Paucek e col., 1992; Pastore e col., 1998; Jabůrek e col., 1998). A regulação deste canal em plantas é similar à dos mamíferos, mas como sua atividade é maior, possibilita uma diminuição significativa do potencial eletroquímico transmembrânico após sua abertura (Pastore e col., 1998). Neste sentido, é possível que o canal de K⁺ em plantas desempenhe outras funções além de regular o volume da mitocôndria (Garlid, 1978; Pastore e col., 1998). Assim como em mitocôndrias de mamíferos, em plantas também há a presença de um potente trocador K⁺/H⁺ (Garlid, 1978; Dirolez e col., 1985), o que permitiria a regulação do potencial eletroquímico transmembrânico através da abertura do canal, sem que houvesse ruptura da organela devido a inchamento excessivo (Pastore e col., 1998). A manutenção de um volume ideal, através da ação conjunta do trocador K⁺/H⁺ e do canal de K⁺ sensível a ATP, garantiria o funcionamento adequado da cadeia respiratória e de enzimas presentes no espaço intermembranas, como a creatina quinase (Pastore e col., 1998; Kowaltowski e col., 2001).

Assim como proposto para outros modelos de desacoplamento mitocondrial (Popov e col., 1997; Kowaltowski e col., 1998; Skulachev, 1999), a ativação do canal de K^+ pode levar à redução da formação de ânions superóxido pela cadeia respiratória (Pastore e col., 1998), protegendo a mitocôndria contra estresse oxidativo. Semelhante à proteína desacopladora de plantas e a oxidase alternativa, descritas anteriormente, o canal de K^+ pode ainda estar relacionado com a geração de calor em plantas, através de um mecanismo semelhante ao proposto para a oxidase alternativa (Pastore e col., 1999).

3. TERMOGÊNESE EM PLANTAS

Uma série de eventos fisiológicos em vegetais superiores como amadurecimento de frutos, exalação de perfume pelas flores, quebra de dormência para germinação de sementes, e senescência têm seu início associado a um grande estímulo respiratório e à produção de calor (Day e Wiskich, 1995, Krab, 1995). A termogênese das Aráceas é um fato bastante documentado. Na inflorescência destas plantas antes da polinização, um aumento na taxa de respiração com concomitante produção de calor leva a exalação de odores que atraem os insetos polinizadores (Meeuse, 1975; Seymour, 1997). Uma vez que a atividade da AOX se mostrou aumentada durante o pico de produção de calor, formulou-se a hipótese do envolvimento desta proteína na termogênese. Entretanto, algumas estimativas mostram que a taxa respiratória e a quantidade da AOX não seriam suficientes para a produção de calor observada (Briedenbach e col., 1997).

A produção de calor também foi observada após a exposição de plantas a baixas temperaturas, o que poderia contribuir para a aclimação e resistência ao frio (Moynihan e col. 1995). Entretanto, Breidenbach e col. (1997) determinaram que as reações da via da oxidase alternativa não possuem capacidades maiores que a via dos citocromos. Desta forma, a AOX não poderia ter função termoregulatória para proteger as plantas do frio (Breidenbach e col., 1997). Uma alternativa poderia ser a proteína desacopladora de plantas, que também é induzida por baixas temperaturas (Laloi e col., 1997; Maia e col., 1998; Nantes e col., 1999). Contudo, não se deve esquecer que a cadeia respiratória das mitocôndrias vegetais possui ainda um terceiro mecanismo de dissipação de energia, as

NAD(P)H desidrogenases adicionais, insensíveis a rotenona, que transferem elétrons do NAD(P)H para a ubiquinona (e esta para a oxidase alternativa) sem a ejeção de H^+ . Atualmente, ainda não foi possível distinguir a função precisa de cada um destes sistemas dissipadores de energia em relação à termogênese nas plantas.

4. ESTRESSES (SALINO, OSMÓTICO E OXIDATIVO)

Na agricultura moderna, os estresses abióticos (salinidade, temperaturas baixas e ressecamento ou osmolaridade) são responsáveis pela redução na produtividade e são fatores que diferenciam o potencial de colheita de um campo de outro (Boyer, 1982). Dentre estes estresses, a salinidade excessiva e a aridez são os fatores ambientais mais limitantes para o crescimento das plantas e, conseqüentemente, da produtividade (Boyer, 1982). Para efeito de comparação, as perdas induzidas por estresses bióticos, como doenças e herbivoria, alcançam em média 10% do campo, enquanto um ambiente físico-químico desfavorável causa perdas superiores a 65% de um campo em condições ótimas (Boyer, 1982). Os efeitos deletérios da alta salinidade podem ser observados também como um aumento da mortalidade das plantas afetadas (Allakhverdiev e col., 2000). Alta salinidade e aridez são estresses abióticos interconectados devido ao fato de que em regiões áridas e semi-áridas, as colheitas são principalmente mantidas com base em sistemas de irrigação. Além dos íons dominantes cálcio e magnésio, a água utilizada normalmente contém também íons sódio. Com a evaporação da água e transpiração das plantas, os íons cálcio e magnésio tendem a precipitar na forma de carbonatos, tornando os íons sódio dominantes na solução do solo (Ashraf, 1994; Serrano e col., 1999).

Entretanto, os diversos estresses ambientais freqüentemente induzem padrões de respostas celulares semelhantes (Noctor e Foyer, 1998; Bowler e Fluhr, 2000). Muitos estresses abióticos, senão todos, induzem estresse oxidativo, e o aumento da tolerância aos estresses está fortemente relacionada com o aumento da atividade dos sistemas antioxidantes das plantas, como aumento da expressão de proteínas como catalase (Prasad, 1996), glutathione S-transferase (Polidoros e Scandalios, 1999), ascorbato peroxidase

(Asada, 2000), e dos osmoprotetores prolina e betaína (Nuccio e col., 1999; Hamilton e Heckathorn, 2001).

O estresse oxidativo é considerado como um desbalanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes da célula ou organela, como resultado do excesso de produção de EAOs e/ou da depleção do sistema antioxidante (Cadenas, 1997). Os efeitos citados como resposta das plantas ao estresse oxidativo refletem as estratégias utilizadas para o restabelecimento do equilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes.

Um dos eventos iniciais na percepção e sinalização em resposta a estresses abióticos, principalmente salino e osmótico, é a ativação de diversas fosfolipases, com conseqüente aumento da concentração de inositol 1,4,5 - trifosfato, e mudanças nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} (Pardo e col., 1997; Drøbak e Watkins, 2000; Munnik e Meijer, 2000; Takahashi e col., 2001).

Diversos estudos mostraram a existência de uma adaptação cruzada entre os diferentes estresses (Noctor e Foyer, 1998; Bowler e Fluhr, 2000). Entre as diversas adaptações cruzadas já observadas, podemos citar que plantas submetidas a estresses de temperaturas mostram tolerância a estresse salino (Kuznetsov e col., 1993), resfriamento (Kadyrzhanova e col., 1998), calor (Fu e col., 1998) osmótico (Kuznetsov e col., 1999) e por metais pesados (Neumann e col., 1994). Estresse osmótico aumenta a tolerância ao resfriamento (Javier e col., 1997) e calor (Arora e col., 1998). Radiação ultravioleta aumenta a tolerância de pepinos ao calor (Caldwell, 1994) e de *Rhododendron* ao frio (Dunning e col., 1994).

Todos os estudos mencionados anteriormente comprovaram que *um* tipo de estresse é capaz de induzir tolerância a *outro* tipo de estresse. Entretanto, havia poucas evidências de que *um* tipo de estresse era capaz de induzir respostas de tolerância a *vários* estresses, o que é crucial para a confirmação da existência de adaptação cruzada entre os diferentes mecanismos de adaptação. Recentemente, demonstrou-se que coleóptiles de milho submetidos a um pré-tratamento a 42 °C (estresse por calor) exibem tolerância aumentada aos estresses por calor, frio, aridez e sal, confirmando a hipótese de adaptação cruzada entre os vários tipos de estresse (Gong e col., 2001). Diversos estudos anteriores

ressaltaram a importância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para a indução da tolerância a diferentes estresses, principalmente através da expressão de proteínas antioxidantes (Prasad e col., 1994; Prasad, 1996; Foyer e col., 1997; Guan e col., 2000; Roxas e col., 2001; Jiang e Zhang, 2001). Demonstrou-se então que o H_2O_2 seria uma molécula sinalizadora e indutora da resistência cruzada, uma vez que existe um pico de geração de H_2O_2 que precede a indução da adaptação cruzada em coleóptiles de milho (Gong e col., 2001).

Um outro indutor de adaptação cruzada é o fitormônio ácido abscísico (ABA), que tem participação significativa em vários processos fisiológicos, como manutenção da dormência de sementes e adaptação a estresses ambientais (Nambara e col., 1998; Jiang e Zhang, 2001). Demonstrou-se que este hormônio é capaz de aumentar a produção de H_2O_2 (Guan e col., 2000; Pei e col., 2000), de proteínas antioxidantes, como catalase (Guan e col., 2000), superóxido dismutase (Kaminaka e col., 1999), além de induzir peroxidação lipídica (Jiang e Zhang, 2001). Estudos recentes demonstraram que a produção de EAOs poder ser modulada por ABA, uma vez que as respostas dos sistemas antioxidantes das plantas testadas aumentou em atividade somente depois do pico de produção de H_2O_2 (Jiang e Zhang, 2001). Estes dados sugerem que a geração de EAOs, induzida pelo hormônio ABA, pode ser a principal responsável por ativar todo o sistema antioxidante da célula (Jiang e Zhang, 2001).

Contribuindo para a idéia da existência de adaptações cruzadas entre os diferentes tipos de estresse, o fitormônio ABA é induzido também por estresse salino (Moons e col., 1997) e por injúria mecânica (Peña-Cortés e Willmitzer, 1995), induzindo a expressão dos sistemas antioxidantes citados acima, além de uma classe de proteínas conhecidas como LEA (Late-Embryogenesis Abundant) (Moons e col., 1997; Imai e col., 1996). Baseando-se nas suas características estruturais, alguns autores sugerem participação das LEA na proteção das membranas celulares, ou através da complexação com determinados íons (Dure, 1993).

As membranas lipídicas são consideradas alvos bastante vulneráveis aos EAOs durante situações de estresse. Em qualquer situação de estresse oxidativo, como o induzido pelos estresses salino, osmótico, de temperatura ou injúria mecânica, a peroxidação da membranas lipídicas resulta numa geração contínua de EAOs (Yeo, 1998; Kowaltowski e

Vercesi, 1999; Jain e col., 2001). O nível de dano nestas estruturas, ou peroxidação lipídica, é usualmente utilizado tanto como um reflexo quanto como uma medida da extensão dos danos celulares induzidos por determinado estresse (Zhao e col., 1992; Jain e col., 2001; Borsani e col., 2001).

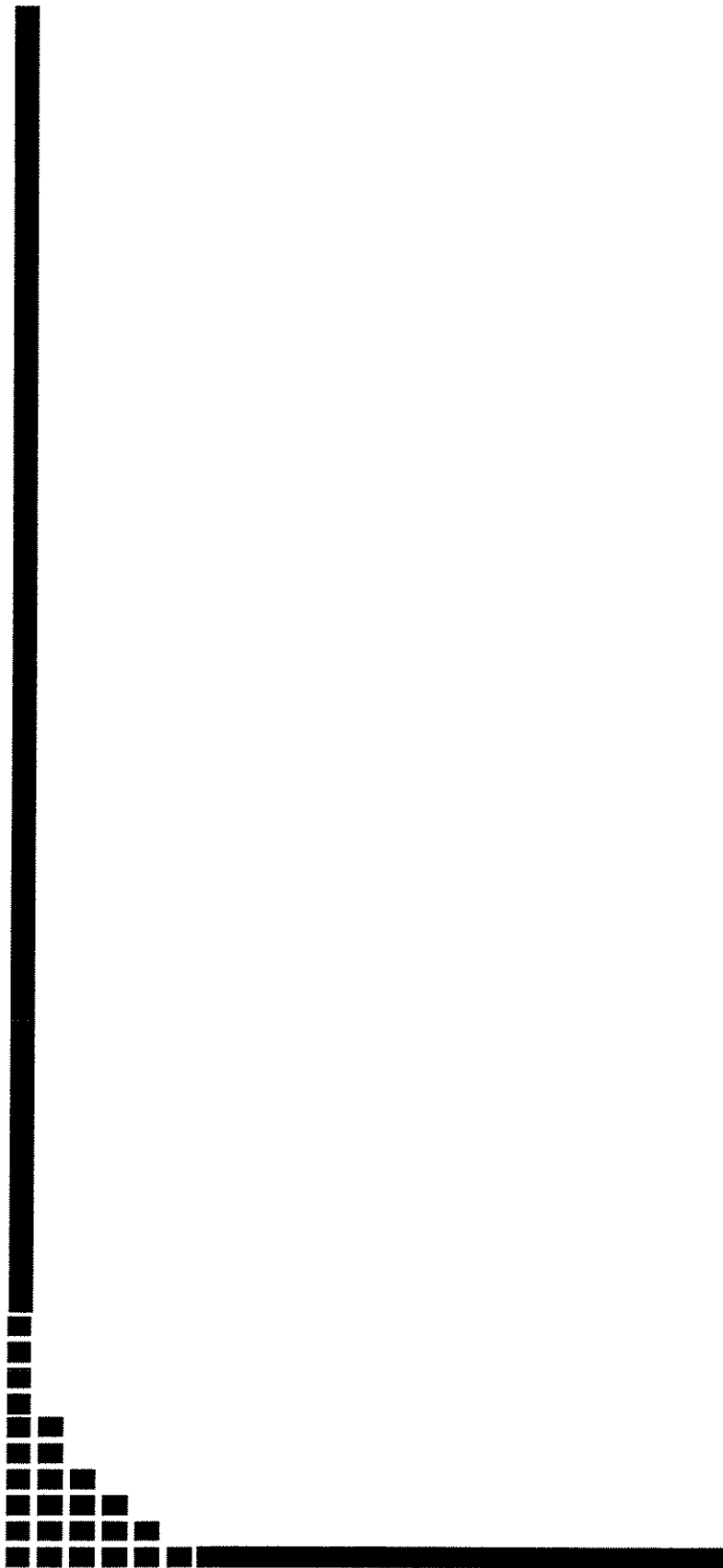
O estresse salino tem algumas particularidades interessantes. Em células de *Citrus*, demonstrou-se que a concentração de ácido linolênico (18:3), o ácido graxo com mais insaturações e, portanto mais suscetível a oxidações por EAOs, diminuiu conforme aumentava-se a concentração de NaCl (Gueta-Dahan e col., 1997). Por outro lado, a mesma situação experimental aumentou a concentração de ácido palmítico (16:0) (Gueta-Dahan e col., 1997). Recentemente, demonstrou-se que os efeitos do estresse salino nas mitocôndrias, um efeito conhecido há bastante tempo (Levin e Livne, 1967), decorre tanto devido ao estresse oxidativo já mencionado, como devido à toxicidade do íon Na^+ (Hamilton e Heckathorn, 2001). Estes autores mostraram que, em partículas submitocondriais de milho, as enzimas do Complexo I são afetadas pelo estresse oxidativo causado pelo estresse salino, enquanto que as enzimas do Complexo II são afetadas pela toxicidade do íon sódio (Hamilton e Heckathorn, 2001).

Considerando tudo o que foi dito sobre estresses até este ponto, podemos considerar o estresse oxidativo, no nível celular, como um evento chave de todos os processos de adaptação a fatores bióticos e abióticos.

Em mitocôndrias, a produção de EAOs é um evento fisiológico e contínuo em condições aeróbicas. Calcula-se que entre 1-2% do total do oxigênio consumido resulte na geração de ânion superóxido (O_2^-) no nível dos complexos I, II e III (Boveris e col., 1972; Cadenas e col., 1977), devido à redução monoeletrônica do oxigênio molecular. Apesar da baixa reatividade do ânion superóxido em soluções aquosas, este ânion pode dismutar para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, por sua vez, sofre uma cisão homolítica e redutora, gerando uma EAO altamente tóxica, o radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$) (Dunford, 1987). Acredita-se que a maior parte do radical hidroxil gerado *in vivo* seja resultante da Reação de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$) (Sutton e Winterbourn, 1984; Halliwell e Gutteridge, 1990).

As mitocôndrias possuem um sistema antioxidante bastante eficiente, composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase, NAD(P)-transhidrogenase, e outros componentes como glutathione, NADPH, vitaminas C e E (Halliwell e Gutteridge, 1989; Vercesi e Hoffmann, 1993). Quando ocorre um aumento na produção de EAOs na presença de Ca^{2+} , muitas alterações oxidativas de componentes da membrana mitocondrial podem ocorrer, tais como peroxidação lipídica e oxidação de grupos tióis protéicos, levando à permeabilização mitocondrial e conseqüente entrada de água e solutos, resultando em inchamento e perda da função da organela (Vercesi e Hoffmann, 1993; Kowaltowski e Vercesi, 1999).

É fato conhecido há bastante tempo que a produção mitocondrial de $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$ é aumentada por ionóforos ou altas concentrações de Ca^{2+} (Cadenas e Boveris, 1980). Uma vez que partículas submitocondriais são grandes fontes geradoras de $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$ e não possuem desidrogenases auxiliares, a formação de H_2O_2 pode ser diretamente correlacionada com proteínas da cadeia respiratória. Considerando estas características, demonstrou-se que a ligação de Ca^{2+} a partículas submitocondriais, provavelmente a cardiolipina (o único lipídio aniônico presente na mitocôndria), causa alterações na organização (empacotamento) dos lipídios e separação de fase, condições que comprometem a conformação e, conseqüentemente, a funcionalidade das proteínas/enzimas ancoradas na membrana. Nestas condições, a produção de EAOs pela cadeia transportadora de elétrons pode ser aumentada, confirmando dados anteriores que mostravam aumento da produção de H_2O_2 por mitocôndrias na presença de Ca^{2+} (Castilho e col., 1995; Grijalba e col., 1999).



2. METODOLOGIA

1. Material biológico e Reagentes químicos

Todos os reagentes utilizados são da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA), ou do maior grau de pureza disponível. Os reagentes para as reações de RT-PCR são da Roche Molecular Biochemichals (Alemanha). Guanosina isotiocianato é da Merck (Alemanha). Os oligos e as sondas foram sintetizados por TibMol Biol (Alemanha). As membranas utilizadas são da Amershan Pharmacia (EUA), e os filmes autorradiográficos da Kodak (EUA).

O plasmídeo pYADE4 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, do Departamento de Genética, IB, (Unicamp). O plasmídeo pET3d foi gentilmente cedido pelo Dr. Ivan Godói Maia (Unesp – Botucatu). As leveduras (linhagem DY150 *ade⁻, ura⁻, his⁻, leu⁻, trp⁻*) foram obtidas do kit YEXpress™ Yeast da Clontech Inc. (USA). As linhagens de *E. coli* DH5α e BL21 pLysS e são de uso corrente no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (CBMEG).

As batatas (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) e os tomates (*Lycopersicon esculentum* cv. Santa Clara) eram comprados no mercado local, sempre do mesmo fornecedor (mesma plantação). As sementes de milho (*Zea mays* cv. AG605) utilizadas são comercialmente disponibilizadas pela Agrocere (Brasil).

Os ratos Wistar (fêmeas com 200g) utilizados para isolamento de mitocôndrias de fígado foram obtidos do Centro de Bioterismo da Unicamp.

2. Condições experimentais e isolamento de mitocôndrias de tubérculo de batata, de tomate, de coleóptile de milho e de fígado de rato

As sementes de milho foram esterilizadas por uma hora, em uma solução de hipoclorito de sódio 0,2%, embebidas em água por duas horas, e colocadas para germinar sobre uma camada de algodão umidecido, recoberto por papel de filtro. As sementes foram germinadas por 5 dias (quando diferente, estará indicado) em estufa a 27°C, em ambiente sem luz. Após cinco dias de crescimento, os coleóptiles foram transportados para a câmara

fria (6°C) ou receberam a solução salina (250 mM), onde permaneceram por mais 24 horas, ainda no escuro. Após este período, os coleóptiles foram coletados para isolamento das mitocôndrias. Como controle foram utilizados coleóptiles com cinco dias de germinação, crescidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade. Tomates verdes imaturos foram acondicionados em duas caixas, e uma das caixas foi colocada em uma câmara hiperbárica, com 1 atmosfera de O₂ puro por até 48 horas.

Brevemente, os coleóptiles foram cortados 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 politron (três pulsos de cinco segundos cada). As batatas e os tomates foram cortados e transformados em suco numa centrífuga doméstica Walita utilizando-se a mesma solução de homogeneização. O pH foi constantemente monitorado e mantido ao redor de 7.2. A mistura foi então filtrada em 8 camadas de gaze e submetida às seguintes centrifugações:

1°. 300xg/15 min

2°. 10.000xg/10min

3°. 300xg/15 min

4°. 10.000xg/10 min (lavagem com BSA)

5°. 10.000xg/10 min

O pellet final foi ressuspenso em meio isotônico e a concentração de proteína foi medida através do método do Biureto (Gornall e col., 1949).

Quando um nível maior de purificação era desejado (para remoção de pigmentos e/ou cloroplastos, por exemplo), utilizamos um gradiente autogerado de Percoll, em diferentes concentrações (21-33%) dependendo do tecido. Desta forma, a 3ª centrifugação era substituída pela centrifugação com Percoll na presença de BSA, a 40.000xg por 30 minutos, e na 4ª centrifugação lavava-se o BSA.

O isolamento de mitocôndrias de fígado de rato foi realizado através de centrifugação diferencial, seguindo o mesmo método descrito acima, e parte da rotina diária do Laboratório de Bioenergética. Estas mitocôndrias foram utilizadas como modelo de comparação com mitocôndrias dos tecidos vegetais tanto por representarem um modelo de estudo clássico quanto por não apresentarem atividade de proteínas desacopladoras detectável pelos métodos aqui utilizados.

3. Isolamento de esferoplastos e mitocôndrias de *Saccharomyces cerevisiae*

Para a expressão da *AtPUMP1* em leveduras duas construções foram utilizadas: pYADE4:*AtPUMP1* xho3 (clone corretamente orientado – “in frame”), pYADE4:*AtPUMP1* xho1 (clone com orientação inversa – “antisense”). Utilizamos como controles células não transformadas e transformadas com o vetor não modificado.

Para obtenção dos esferoplastos, as leveduras das diferentes culturas (colônias isoladas transformadas e não transformadas) crescidas “overnight” em agitador orbital a 300 rpm/37°C foram centrifugadas a 1.380 xg por 10 minutos e lavadas em sorbitol 1,2 M. As células foram ressuspensas em sorbitol 1,2 M, 50 mM TES-Tris pH 7.4 e 14 mM β -mercaptoetanol contendo 1 mg zimoliase (liticase)/g célula, e incubadas por 45 – 60 minutos sob agitação branda. Os esferoplastos obtidos foram lavados com sorbitol 0,6 M e ressuspensos em sorbitol 0,6M, 10 mM TES-Tris pH 7.4, 0,1 mM EGTA e 1mg BSA/g células. Para a realização de experimentos com os esferoplastos, o BSA era omitido no meio de ressuspensão. As mitocôndrias foram obtidas a partir dos esferoplastos homogeneizados em “potter” 40 vezes a 70% da potência máxima por centrifugação diferencial (modificado do kit de expressão em leveduras YEXpress, da Clontech Inc., EUA).

As leveduras eram mantidas em placas com meio completo deficiente em triptofano, por até 6 meses, quando então eram re-transformadas. Nos experimentos de crescimento em meio líquido e diferentes temperaturas (14 $\pm$ 1 °C e 28 $\pm$ 1 °C), as colônias isoladas eram cultivadas “overnight” em meio seletivo, a 37 °C/300 rpm. As células eram então diluídas (1:10) em meio seletivo fresco até atingirem 0,3 < OD_{600nm} > 0,5, quando

eram diluídas até $OD_{600nm} < 0,02$ (em geral a diluição era de 1:100). Amostras foram coletadas em vários tempos, e analisadas através de detecção imunquímica. A avaliação do crescimento se deu por medida da OD_{600nm} nos diversos tempos de amostragem (Hinz e col., 1999). Nos experimentos de crescimento em meio sólido, as placas de 6 poços foram divididas em duas metades que continham meio com glicose (controle positivo) e meio com glicerol (amostras), portanto testávamos, em triplicata, células transformadas e não-transformadas em placas diferentes, mas com os controles nas mesmas condições das amostras.

4. Clonagem e expressão do gene *AtPUMP1* em *E.coli* e *S. cerevisiae*

O gene *AtPUMP1* de *A. thaliana*, recentemente isolado pelo nosso grupo (Maia e col., 1998), foi clonado no vetor de expressão procariótico pMal-C2 (New England Biolabs, EUA), utilizando os sítios das enzimas de restrição presentes no sítio “polylinker” do plasmídeo (*EcoRI* e *BamHI*). A transformação de *E. coli* foi realizada utilizando método de transformação com PEG, de uso corrente no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, CBMEG (modificado de Sambrook e col., 1989). Após crescimento do pré-inóculo (1 colônia transformante inoculada em 3 mL meio de cultura líquido LB + ampicilina 50 µg/ml, em agitador a 300 rpm/37°C/“overnight”), diluímos 1 ml do pré-inóculo em 9 mL de meio LB_{amp} (meio LB + ampicilina 50 µg/ml) fresco, até atingir $0,4 < OD_{600} < 0,5$. Adicionou-se 0,5 mM IPTG (isopropiltiogalactosídeo) para indução da expressão da proteína heteróloga (*AtPUMP1*+Maltose Binding Protein - MBP). A proteína recombinante foi recuperada segundo protocolo descrito pelo fabricante do vetor. Brevemente, a proteína fusionada à MBP foi recuperada após incubação do extrato protéico com uma resina de amilose (polímero de maltose) e clivagem com fator Xa (New England Biolabs, EUA). Alternativamente, o gene foi clonado no plasmídeo pET3d (Novagen, EUA) para os estudos com expressão da proteína em corpúsculos de inclusão. Após a amplificação por PCR convencional do clone completo com a enzima *PfuI* (Maia e col., 1998) e oligonucleotídeos específicos para o gene contendo os sítios das enzimas *NcoI* e *HindIII*, o amplicon foi purificado em gel e digerido com *HindIII*. Após esta digestão inicial, o

amplicon foi digerido para obtenção de extremidades cegas (“blunt ends”), digerido com *Nco*I, e ligado no vetor pET3d digerido com *Nco*I e *Bam*HI – blunt. Nestes estudos, utilizamos a linhagem de bactérias *E. coli* BL21 pLysS, que contém a região codificadora da enzima lisozima e evita a adição desta enzima durante a lise bacteriana para a obtenção dos corpúsculos de inclusão. A indução da expressão da lisozima é feita através de ciclos de congelamento em N₂ líquido e posterior descongelamento (“freeze-thawing”). Neste sistema, a indução da expressão da proteína heteróloga é feita basicamente da forma descrita acima para o pMal-C2 (IPTG). Os corpúsculos de inclusão foram isolados através de gradiente descontínuo de sacarose (40 % → 53 % → 70 %) submetido a 131.000 xg por 4 horas, sendo encontrados na interface 40-53% (Fiermonte e col., 1993).

O gene *AtPUMP1* foi também clonado no vetor de expressão eucariótico pYADE4, e expresso em leveduras (células DY150, Clontech Inc. (EUA), deficientes no metabolismo dos aminoácidos leucina, triptofano, histidina e no metabolismo das bases nitrogenadas adenina e uracila). O inserto *AtPUMP1*, foi digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III, e as extremidades coesivas foram transformadas em extremidades cegas (“blunt”). O plasmídeo pYADE4, contendo o promotor da enzima álcool desidrogenase (*ADH2*), foi digerido com a enzima *Xho*I (que produz extremidades cegas), e ligado com o inserto através da enzima T4 ligase, por no mínimo 14 horas à 14° C. A orientação do inserto foi verificada após digestão com a enzima *Sst*I. O método de transformação utilizado está descrito em Gietz e col. (1995). Brevemente, as leveduras são transformadas misturando-se PEG (50% p/v), acetato de lítio (100 µM), DNA de salmão desnaturado (2 mg/ml) e o plasmídeo de interesse, seguindo-se um choque térmico e seleção dos transformantes, através de plaqueamento em meios seletivos para os aminoácidos e as bases nitrogenadas que são deficientes para a linhagem.

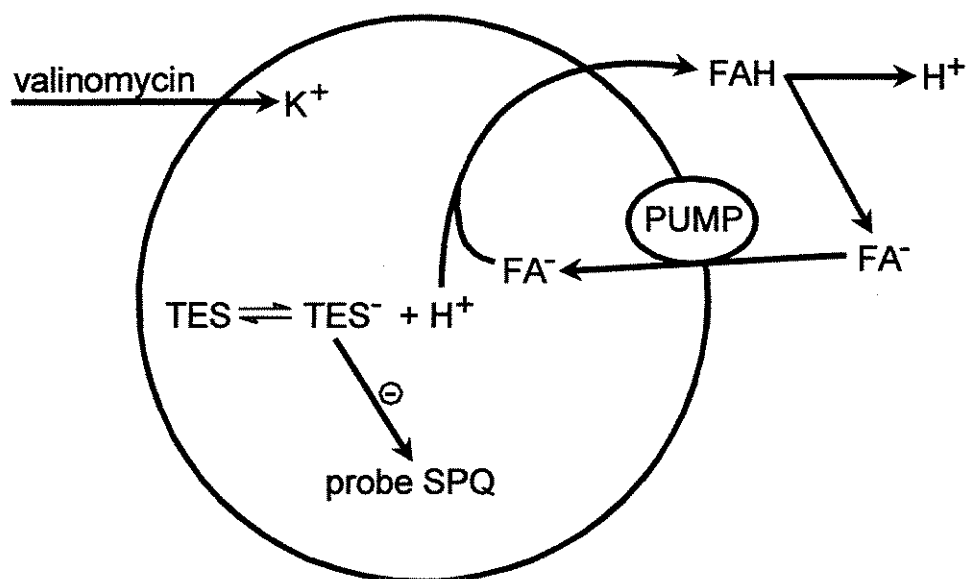
A avaliação dos vários passos do processo de clonagem e expressão da *AtPUMP1* foi realizada através de procedimentos usuais de biologia molecular (gel de agarose, PCR, seleção de bactérias *E. coli* DH5α sensíveis a ampicilina e/ou tetraciclina, isolamento de plasmídeos de bactérias e leveduras, SDS-PAGE 10%) descritos por Sambrook e col. (1989) ou Ausubel e col. (1987), já de uso corrente no laboratório de Biologia Molecular de Plantas, do Prof. Dr. Paulo Arruda (CBMEG, Unicamp).

5. Reconstituição da proteína *A1PUMP1* em vesículas lipídicas e detecção fluorimétrica do fluxo de H^+

Uma mistura de 33,3 μ l de dicetilfosfato (DCP)(20 mM em clorofórmio), 38,8 mg de L- α -fosfatidilcolina e 333 μ l de cardiolipina (5,2 mg/ml em etanol) foi agitada em vortex e o solvente foi evaporado sob borbulhamento de gás nitrogênio. 76,2 μ l de decylpolyoxyethylene (Decyl-POE) e 975 μ l de meio interno ([TES] = 28,85 mM, [EGTA] = 0,6 mM, $[SO_4^{2-}]$ = 84,4 mM) foram adicionados ao filme de lipídios, e a mistura foi dissolvida por aquecimento a 50 °C e agitação sob N_2 . Após o resfriamento, dividiu-se este volume em dois tubos, e adicionou-se a sonda fluorescente SPQ (2 mM - concentração final) e 300 μ l da PUMP isolada de mitocôndrias ou 150 μ l da suspensão purificada dos corpúsculos de inclusão (aproximadamente 30 μ g de proteína). Duas seringas de 5 ml foram preenchidas com BioBeads (ou Amberlite XAD-4) e equilibradas com meio interno. Esta resina é utilizada para a remoção do detergente da mistura, com consequente formação de vesículas. Cada mistura de lipídios, detergente e proteína foi incubada numa das colunas por, no mínimo, 2,5 horas a 4 °C. Centrifugou-se a coluna por 2 min a 800 xg e esta suspensão foi adicionada à segunda coluna, aguardando 10 min a 4°C. Novamente centrifugou-se a 800 x g/ 2 min. Esta suspensão foi então dividida em 4 seringas preenchidas com 6,66 g de Sephadex G25-300 (ou G25-coarse) e equilibradas com meio interno. Estas colunas têm por função a retirada da sonda não-incorporada do meio externo às vesículas. Centrifugou-se as 4 colunas por 800 x g/ 2 min e coletou-se os proteolipossomos em tubo separados (Garlid e col., 1996). Estes proteolipossomos foram utilizados para medida do fluxo de H^+ mediado pela PUMP, através da sonda fluorescente SPQ (Orosz e Garlid, 1993).

A sonda fluorescente SPQ atua em conjunto com o tampão TES (ver figura abaixo)(Orosz e Garlid, 1993). Dentro da vesícula, o tampão TES encontra-se no equilíbrio $TES \leftrightarrow TES^- + H^+$, na presença da sonda SPQ. Na ausência de valinomicina, um ionóforo de K^+ , a adição de ácido graxo não altera o equilíbrio das cargas, pois a vesícula é perfeitamente selada, ocorrendo partição do ácido graxo na membrana e uma pequena difusão para o interior da vesícula. Quando se adiciona valinomicina, os ácidos graxos que estavam no interior da vesícula poderão se protonar e difundir pela membrana para o

exterior, carregando um H^+ e alterando o equilíbrio do tampão. Estes ácidos graxos perderão o H^+ e serão transportados novamente para o interior da vesícula pela proteína desacopladora, onde poderão se protonar se difundir para o exterior, completando o ciclo. O ciclo fútil de H^+ só é possível devido à presença da valinomicina, que permite a entrada de K^+ para contrabalançar eletricamente a saída de H^+ . Quando o equilíbrio do tampão é alterado pela saída de H^+ , aumenta a concentração do ânion TES^- , que se associa à sonda fluorescente e diminui a detecção de sua fluorescência (Orosz e Garlid, 1993).



Esquema da detecção fluorimétrica do fluxo de H^+ pela PUMP em vesículas lipídicas.

6. Detecção imunoquímica (western blot)

A detecção imunoquímica da proteína desacopladora *AtPUMP1* por anticorpos anti-*AtPUMP1* ou anti-*StPUMP* (produzidos em coelhos) foi realizada essencialmente como descrito em Almeida e col. (1999). Brevemente, as proteínas são separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nylon (Amershan Pharmacia Biotech, EUA). Esta membrana foi bloqueada “overnight” em tampão com 5% de leite desnatado e então incubada com o anticorpo anti-*AtPUMP1*

(diluições 1:500 ou 1:1000), por duas horas, na presença de leite desnatado. Após a incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG – fosfatase alcalina), procedeu-se à revelação do filme autorradiográfico exposto às emissões provenientes da reação da fosfatase com o substrato CSPD (Tropix, EUA).

7. Sequenciamento do gene *ZmPUMP1* e software de comparação

Através de buscas em bancos de dados genômicos (GeneBank – PubMed), utilizando como sonda a sequência de nucleotídeos da *AtPUMP1*, localizamos uma sequência que poderia representar uma proteína desacopladora em milho (número de acesso do EST: AI677128; número de identificação dBEST: 2576836). Desenhemos oligonucleotídeos para amplificar a sequência completa do gene e, através de PCR comum, obtivemos um fragmento que, quando sequenciado, revelou ser realmente uma proteína desacopladora. Os sequenciamentos foram realizados utilizando o kit Big Dye (Amersham Pharmacia, EUA), de acordo com o protocolo estabelecido pelo Serviço de Sequenciamento Automático do CBMEG – Unicamp e em colaboração com o Dr. Ivan G. Maia. O sequenciamento foi realizado duas vezes para eliminar possíveis erros de leitura na sequência.

Os números de acesso das sequências apresentadas na Figura 8 são: UCP1 de hamster (P04575 – Swiss Prot, SP), UCP1 humana (SP P25874), UCP2 humana (GenBank U76367), UCP2 de carpa (GenBank C88392), UCP2 de peixe-zebra (GenBank AI384260), UCP3 humana (SP P55916), UCP4 humana (SP O95847), *AtPUMP1* (EMBL AJ223983), *AtPUMP2* (EMBL AB021706), *AtUCP4* (AC007576_24), *SlPUMP1* (GenBank Y11220) e *SjPUMP1* (EMBL AB024733). O alinhamento foi realizado pelo programa MegAlign 4.03 (DNASTar Inc., EUA), através do método Jotun Hein.

8. Isolamento I de RNA total e mRNA de diferentes tecidos de milho

Todo o material utilizado para extração de RNA foi esterilizado por 8 horas em forno a 180°C. As soluções foram autoclavadas após preparadas com água milli-Q e o material plástico foi autoclavado duas vezes.

As sementes foram germinadas como descrito no item 2. Os diferentes tratamentos foram conduzidos por 24h, na mesma caixa de crescimento. Após a germinação e o tratamento, quando houve, os coleóptiles e as raízes foram cortados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, procedendo-se ao processo de maceração. Os tecidos foram macerados até se transformarem em pó, sem permitir o seu descongelamento, e foram transferidos para tubos tipo Falcon.

Aproximadamente 100 mg de tecido foi então transferida para tubos de ensaio, e foi adicionado 1 ml de solução de lise (guanosina isotiocianato 4M – GITC –, citrato de sódio 25 mM pH 7.0, N-laurilsarcosina 0,5% e β mercaptoetanol 0,7%). Após misturar-se vigorosamente, foi adicionado 100 μ l de acetato de sódio 3M, pH 4.0, seguido de agitação em vortex. Adicionou-se então 900 μ l de fenol ácido, pH 4.3, agitou-se em vortex, adicionou-se 250 μ l de clorofórmio e agitou-se em vortex novamente. Após incubação por 10 minutos no gelo, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 20 minutos, para separação de fases. A fase superior (aquosa) foi recolhida, e foi misturada a dois volumes de etanol gelado. Seguiu-se a precipitação por, no mínimo duas horas, a -20°C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 20 minutos. Os pellets foram lavados duas vezes com etanol 75%, e o etanol restante foi evaporado em centrífuga aquecida a 40°C ou à vácuo. Os pellets foram ressuspensos em 100 μ l de água e estocados em freezer a -70°C.

Os RNAs obtidos se encontravam praticamente livres de contaminação com DNA. Entretanto, devido aos nossos objetivos, fazia-se necessário eliminar qualquer possibilidade da existência de DNA nas nossas amostras.

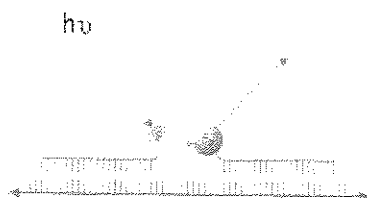
Uma amostra contendo 20 μ g de RNA total foi incubada na presença de 1 U de DNase I, no tampão apropriado, a 37°C por 30 minutos. Ao final da incubação, foi adicionado 1 volume de fenol ácido (pH 4.3), 1 volume de clorofórmio, agitou-se vigorosamente em vortex e centrifugou-se por 1 minuto para separação de fases. A fase superior (aquosa) foi recolhida, e misturada a 1/10 volume de acetato de sódio 3M (pH 4.0) e 2 volumes de etanol gelado. Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada por, no mínimo, 1 hora a -20°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos, a 4°C e lavados duas vezes com etanol 75% e o etanol restante foi evaporado em centrífuga aquecida a 40°C à vácuo. Os pellets foram ressuspensos em 50 μ l de água e estocados em freezer a -70°C.

Para o isolamento de mRNA utilizamos um kit da Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemanha). Brevemente, o tecido congelado em N₂ líquido foi macerado até virar um pó bem fino. Adicionou-se então tampão de lise, contendo detergentes e inibidores de RNase (guanidina isotiocianato). Centrifugou-se a mistura a 11000 x g por 30 segundos, separou-se o sobrenadante em outro tubo, e adicionou-se estreptavidinas magnéticas, e após adicionou-se oligo d(T) marcado com biotina. Estas partículas de biotina se complexaram então com as partículas magnéticas de estreptavidina adicionadas à suspensão e com as caudas poli(A) dos mRNAs. As partículas magnéticas foram imobilizadas com um forte ímã, procedeu-se à lavagem com tampão sem detergente, e posterior incubação em água destilada a 65°C por 2 minutos para eluição do mRNA das partículas magnéticas. A concentração de mRNA obtida foi da ordem de 100-500 ng/ μ l.

9. PCR em Tempo Real (Roche LightCycler)

Utilizamos um aparelho LightCycler (Roche, Alemanha) para os experimentos de RT-PCR. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência das proteínas desacopladoras de milho e de batata, em comparação com demais proteínas desacopladoras existentes, mais especificamente *AtPUMP1*, 2 e *AtUCP4* (Ježek e Urbankova, 2000). Os oligos amplificam um segmento de menos de 400 pb. É importante ressaltar que estes oligos são específicos para as sequências de cada proteína, impedindo desta forma a amplificação de outras proteínas desacopladoras que possam existir nos tecidos estudados.

O LightCycler é, basicamente, um termociclador acoplado a um fluorímetro. Utilizando oligos específicos, modificados com a adição de fluorocromos, é possível monitorar a quantidade de produto formado em cada ciclo da Reação em Cadeia da Polimerase (daí o nome de PCR em tempo real). Desta forma, é possível quantificar a presença de determinado gene e mesmo identificar amplificações inespecíficas através do monitoramento contínuo da fluorescência dos oligos modificados (sondas). As sequências das sondas utilizadas por nós podem ser visualizadas na tabela a seguir. Estas sequências são internas ao amplicon pretendido e de acordo com as assinaturas encontradas por Ježek e Urbánková (2000), de forma a minimizar e/ou não detectar amplificações inespecíficas. A transferência de energia entre os fluorocromos que ocorre quando as sondas anelam no amplicon permitindo que o produto do PCR seja identificado e quantificado (veja figura abaixo). A luz fluorescente ($h\nu$) excita a fluoresceína (F_1), que transfere sua energia para o fluorocromo Red640 (F_2), cuja emissão é captada pelo detector.



Esquema ilustrativo da detecção fluorimétrica permitida pelo anelamento de dois oligos específicos durante uma reação em aparelho de PCR-RT (Roche).

Na tabela abaixo pode-se encontrar também as sequências dos oligos e sondas utilizados para as ubiquitinas de milho e de tomate. Os genes de ubiquitina foram monitorados para servir de controle não variável, mesmo em situações de estresse e readaptação.

Gene	Categoria	Sequência (5' → 3')	Temp. de anelamento (°C)
<i>ZmPUMP1</i>	Oligo 1	CCAAgggCgACATCTCC	56
	Oligo 2	CgATggCACCAGTTgTgA	56
	Sonda 1	GAgCCTgTCAAATCCTcTACgTCg - X	63
	Sonda 2	R640 – CAAAgACCACgTTggggATgT	62
<i>ZmUbiquitin</i>	Oligo 1	ATCACCTTggAggTggAgAg	55
	Oligo 2	TTACTgACCACCACggAgAC	55
	Sonda 1	CCATAACCCTggAggTTgAgAgC – X	62
	Sonda 2	R640 – CggACACCATCgACAATgTgAAg	63
<i>LeUbiquitin</i>	Oligo 1	GgAAAgACCATCACTCTTg	49
	Oligo 2	GTgTCTgAgCTCTCgACC	51
	Sonda 1	TCggCCATCTTCAAgCTg – X	57
	Sonda 2	R640 – TCCCAGCAAAGATCAGATCAGTCTCT	56
<i>StUCP</i>	Oligo 1	TggTCAATTTAgTCATgggAg	53
	Oligo 2	CCAgTTgTAAgTgCAGCAAg	55
	Sonda 1	CAACATgATCTTTgCCAACATATAA – X	60
	Sonda 2	R640 – TTTAACAggTTCATACATCCCAATCC	63

Legenda: *Zm* representa *Zea mays* (milho); *Le* representa *Lycopersicum esculentum* (tomate); *St* representa *Solanum tuberosum* (batata); X representa fluoresceína e R640 representa o fluorocromo da Roche. Os oligonucleotídeos e sondas foram sintetizados por TibMol Biol (Alemanha).

A concentração de RNA total e de mRNA utilizada nas reações de RT-PCR foi de 1 ng/μl. Este valor foi escolhido de acordo com sugestões da Roche. Entretanto, na tentativa de utilizar um valor menor, realizamos um experimento com concentrações de RNA variando de 0,05 a 1 ng/μl (não mostrado). Este experimento confirmou a concentração de 1 ng/μl como a mais adequada e confiável para a detecção da ubiquitina em milho. Tentamos também uma concentração dez vezes maior (10 ng/μl), o que não alterou os resultados obtidos.

Para se montar uma reação, misturava-se 2 μl de tampão de reação que já continha Mg^{2+} , 0,5 μl de oligos #1 e #2 (0,3 μM), 0,67 μl de sondas #1 e #2 (1 μM), cloreto de magnésio em concentrações variadas (3 a 7 mM), 1 μl de RNA (1 ng), 0,2 μl de mix de enzimas (para Transcrição Reversa e PCR) e água destilada para um volume total de 10 μl.

10. Medida do consumo de oxigênio, do potencial elétrico transmembrana $\Delta\Psi$ e da peroxidação lipídica por mitocôndrias de coleóptiles de milho

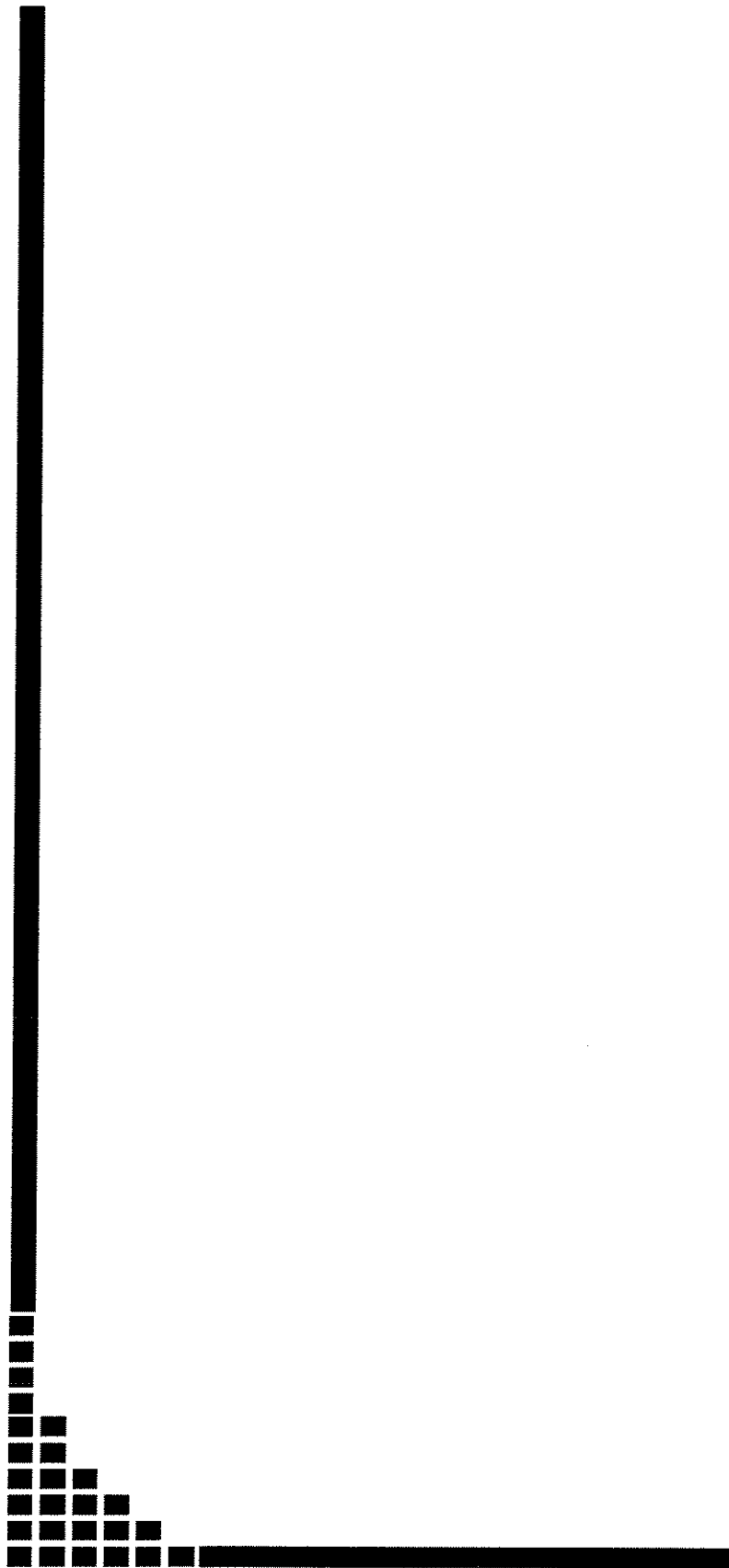
O potencial elétrico transmembrânico foi medido utilizando-se a sonda fluorescente safranina, com comprimento de excitação de 495 nm e de emissão de 586 nm (Holden and Sze, 1989). O meio de reação continha 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7.2), 0,33 mM EGTA, 2,5 mM P_i , 1 mM $MgCl_2$, 200 μM propranolol (inibidor do PIMAC, Beavis e Vercesi, 1992) e um coquetel de substratos de sítio I (malato, piruvato, α cetoglutarato, glutamato, todos a 10 mM). Todos os experimentos continham 1 μM carboxiatractilosídeo, inibidor do carreador ADP/ATP, exceto nos traçados para determinação da razão ADP/O.

O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente com um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co., EUA). O meio de reação utilizado era idêntico ao utilizado para medida do $\Delta\Psi$, adicionando-se BHAM 1,5 mM, para inibição da via oxidase alternativa.

A peroxidação lipídica nas mitocôndrias estudadas foi medida através da detecção espectrofotométrica ($\lambda = 535$ nm) dos produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo das concentrações de TBARS foi $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Foram realizados três experimentos independentes (controle e tratamentos); os resultados estão mostrados como média $\pm$ desvio padrão.

11. Medida da geração de H_2O_2 por mitocôndrias de batatas através da oxidação da escopoletina

A produção mitocondrial de H_2O_2 foi medida através da oxidação da escopoletina pelo H_2O_2 na presença de peroxidase de raiz forte (Boveris e col., 1977). A fluorescência da escopoletina foi monitorada através dos comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 e 450 nm, respectivamente. A calibração foi realizada através da adição de quantidades conhecidas de H_2O_2 . Todos os experimentos foram realizados com o meio de reação descrito no item 10, na presença de ciclosporina A, para evitar artefatos decorrentes do inchamento mitocondrial.



3. RESULTADOS

1. Curva de crescimento de leveduras após expressão da proteína *AtPUMP1*

Na tentativa de se encontrar papéis fisiológicos para as proteínas desacopladoras recém identificadas em mamíferos (UCP2, 3, 4, 5), diversos estudos foram publicados utilizando leveduras como modelos de expressão e metabolismo (Hinz e col., 1999; Stuart e col., 2001). A oxidase alternativa, outra proteína mitocondrial capaz de reduzir a conservação de energia, também foi estudada através da expressão em leveduras (Affourtit e col., 1999). Foi possível observar uma redução significativa do crescimento celular em ambos os casos, sendo da ordem de 50% e 20% para a UCP3 e a AOx, respectivamente (Hinz e col., 1999; Affourtit e col., 1999).

Neste sentido, gostaríamos de verificar se a proteína desacopladora de *A. thaliana* (*AtPUMP1*) também teria capacidade de diminuir a conservação de energia na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, estudamos o crescimento de leveduras transformadas e não-transformadas com o gene *AtPUMP1* em meio sólido e em meio líquido. Em meio sólido, não foi possível detectar nenhuma diferença na velocidade de crescimento ou tamanho entre as colônias dos dois tipos celulares (dados não mostrados).

As leveduras também foram cultivadas em meio líquido, em duas temperaturas diferentes (14 ± 1 °C e 28 ± 1 °C). Podemos observar que, em temperaturas normais de crescimento (28 ± 1 °C) a expressão da proteína desacopladora reduz o crescimento das leveduras transformadas (figura 1 painel 28 °C). A inibição média do crescimento, na fase mais importante do ciclo celular (a fase exponencial), foi de 19% (círculos abertos). Em alguns casos isolados, como a colônia 6, esta inibição chegou a 47% (triângulos invertidos). Estes valores são similares aos obtidos para as outras proteínas dissipadoras do μH^+ . Quando estas mesmas células foram crescidas na temperatura de 14 ± 1 °C (figura 1 painel 14 °C), podemos notar que as células transformadas (círculos abertos) cresceram aproximadamente 10% mais que as células controle (círculos fechados) na fase exponencial, porém ambas com um atraso no ciclo celular de aproximadamente 5 horas. Devido às características policlonais do anticorpo desenvolvido pelo Dr. Jiri Borecký (CBMEG, Unicamp), não nos foi possível detectar precisamente em que momento do ciclo celular das leveduras ocorre a expressão da proteína desacopladora. Geralmente, porém, em

S. cerevisiae a expressão de proteínas heterólogas têm seu pico máximo aproximadamente após 6 horas de indução contínua (Sambrook e col., 1989). Na figura 1, podemos observar ainda que a fase exponencial de crescimento em temperatura de 28 °C se inicia após aproximadamente 8 horas de indução. Desta forma, podemos admitir que durante a fase exponencial de crescimento já existem proteínas desacopladoras sintetizadas e adicionadas à membrana mitocondrial, influenciando a conservação de energia do gradiente eletroquímico de H^+ .

2. Potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de esferoplastos de *S. cerevisiae*

Uma vez confirmada a presença do plasmídeo pYADE4 e do gene *AtPUMP1* nas leveduras, procedemos à indução da expressão da proteína e obtenção de esferoplastos, na tentativa de medir o comportamento mitocondrial *in vitro*. Na figura 2 podemos observar que esferoplastos de leveduras transformadas com o gene na orientação correta (chamadas *xho3*) incubadas no meio descrito em Métodos perdem o $\Delta\Psi$ após a adição de ácido linoléico. A adição de ATP reverte parcialmente esta perda. Surpreendentemente, a adição de BSA elevou o $\Delta\Psi$ para níveis maiores do que os obtidos antes da adição de ácido linoléico. Este comportamento foi observado também em esferoplastos obtidos de leveduras não transformadas (chamadas *DY150*), e transformadas com o plasmídeo contendo o gene “antisense” (chamadas *xho1*)(figura 2) e, em menor escala, nas leveduras transformadas com o plasmídeo sem o gene *AtPUMP1*, chamadas *pYADE4*.

3. Expressão da proteína *AtPUMP1* fusionada com MBP e clivagem do produto de expressão *AtPUMP1*:MBP

Uma vez que nos certificamos de que o gene *AtPUMP1* havia sido inserido no plasmídeo pMal (através de gel de agarose), que as bactérias *E. coli* haviam sido transformadas (através de seleção em placas com ampicilina) e que o plasmídeo que se encontrava no seu interior possuía o fragmento de DNA de nosso interesse (através de PCR com primers específicos), realizamos a indução da expressão da proteína recombinante nas

bactérias com IPTG 0,5 mM. A indução foi realizada a 25°C, com alíquotas retiradas nos tempos 0 e 2 horas. Após a expressão da proteína heteróloga, utilizamos uma coluna de amilose para a etapa de purificação.

Seguindo o protocolo do produto, clivamos o eluato da coluna de resina de amilose com o fator Xa. Na figura 3, podemos observar o SDS-PAGE que mostra os produtos da clivagem após 0, 2, 4 e 8 horas de incubação com o fator Xa (colunas 1 a 4). Podemos observar um aumento gradativo das duas proteínas esperadas (*AtPUMP1* em ~29Da, e MBP em ~45KDa). Podemos observar ainda a forte banda de proteína heteróloga induzida e não clivada em ~74KDa.

Entretanto, não foi possível separar as duas proteínas produzidas devido à alta hidrofobicidade da *AtPUMP1*, que permanece ligada à coluna de separação de DEAE-Sephrose. Desta forma, mesmo adicionando-se a mistura de clivagem (MBP, *AtPUMP1*:MBP, *AtPUMP1* e fator Xa) aos lipídios, num experimento de reconstituição, não foi possível observar nenhum transporte iônico.

4. Expressão da *AtPUMP1* em corpúsculos de inclusão

Uma vez verificada a falta de eficácia de separação da proteína desacopladora dos produtos da clivagem da proteína fusionada MBP:*AtPUMP1* com o fator Xa, utilizamos outro vetor, o plasmídeo pET3d, e expressamos a proteína em corpúsculos de inclusão, que são vesículas lipídicas nas quais as bactérias acumulam resíduos “tóxicos” (ou exógenos)(Fiermonte e col., 1993).

No painel A da figura 4, podemos observar que a indução de bactérias transformadas com o plasmídeo pET3c:*AtPUMP* resulta no aparecimento de uma banda de aproximadamente 30 kDa (coluna Bn x Bi). Após a purificação dos corpúsculos de inclusão, podemos observar a presença majoritária de uma banda de ~30 kDa (coluna IB). O procedimento de solubilização da proteína presente nos corpúsculos de inclusão foi realizado com a adição de 0,3% laurilsarcosine (coluna S) e a parte insolúvel foi removida por centrifugação. A adição de 1.67% laurilsarcosine e 1% decylPOE resultou na remoção

das bandas minoritárias (coluna PUMP). Durante este processo pode-se observar a renaturação da proteína para sua conformação e tamanho natural (~32 kDa)(coluna PUMP), bastante similar ao predito pela sequência do cDNA clonado originalmente (~32,5kDa)(Maia e col., 1998). O painel B (figura 4) mostra o autorradiograma de um SDS-PAGE correspondente ao mostrado no painel A. As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nylon e expostas aos anticorpos anti-*At*PUMP (painel B) e anti-*St*PUMP (figura 4 painel C). Como pode ser observado, há o reconhecimento imunológico de uma banda de ~32 kDa pelos dois anticorpos, indicando que o produto de expressão do gene *At*PUMP1 possui uma grande semelhança com a proteína desacopladora de batatas também no nível de sequência de aminoácidos e estrutura terciária.

5. Transporte de H⁺ em proteolipossomos e inibição por nucleotídeos

Utilizando a proteína solubilizada pelos detergentes (figura 4 coluna PUMP), realizamos os ensaios de reconstituição lipídica. Estes ensaios tiveram o objetivo de caracterizar o transporte de ácidos graxos e outros ânions, assim como a inibição por diferentes nucleotídeos de purina, e contaram com a participação decisiva do Dr. Petr Ježek e do Dr. Jiri Borecký e da doutoranda Paula B. M. Andrade (orientada pelo Prof. Dr. Hernan Chaimovich, USP-SP).

Na figura 5, podemos observar traçados típicos do transporte de ácidos graxos em proteolipossomos e da inibição deste transporte pela presença de 4 mM ATP (traçado “+ATP”) ou GTP (traçado “+GTP”). É possível observar que a adição de 26,6 µM ácido linoléico (LA) causa uma acidificação do interior dos proteolipossomos, resultado da redistribuição e partição das moléculas do ácido graxo na bicamada lipídica e posterior equilíbrio com o meio interno. Este reequilíbrio resulta numa pequena entrada de H⁺ nos proteolipossomos (Jabůrek e col., 1999; Costa e col., 1999; Garlid e col., 1999; Ježek e col., 1998), representada pela acidificação observada. A adição de 1,3 µM valinomicina (val) inicia um rápido efluxo de H⁺, somente possível quando considerada a hipótese da ciclagem de ácidos graxos pela proteína desacopladora (Jabůrek e col., 1999; Costa e col., 1999; Ježek e col., 1997a). É importante ressaltar que em experimentos onde não foi adicionada

valinomicina não há mudança na velocidade de transporte (dados não mostrados), indicando a necessidade do ionóforo para a ciclagem dos ácidos graxos pela proteína desacopladora.

Foi possível ainda observar que o ácido undecanossulfônico ($C_{11}SO_3^-$), presente no meio de reação na concentração de 0,5 mM inibe totalmente o efluxo de H^+ promovido por ácido linoléico 26,6 μM , de maneira semelhante ao observado para a proteína desacopladora isolada de mitocôndrias de batatas (dados não mostrados). Esta inibição indica que a proteína desacopladora de arabidopsis provavelmente também transporta alquilsulfonados, como já demonstrado para a PUMP de batatas (Jabůrek e col., 1999; Costa e col., 1999b; Ježek e col., 1997a, 1996) e que o sítio de ligação deste e dos ácidos graxos deve ser o mesmo, uma vez que a inibição que ocorre é do tipo competitivo (Jabůrek e col., 1999; Ježek e col., 1997a, 1996).

6. Cinética de transporte de H^+ mediado por vários ácidos graxos em proteolipossomos e lipossomos para cálculo de K_m e V_{max}

Desconsiderando os efeitos dos ácidos graxos *per se* na bicamada lipídica (movimentos “flip-flop” espontâneos de acordo com o coeficiente de partição), assim como o menor tamanho dos proteolipossomos em comparação com lipossomos, foi possível medir e calcular a cinética de ciclagem de diferentes ácidos graxos mediada pela *AtPUMP1*. Na figura 6 (painel A), é possível observar o efeito de diferentes ácidos graxos (ácido linoléico ($\square$), ácido palmítico (o) e ácido láurico (Δ)) em lipossomos sem nenhuma proteína incorporada (símbolos abertos). Estes resultados mostram uma relação linear entre o efluxo de H^+ e o aumento da concentração de ácidos graxos até a exagerada concentração de 533 μM . O efluxo basal de H^+ ($\diamond$)(efluxo na presença de valinomicina, decorrente da presença de ácidos graxos contaminantes) foi insignificante, assim como o observado em proteolipossomos.

Quando as mesmas concentrações de valinomicina e de ácidos graxos foram adicionadas a lipossomos contendo a proteína solubilizada dos corpúsculos de inclusão de *E. coli*, obtivemos típicas curvas dose-resposta (figura 6 painel A, símbolos fechados). Podemos observar que o transporte de ácido linoléico (■), ácido palmítico (●) e ácido láurico (π) aumentam rapidamente até aproximadamente 100 μM, atingindo um platô de saturação entre 100 e 150 μM. Através do gráfico tipo Eadie-Hofstee (figura 6 painel B), foi possível calcular os coeficientes de afinidade (K_m) e a velocidade máxima de transporte (V_{max}) para os ácidos graxos estudados. A Tabela I (abaixo) resume os resultados obtidos:

Tabela I. Constantes de afinidade e velocidade de transporte pela *AtPUMP1* para os ácidos graxos estudados

	K_m (μM)	V_{max} (nmol H^+ .s ⁻¹ .(mg lipid) ⁻¹)	Coefficiente de partição ^A
ácido láurico (12:0) ^B	55	0.22	$5 \cdot 10^3$
ácido palmítico (16:0)	129	0.43	$3,75 \cdot 10^5$
ácido linoléico (18:2)	43	0.32	$1 \cdot 10^5$

^A Estes valores foram obtidos de Garlid e col., 1998.

^B Número de carbonos : número de insaturações

7. Cinética da inibição do transporte de H^+ pela *AtPUMP1* por nucleotídeos de purina

Na figura 7 podemos observar a inibição do transporte de ácidos graxos conferida pela presença de diferentes concentrações de GTP (□) e GDP (▲)(painel A) e ATP (o) e ADP (◆, painel B), todos em pH 7,1. Foi possível obter as constantes de inibição em pH 7,1 para o GDP ($K_i = 0,8$ mM), GTP ($K_i = 0,98$ mM), ADP ($K_i = 1,41$ mM) e ATP ($K_i = 0,85$ mM). Estes valores estão dentro dos níveis fisiológicos e são comparáveis com os valores obtidos para a proteína desacopladora de batatas (Ježek e col, 1997a; 1996), e também para as UCP2 e 3 (Jabůrek e col., 1999). Em mitocôndrias isoladas de tomates verdes e maduros, a adição de ATP 1 mM é capaz de inibir quase totalmente a atividade da proteína desacopladora (Costa e col., 1999).

No painel B (figura 7), podemos observar o efeito do pH na interação dos nucleotídeos de purina com a proteína. Quando o pH externo foi ajustado para 8,0, podemos observar uma drástica redução da inibição da atividade da *AtPUMP* por ATP (■). Nesta condição experimental, a máxima inibição da atividade da proteína desacopladora foi de 20%. Quando o pH externo foi então ajustado para 6,3, a afinidade da proteína por ATP aumentou (○) ligeiramente, resultando em um $K_i = 0,54$ mM, portanto menor que em pH7,1. Estes resultados revelam que o sítio de ligação dos nucleotídeos de purina na proteína é influenciado pelo pH do meio, como já descrito para a UCP1 (Klingenberg e Huang, 1999; Modriansky e col., 1997). A Tabela II (abaixo) sumariza os coeficientes de inibição observados para os diversos nucleotídeos de purina nos diferentes valores de pH externo.

Tabela II - Relação entre o pH e o K_i para inibidores da atividade da *AtPUMP1*.

	pH	K_i (μM)
GTP	7.1	0.98
GDP	7.1	0.80
ADP	7.1	1.41
ATP	7.1	0.85
ATP	6.3	0.54
ATP	8.0	∞

Os experimentos descritos nas figuras 5 a 7 confirmam que o produto de expressão do gene *AtPUMP1* possui as mesmas características já descritas para outras proteínas desacopladoras (Jabůrek e col., 1999; Costa e col., 1999; Ježek e col, 1997a).

8. Sequência de aminoácidos da *ZmPUMP1* e comparação com outras UCP/PUMP

Nosso laboratório identificou em um banco de seqüências de milho uma seqüência de nucleotídeos que possuía bastante similaridade com a seqüência de nucleotídeos da proteína desacopladora de *arabidopsis*. Realizamos então o sequenciamento do clone e constatamos que se tratava de uma possível proteína desacopladora. Na figura 8 podemos observar uma comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos da proteína desacopladora encontrada em milho e outras proteínas desacopladoras de plantas e outros animais, inclusive com a UCP4 humana, que acredita-se ser a mais antiga das proteínas desta família (Hanák e Ježek, 2001).

É possível observar que a proteína desacopladora de milho guarda cerca de 80% de identidade com as outras UCPs de plantas (aminoácidos marcados de preto e azul). Os aminoácidos pintados de preto são estritamente conservados em todas as UCPs pesquisadas. Vale notar que estes últimos estão situados quase que exclusivamente em regiões de transição do citoplasma para a matriz mitocondrial, sugerindo uma grande importância funcional/estrutural para estas regiões. As áreas marcadas de cinza representam aminoácidos que possuem a mesma polaridade. Os aminoácidos identificados com o sítio de ligação dos nucleotídeos de purina estão realçados em vermelho (Klingenberg and Huang, 1999; Modriansky e col., 1997; Murzda-Inglis e col., 1994).

As três histidinas realçadas em amarelo (145 e 147 na UCP1 e 145 na UCP3) são apontadas por Klingenberg e Huang (1999) como necessárias para o transporte de prótons de acordo com o Modelo Tamponante, defendido por estes autores. Entretanto, como pode ser observado, estes aminoácidos não estão presentes em todas as proteínas comparadas. Baseando-se nestas observações, estes autores postularam diferenças entre as velocidades de transporte de ácidos graxos pelas proteínas desacopladoras de acordo com o número de histidinas presentes.

9. Potencial de membrana $\Delta\Psi$ e mitocôndrias de coleóptiles de milho

O isolamento de mitocôndrias de coleóptiles estiolados permitiu visualizar o efeito de inibidores e ativadores da atividade das proteínas desacopladoras no potencial elétrico transmembrânico Vercesi e col., 1995; Costa e col., 1999). Na figura 9 (painel A), podemos observar a construção de um potencial elétrico por mitocôndrias isoladas, utilizando como substrato respiratório um coquetel de substratos de sítio I (malato, α -cetoglutarato, glutamato e piruvato – 10 mM). A adição de ATP (6 mM, sal de sódio) e BSA (0,1% p/v) aumentam significativamente o potencial transmembrânico destas mitocôndrias (diminui a fluorescência da safranina no meio de reação), provavelmente pela inibição da proteína desacopladora (Vercesi e col., 1995; Costa e col., 1999; Jezek e col., 2002). O painel B da figura 9 mostra que a adição de ácido linoléico (lin; 3,33 μ M) causa uma rápida e imediata perda do potencial elétrico, como evidenciado pela diminuição da fluorescência da sonda (linha “+LA”). Na linha “+ATP” do mesmo painel, podemos observar o efeito da presença de ATP (6 mM, sal de sódio) nas mesmas condições da linha “+LA”. A presença de ATP inibe a atividade da proteína desacopladora e diminui a perda de potencial induzida pela adição de ácido graxo (Jezek e col., 1996; Nantes e col., 1999; Costa e col., 1999).

10. Curva de concentração para o cofator Mg^{2+} para amplificação do amplicon *ZmPUMP1* em mRNA de coleóptiles de milho

Na figura 10 (painel A) podemos observar a amplificação do amplicon *ZmPUMP1* na presença de diferentes concentrações do cofator $MgCl_2$, utilizando os oligonucleotídeos e sondas para *ZmPUMP1* e mRNA extraído de coleóptiles de milho. Podemos observar que a melhor concentração de Mg^{2+} para amplificação do fragmento de *ZmPUMP1* foi 4 mM, pois proporcionou um aparecimento do sinal fluorescente mais rápido (ciclo crítico 29). Os experimentos realizados com oligonucleotídeos e sondas para ubiquitina (figura 10 painel B) mostraram que 7mM de Mg^{2+} é a melhor concentração para detecção do mRNA do fragmento da ubiquitina em amostras de coleóptile (ciclo crítico 25).

11. Variação do mRNA da *ZmPUMP1* e da ubiquitina em coleóptiles de milho submetidos a estresses abióticos

Na figura 11, podemos observar a detecção dos mRNAs da *ZmPUMP1* (painel A) e da ubiquitina (painel B) no pool de mRNA extraído das amostras de coleóptiles de milho submetidos a situações de estresse salino (linha NaCl) e térmico (linha 6 °C). No painel A, podemos observar que a adição de NaCl ao meio de cultivo dos coleóptiles resulta num aumento da quantidade do mRNA para a *ZmPUMP1* (ciclo crítico 24), enquanto que nas outras amostras e nos controles o ciclo crítico foi o 26. É possível ainda observar que não há alteração na detecção do mRNA da *ZmPUMP1* em amostras isoladas de coleóptiles submetidos a estresse por baixas temperaturas (linha 6 °C) em relação aos níveis presentes nas amostras controle, uma vez que o ciclo crítico de detecção foi o mesmo. No painel B podemos observar que todas as amostras possuem um mesmo ciclo crítico de detecção para a ubiquitina, o ciclo 24, indicando uma mesma quantidade de amplicon alvo.

12. Razão ADP/O de mitocôndrias de coleóptiles de milho submetido a estresses abióticos

Na tabela III podemos observar que a razão ADP/O de mitocôndrias controle é 1,5 (± 0.12), enquanto as mitocôndrias submetidas ao estresse por frio têm uma razão ADP/O de 1,2 (± 0.05). Nas mitocôndrias submetidas a estresse salino não foi possível medir a fosforilação do ADP.

Tabela III. Efeito de estresses abióticos na razão ADP/O em mitocôndrias de milho.

	ADP/O	ADP/O (+BSA)	ADP/O (+GTP)
Controle	1.49 $\pm$ 0.12	1.78 $\pm$ 0.27	1.41 $\pm$ 0.25
6°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)	1.20 $\pm$ 0.05	2.01 $\pm$ 0.18	1.99 $\pm$ 0.52
NaCl 250 mM	não mensurável	1.54 $\pm$ 0.14	2.08 $\pm$ 0.15

Na presença de 4 mM GTP ou 0,2 % BSA, as velocidades de consumo de O₂ no estado 4 se tornam mais lentas devido a inibição da atividade da proteína desacopladora, resultando num aumento da razão ADP/O para as mitocôndrias submetidas ao frio e ao estresse salino (Tabela III). Este aumento da razão ADP/O na presença de GTP não foi observado para as mitocôndrias controle.

Deve-se ressaltar que os resultados mostrados na Tabela III foram obtidos na presença de BHAM (1,5 mM), de forma a inibir a atividade da oxidase alternativa (Almeida e col., 1999; Sluse e col., 1998).

13. Peroxidação lipídica (TBARS) em mitocôndrias de coleóptiles de milho submetidos a estresses abióticos

Os dados da literatura mostram que o estresse por baixas temperaturas está associado ao estresse oxidativo, que resulta em taxas mais elevadas de lipoperoxidação (Prasad e col., 1994; Prasad, 1996; Rao e col., 1997, Popov e col., submetido). Em milho, foi demonstrada uma alteração na composição lipídica de membrana mitocondrial de coleóptiles de milhos submetidos ao frio (Santis e col., 1999). Considerando ainda a estreita ligação observada em milho entre os estresses abióticos e o estresse oxidativo, decidimos verificar se, nas nossas condições experimentais, estaria havendo alguma alteração na taxa de lipoperoxidação.

Na Figura 12, podemos observar que a taxa de produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é diretamente proporcional ao nível de lipoperoxidação, está significativamente aumentada em mitocôndrias isoladas de coleóptiles de milhos submetidos a 6°C ou a 250 mM de NaCl por 24 horas. Vale ressaltar que os níveis de lipídios oxidados encontrados estão em concordância com níveis previamente reportados (Castilho e col., 1994; Borsani e col., 2001). A Tabela IV sumariza os dados da figura 12.

Tabela IV. Peroxidação lipídica induzida por estresses abióticos em mitocôndrias de milho.

	η moles TBARS/mg proteína
controle	0.314 ± 0.071
6°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)	0.647 ± 0.038
NaCl 250 mM	0.878 ± 0.122

14. Detecção imunoquímica com anticorpos anti-S/PUMP de mitocôndrias de milho submetido a estresses abiótico

Considerando os dados da literatura que apontam um aumento da concentração de ácidos graxos livres em situações de estresse por baixa temperatura e excesso de sal (Prasad, 1996; Borsani e col., 2001) e os resultados por nós obtidos, mostrando aumento da peroxidação lipídica e diminuição da razão ADP/O (Tabela IV e figura 12), assim como os dados de expressão do mRNA (figura 11), restava verificar a concentração da proteína nos tecidos estudados.

Utilizando então 50 μg de amostras de mitocôndrias de coleóptiles submetidos a frio e excesso de sal, realizamos a eletroforese em poliacrilamida e transferência das amostras para uma membrana de nylon. Na figura 13, é possível observar que a quantidade da proteína desacopladora detectada pela ligação com o anticorpo anti-PUMP de batatas (Nantes e col., 1999) aumenta nas amostras submetidas a estresse. Desta forma, tanto a quantidade da proteína quanto seus substratos são positivamente regulados nas situações de estresse estudadas, sugerindo uma participação da proteína desacopladora de milho nestas situações.

15. Consumo de oxigênio por mitocôndrias de tomates mantidos em atmosfera hiperoxigenada (1 atm)

Dados recentes demonstram que atmosferas saturadas de O₂ induzem o aumento de expressão e da atividade da oxidase alternativa, de forma a modular um aumento da pressão parcial de oxigênio intracelular, que causaria estresse oxidativo (Popov e col., submetido). Utilizando succinato como substrato respiratório e na presença dos ativadores da oxidase alternativa piruvato (150 mM) e DTT (1 mM), medimos a velocidade do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias dos tomates, isoladas para o experimento do item 3.

Como podem ser observadas na Tabela V, as velocidades de consumo de oxigênio de ambas as mitocôndrias são similares. A adição de KCN (8 mM) reduz o consumo de oxigênio em aproximadamente 60-70%. A taxa de consumo de O₂ insensível a cianeto é semelhante em ambas as mitocôndrias, sugerindo que não ocorre aumento de consumo de oxigênio via oxidase alternativa. A respiração residual é inibida pela adição de BHAM (3 mM), inibidor específico da oxidase alternativa.

Tabela V. Consumo de oxigênio por mitocôndrias controle e submetidas a 1 atmosfera de oxigênio por 48 horas (em μ moles O₂/mg proteína/min)(n = 3).

	+ succinato 10 mM	+ KCN 8 mM	+ BHAM 3 mM
Controle (amb)	23.7 $\pm$ 4.2	8.4 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 0.2
1 atm O₂	24.9 $\pm$ 1.7	9.8 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.5

16. Detecção imunoquímica com anticorpos anti-*Sr*PUMP de mitocôndrias de tomates submetidos a atmosfera hiperoxigenada

A partir do isolamento de mitocôndrias dos tomates mantidos em 1 atmosfera de oxigênio e de tomates mantidos em atmosfera ambiente, realizamos a eletroforese em poliacrilamida e posteriormente a transferência das proteínas para uma membrana de nylon.

50 ng de proteínas mitocondriais foram adicionadas à cada coluna da eletroforese. No autorradiograma mostrada na Figura 14 podemos observar que a quantidade de proteína que é reconhecida pelo anticorpo anti – PUMP (batatas) é maior nas amostras controle (*amb*) que nas amostras mantidas em atmosfera de oxigênio (*oxi*). Este padrão de expressão é similar ao observado em mitocôndrias isoladas de tomates amadurecidos fora da planta (amadurecimento pós-colheita) (Almeida e col., 1999).

17. Efeito de inibidores e ativadores da *Sr*PUMP na geração de H_2O_2 pela respiração de mitocôndrias de batata e de fígado de rato na ausência de Ca^{2+}

A figura 15 monitora a geração de H_2O_2 por mitocôndrias de batatas através da oxidação da escopoletina, na presença de peroxidase de raiz forte. Foi possível observar que a geração de H_2O_2 por mitocôndrias de batatas na presença de rotenona (painel A, linha d) é significativamente aumentada pela adição de succinato (linha c). A adição de ácido linoléico, substrato da PUMP, diminui significativamente a geração de H_2O_2 observada (linha e). Para confirmar que o ácido linoléico estava sendo utilizando como substrato da proteína desacopladora e realizando o ciclo fútil através da membrana para transportar H^+ , utilizamos o ácido fenilvalérico, um ácido graxo incapaz de fazer “flip-flop” através de membranas e não é utilizado como substrato pela proteína desacopladora (Ježek e col., 1997), e observamos que a inibição da geração de H_2O_2 pela cadeia transportadora de elétrons não era diminuída (linha b).

A adição de ATP, inibidor alostérico da PUMP, e de BSA, que remove os ácidos graxos livres do meio de reação, aumentaram a geração de H_2O_2 mitocondrial (linha a), confirmando que a atividade da proteína desacopladora presente naquelas mitocôndrias

diminui a geração mitocondrial de EAOs. A adição do desacoplador FCCP inibiu completamente a geração de H_2O_2 , sugerindo que o aumento da produção de EAOs induzido após a inibição da proteína desacopladora está relacionado com os efeitos da PUMP no potencial eletroquímico mitocondrial.

O painel B mostra as mesmas adições feitas a mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A produção de EAOs na presença de rotenona (linha d) é significativamente aumentada com a adição de succinato (linha c), enquanto que a presença de ácido linoléico não afeta esta produção (linha e). A adição do protonóforo FCCP diminui a geração de H_2O_2 (linha f), e a adição de ATP e BSA diminui parcialmente esta geração. Esta diminuição observada com a adição de ATP e BSA, aparentemente contraditória em vista da ausência de proteínas desacopladoras em mitocôndrias de fígado, pode ser explicada pela complexação do íon cálcio contaminante com o ATP, ou ainda pela inibição da atividade de algum carreador mitocondrial (Skulachev, 1999). O BSA também pode ter capacidade de complexar e quelar EAOs geradas pela cadeia respiratória.

18. Efeito de inibidores e ativadores da *S*tPUMP na geração de H_2O_2 pela respiração de mitocôndrias de batata e de fígado de rato na presença de Ca^{2+}

Considerando que as mitocôndrias de batatas têm uma capacidade de captação e retenção do íon cálcio significativamente menor que as mitocôndrias de fígado de rato, utilizamos 500 μM de Ca^{2+} para induzir o aumento de produção de EAOs pelas mitocôndrias de batatas (Figura 16 painel A linha b), enquanto para as mitocôndrias de fígado utilizamos apenas 50 μM (painel B linha b).

Da mesma forma que quando observado anteriormente, o aumento da geração de H_2O_2 estimulado por Ca^{2+} é diminuído na presença de ácido linoléico (painel A linha d), mas não pelo ácido graxo “inativo” fenilvalérico (linha c), e aumentado pela presença de ATP e BSA (linha a).

Em mitocôndrias de fígado de rato, a produção de EAOs estimulada por Ca^{2+} (painel B linha b) não é afetada pela presença do ácido linoléico (linha d) ou fenilvalérico (linha c), sendo parcialmente inibida por ATP e BSA (linha a). O efeito inibitório conferido pela presença de ATP está provavelmente relacionado com seu efeito quelante sobre o Ca^{2+} do meio, resultando numa concentração do íon muito pequena para induzir produção mitocondrial de EAOs.

A presença de FCCP diminui a geração de H_2O_2 estimulada por Ca^{2+} tanto em mitocôndrias de batatas quanto de fígado de rato (linhas e). Esta inibição é mais evidente em mitocôndria de fígado de rato (painel B). Nas mitocôndrias de batata, devido à indução de um gradiente químico de Ca^{2+} , existe uma entrada do íon mesmo na presença de FCCP, o que resulta em uma pequena produção de H_2O_2 nestas condições (painel A).



4. FIGURAS

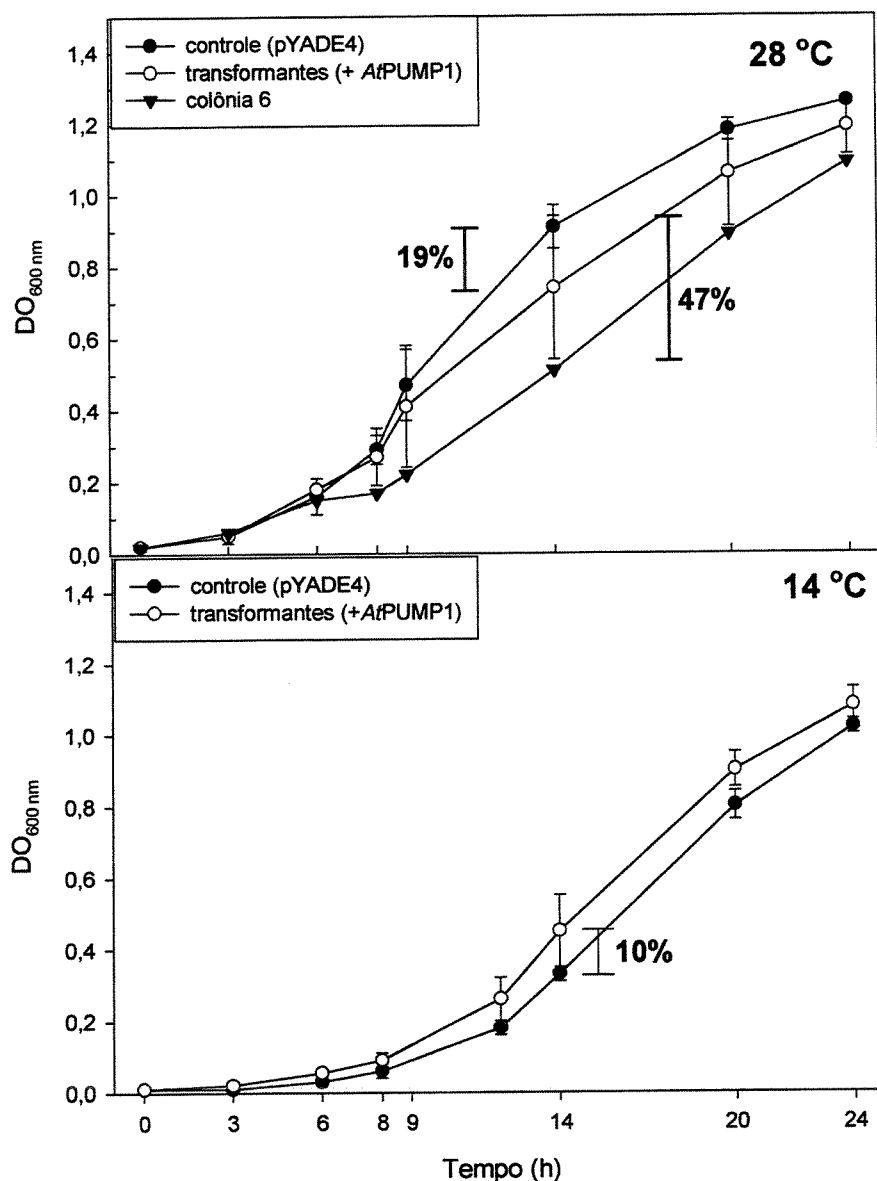


Figura 1. Curva de crescimento de leveduras controle e transformadas com o gene *AtPUMP1*. As leveduras foram crescidas em meio líquido seletivo como descrito em Metodologia, e as amostras foram retiradas nos tempos indicados. As temperaturas indicadas representam a média (± 1 °C) da temperatura durante o experimento. As curvas são a média de seis experimentos realizados em triplicata. As barras verticais representam os desvios da amostra. As porcentagens ao lado de algumas barras verticais representam a diferença de crescimento após 14 horas de indução (crescimento exponencial).

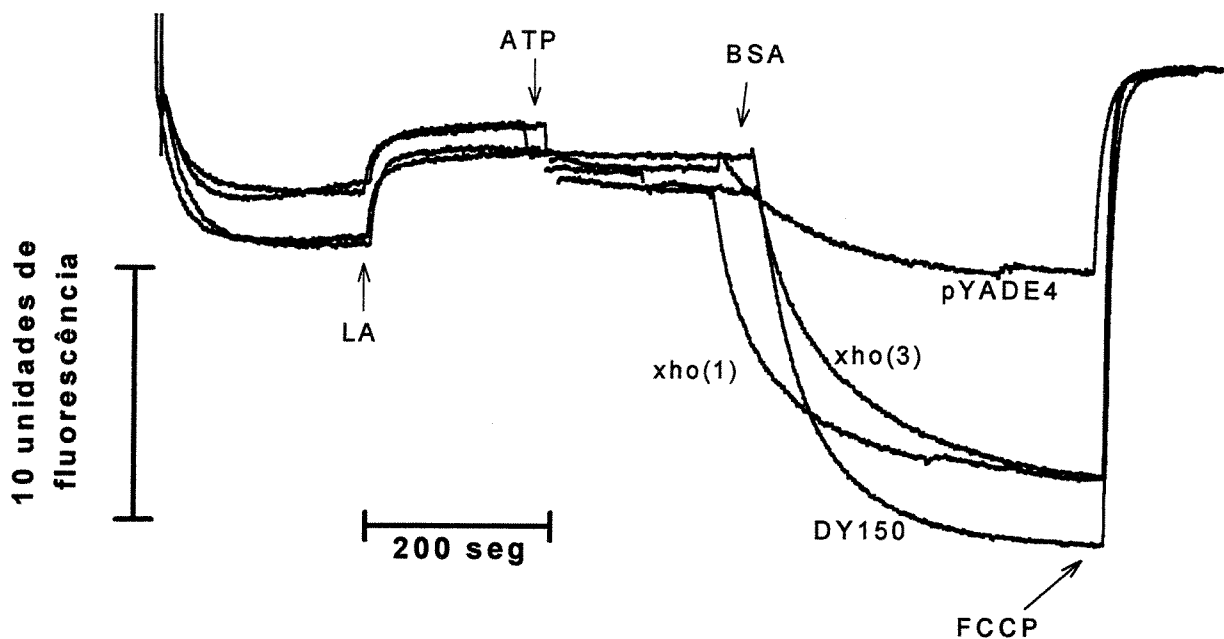


Figura 2. Medida do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de esferoplastos de *S. cerevisiae*. Os esferoplastos foram obtidos após digestão das paredes das leveduras com liticase, como descrito em Metodologia. As adições foram feitas onde indicadas: ácido linoléico (LA, 6,67 μ M), ATP 3 mM, BSA 0,2 %, FCCP 2 μ M. A concentração das células no meio de reação foi de 1 mg/ml. Experimento representativo de 6 preparações independentes. *DY150* – não transformadas; *pYADE4* – transformadas apenas com o plasmídeo; *xho(1)* – transformadas com o gene antisense; *xho(3)* – transformadas com o gene em orientação correta.

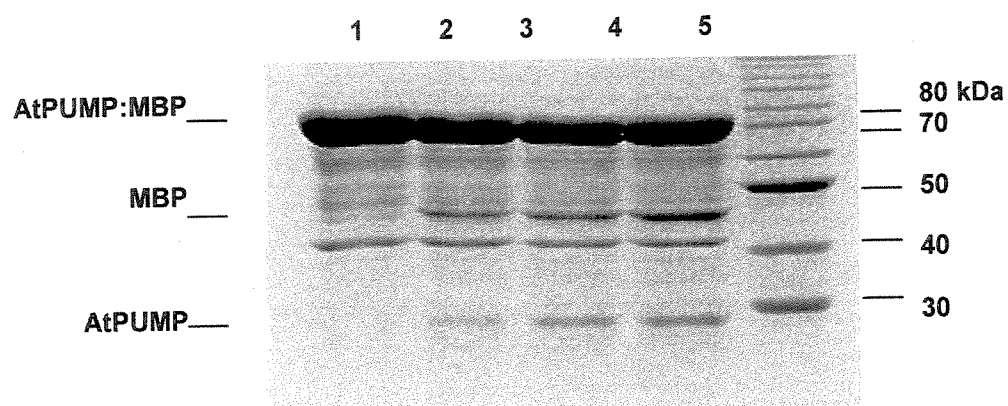


Figura 3. Expressão e clivagem da proteína de fusão *AtPUMP1*:MBP. As amostras foram colhidas nos tempos 0h (coluna 1), 2h (coluna 2), 4h (coluna 3) e 8h (coluna 4) e separadas num SDS-PAGE 10%. A coluna 5 mostra o padrão de peso molecular. SDS-PAGE representativo de dois experimentos.

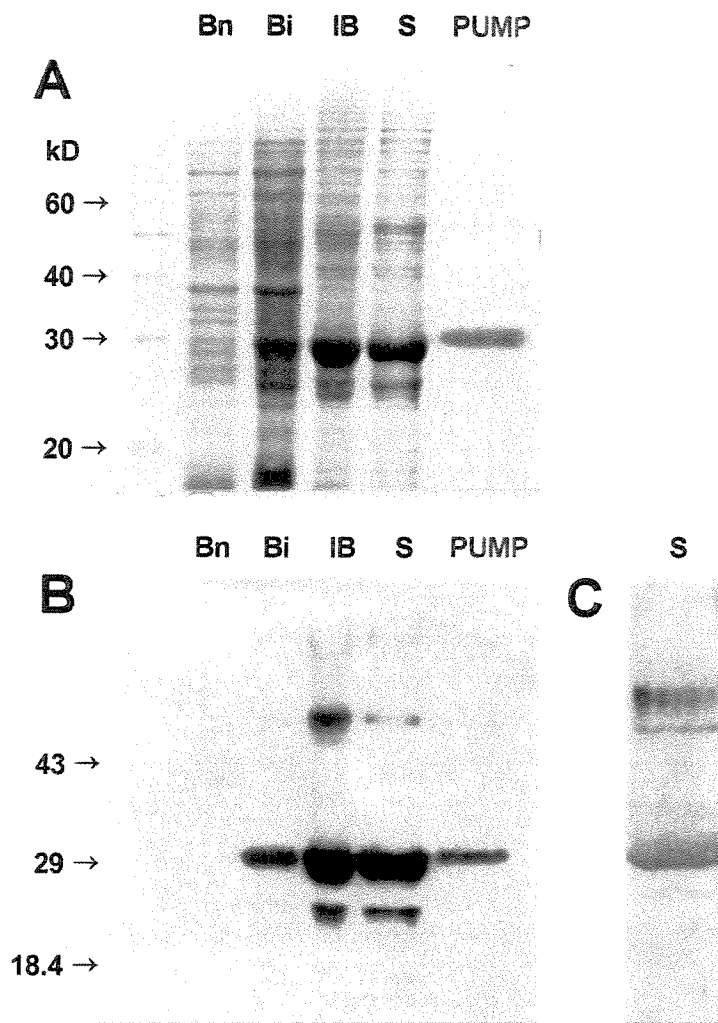


Figura 4. Caracterização da proteína expressa em corpúsculos de inclusão. Paineis A: SDS-PAGE corado com Coomassie blue. À partir da esquerda, as colunas correspondem a: padrão de peso molecular (números à esquerda indicam massa molecular em kDa), extratos de bactérias transformadas com *AtPUMP1* não induzidas (coluna Bn) ou induzidas com IPTG (coluna Bi), corpúsculos de inclusão solubilizados com SDS (coluna IB), corpúsculos de inclusão pré-solubilizados com 0.3% laurilsarcosina (coluna S) e a proteína solubilizada utilizada para reconstituição (coluna PUMP). **Painéis B e C.** Detecção imunoquímica mostrando a reação cruzada de anticorpos anti-*AtPUMP1* e anti-*StPUMP1*, respectivamente.

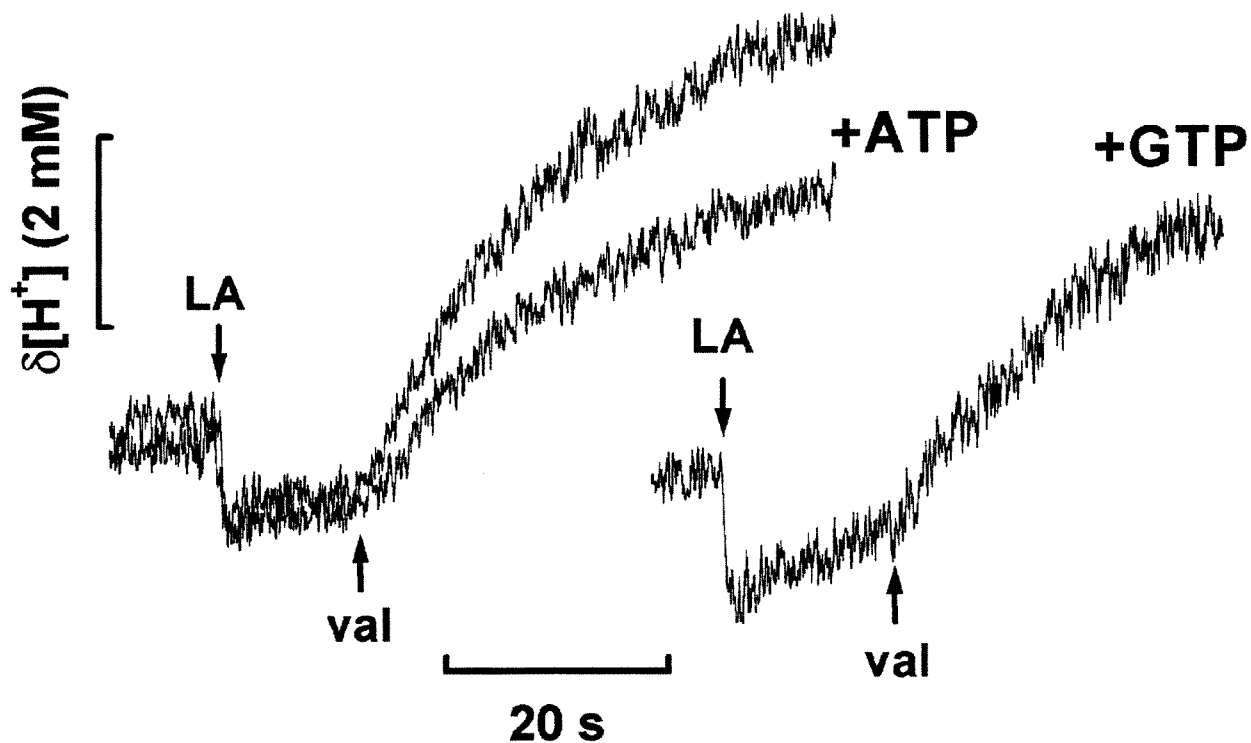


Figura 5. Traçados representativos dos fluxos de H^+ em proteolipossomos contendo a *AtPUMP1*. Os fluxos de H^+ foram induzidos pela adição de 26,6 μM de ácido linoléico na presença de 1,3 μM de valinomicina (aproximadamente 179.5 mV - 165 mM $[K^+]$ fora, 0,168 mM $[K^+]$ dentro) e na presença de 4 mM de ATP (traçados à esquerda) ou GTP (traçados à direita).

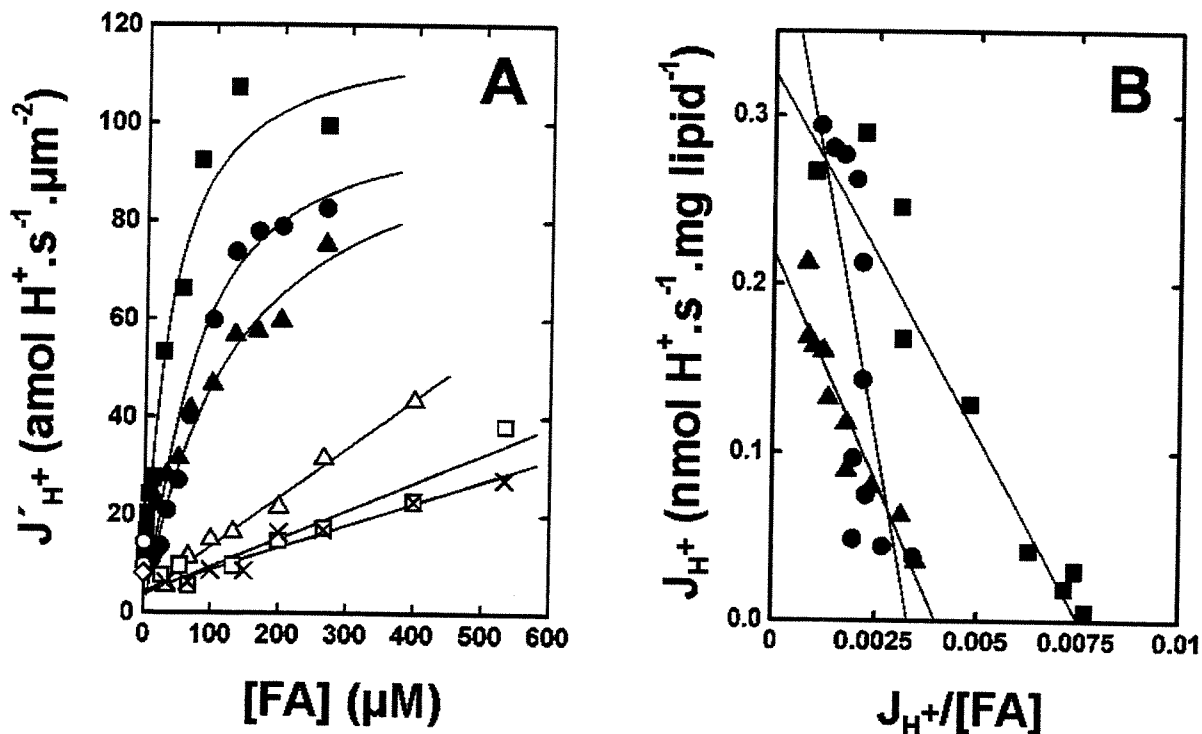


Figura 6. Cinética do transporte de H^+ por vários ácidos graxos em proteolipossomos e lipossomos. **Painel A.** Comparação do fluxo de H^+ em lipossomos (símbolos abertos) e proteolipossomos (símbolos fechados). Os fluxos de H^+ nos lipossomos na presença dos ácidos palmítico (x), linoléico ($\square$), e láurico (ρ) devem ser comparados com os fluxos observados nos proteolipossomos contendo *AtPUMP1* induzidos pelos ácidos palmítico ($\bullet$), linoléico ($\blacksquare$), e láurico ($\square$) no painel A. Está também representado o fluxo basal de H^+ na ausência de ácidos graxos em lipossomos ($\diamond$) e proteolipossomos ($\circ$). Os experimentos foram realizados na presença de $1,3 \mu M$ de valinomicina, e os fluxos foram calculados por μm^2 de membrana da vesícula. **Painel B.** O painel B mostra o gráfico tipo Eadie-Hofstee para os dados de cinética de transporte de H^+ induzido pelos ácidos linoléico ($\blacksquare$), palmítico ($\bullet$), e láurico ($\square$).

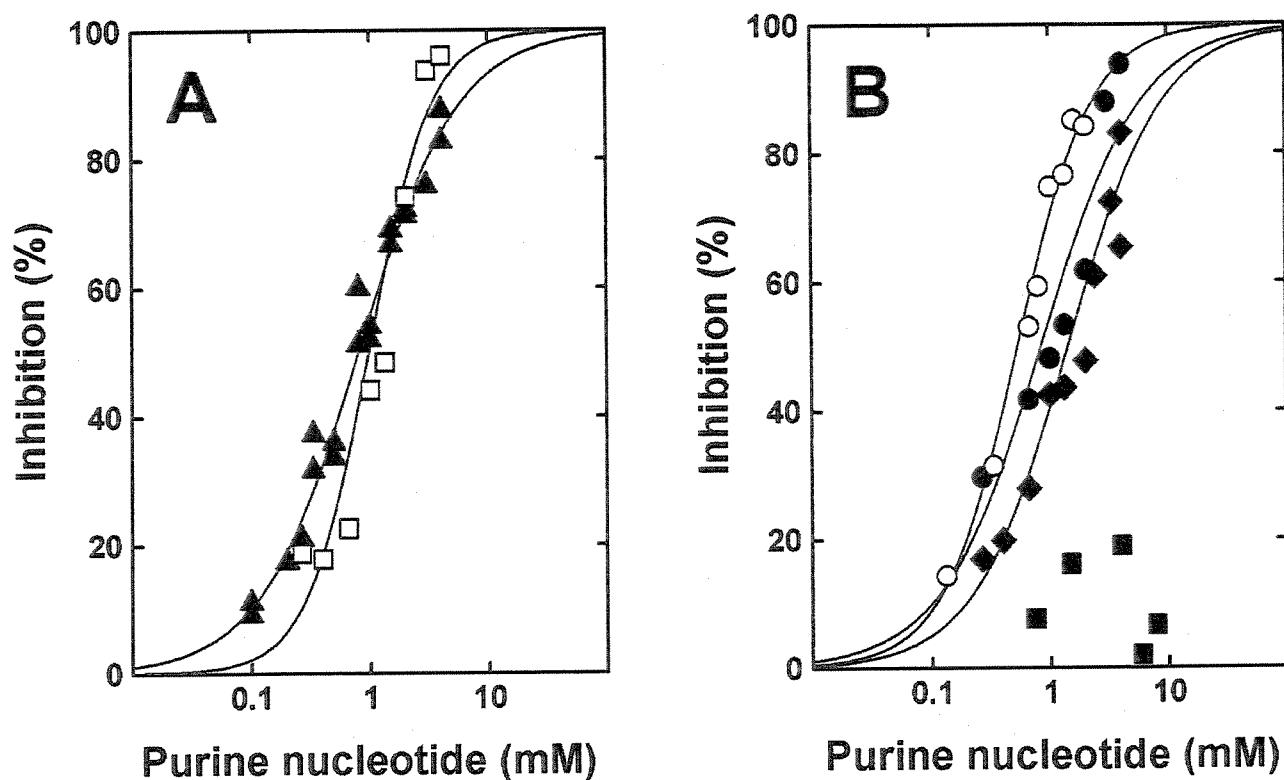
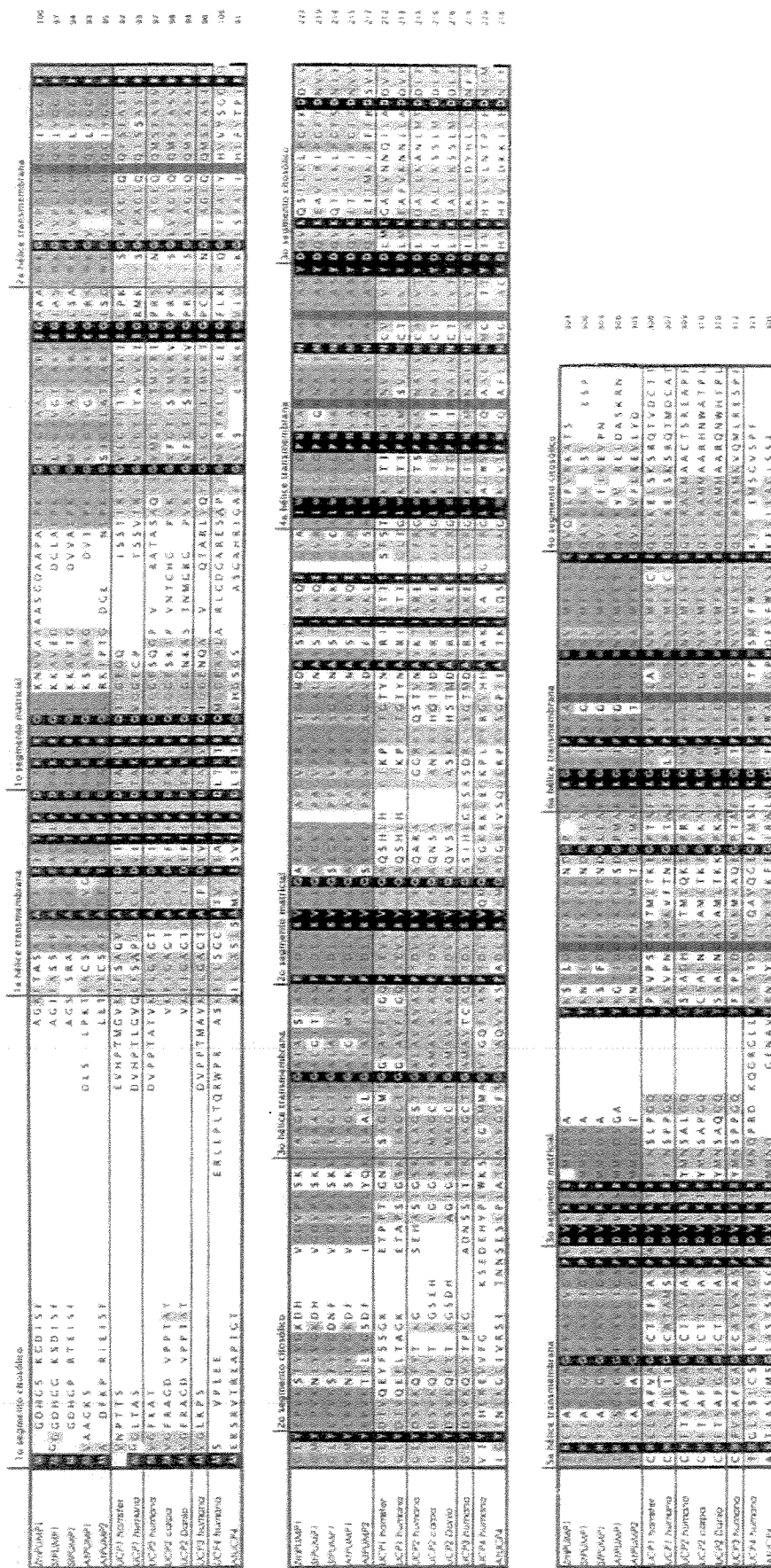


Figura 7. Cinética da inibição do transporte de H⁺ pela AtPUMP1 por nucleotídeos de purina em diferentes pHs. O transporte de H⁺ induzido por ácido linoléico foi inibido pela presença de GDP (□) e GTP (◻) em pH 7.1 no painel A, e por ADP (◆) e ATP em pH 6.3 (○), 7.1 (●) e 7.8-8.0 (■) no painel B. Os dados representam a inibição dos sítios de ligação orientados para o lado externo (~50%). As constantes da afinidade estão resumidas na Tabela II.



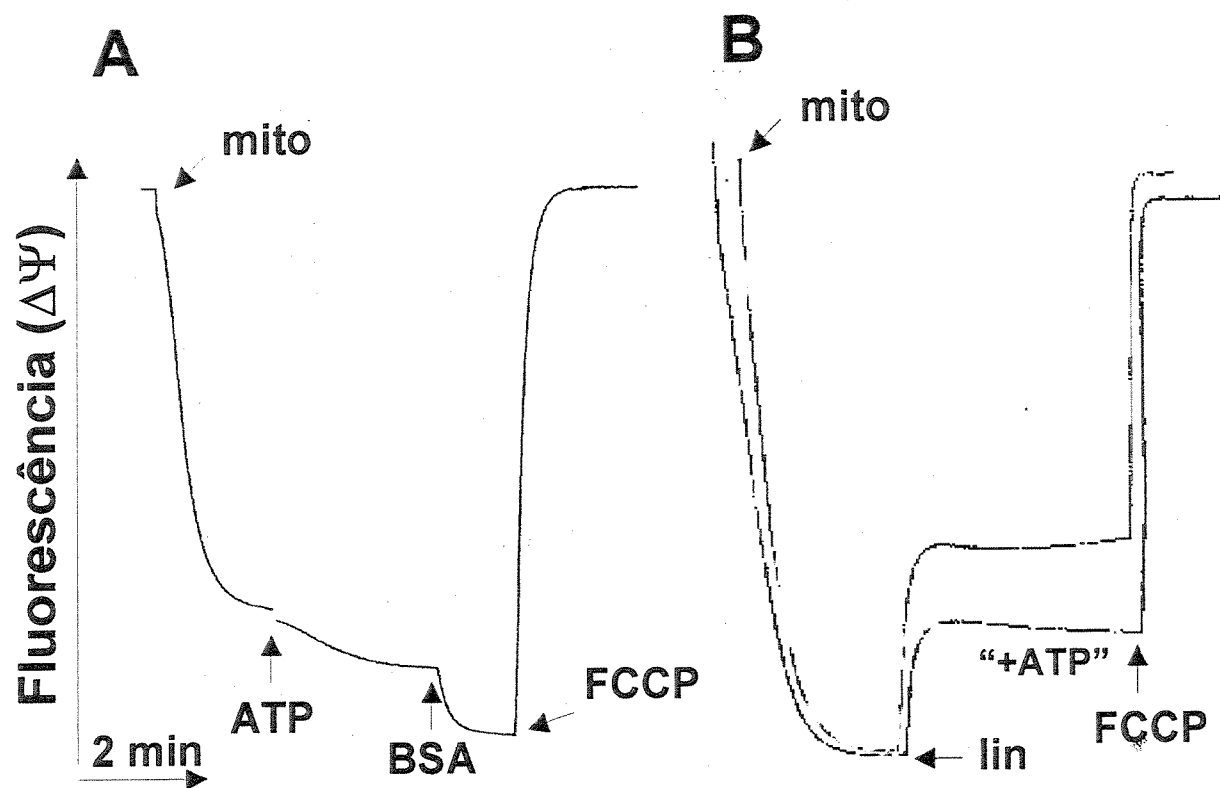


Figura 9. Potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de coleóptiles de milho. As mitocôndrias (1 mg/ml) foram incubadas em meio de reação como descrito em Metodologia, na presença de um coquetel de substratos de sítio I. As adições de ATP 6 mM, BSA 0,2% (p/v), ácido linoléico (lin) 3,33 μ M e FCCP 1 μ M foram realizadas onde indicado. No traçado “+ATP” (painel B), o nucleotídeo estava presente desde o início da incubação.

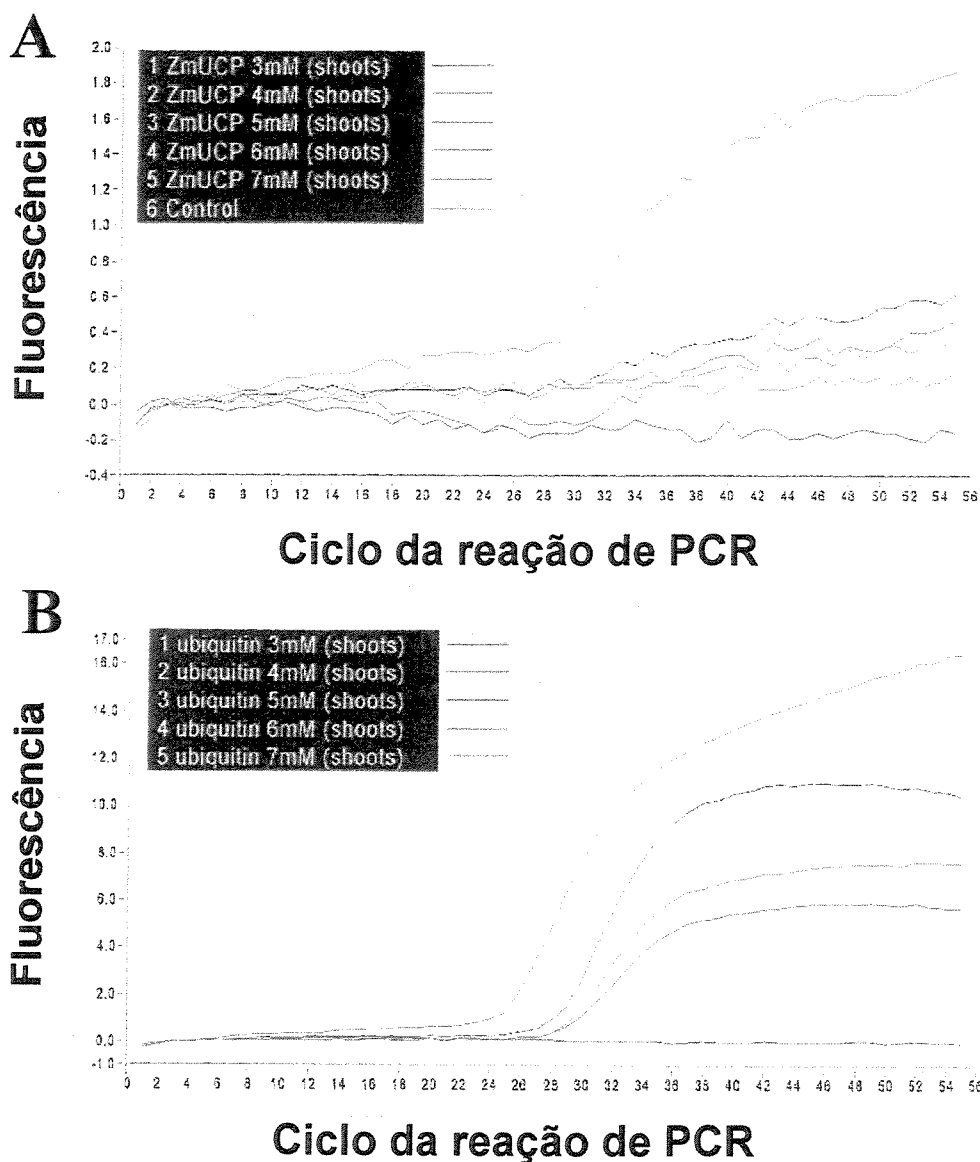


Figura 10. Curva de diferentes concentrações do cofator Mg^{2+} para detecção do amplicon da *ZmPUMP1* e ubiquitina em coleótipos de milho. Na presença de diferentes concentrações de Mg^{2+} e primers específicos, a detecção do amplicon da *ZmPUMP1* (painel A) e da ubiquitina (painel B) foi realizada utilizando PCR em Tempo Real. O ponto da curva que primeiro ultrapassa os valores base de fluorescência é considerado o ciclo crítico da amostra, sendo proporcional à quantidade do amplicon alvo.

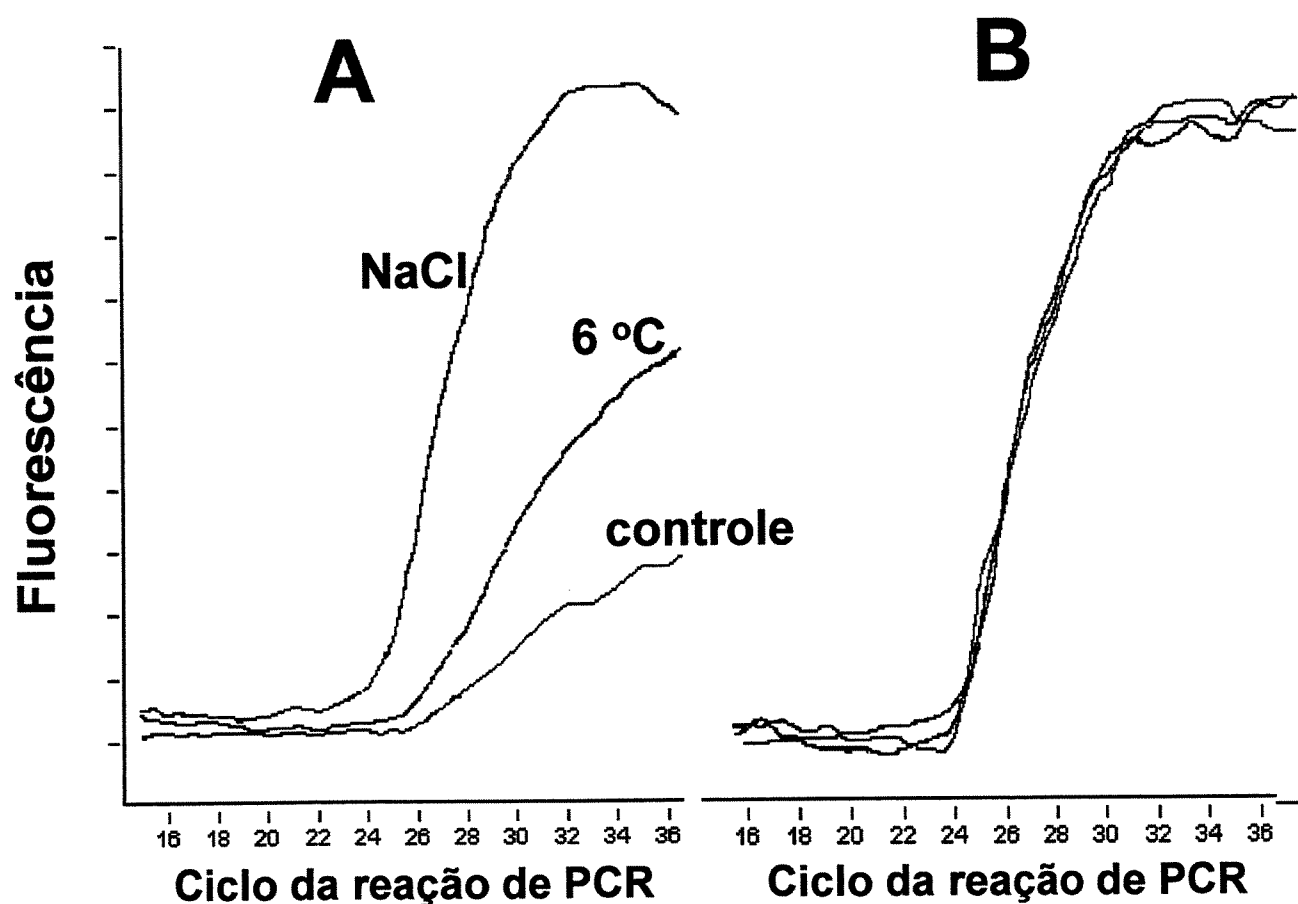


Figura 11. Detecção do mRNA da *ZmPUMP1* e da ubiquitina em coleóptiles de milho submetidos a estresses abióticos. As amostras foram processadas como descrito em Metodologia, e a detecção do amplicon da *ZmPUMP1* (painel A) e da ubiquitina (painel B) foi realizada na presença de 4 mM Mg^{2+} para *ZmPUMP1* e 7 mM Mg^{2+} para ubiquitina. “NaCl” e “6 °C” indicam os tratamentos a que foram submetidos os coleóptiles de milho antes da extração do mRNA.

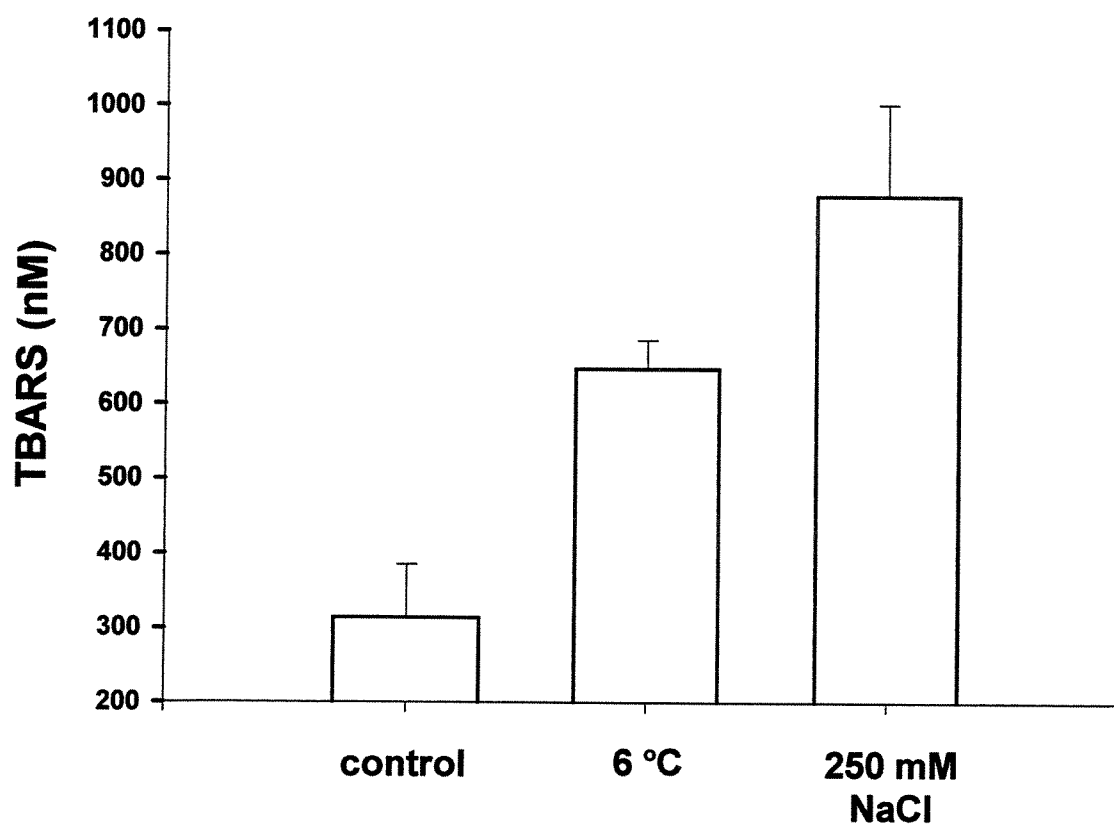


Figura 12. Peroxidação lipídica em mitocôndrias de coleóptiles de milho submetidos a estresses abióticos. As sementes foram germinadas e tratadas como descrito em Metodologia. Os produtos de lipoperoxidação foram detectados como produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em $\lambda = 535$ nm, e as concentrações foram calculadas usando coeficiente de extinção molar igual a $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

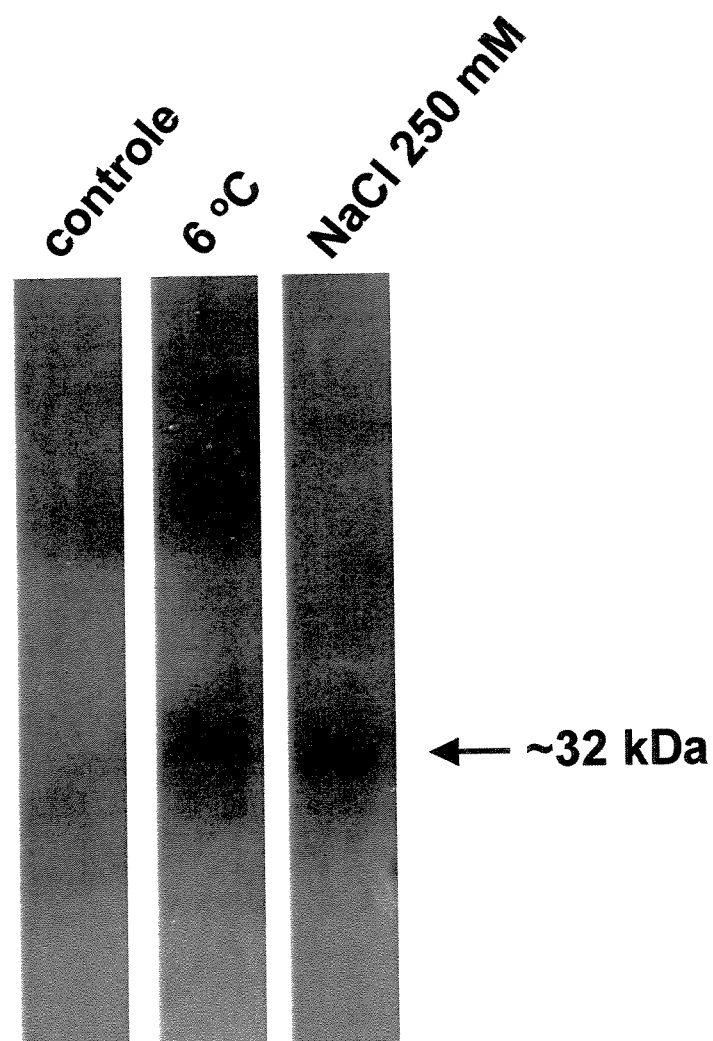


Figura 13. Detecção imunoquímica da proteína desacopladora em mitocôndrias de coleóptiles de milho. Aproximadamente 50 µg de proteína mitocondrial foi adicionada a cada coluna para a separação através de SDS-PAGE e posterior detecção imunoquímica, utilizando o anticorpo anti-SrPUMP1 (1:1000), conforme descrito em Metodologia.

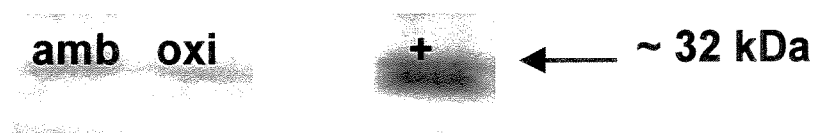


Figura 14. Detecção imunoquímica da PUMP em mitocôndrias isoladas de tomates mantidos em atmosfera ambiente (amb) ou a 1 atmosfera de O₂ (oxi) por 48 horas. Aproximadamente 50 µg de proteínas mitocondriais foram separadas em SDS-PAGE e detectadas com o anticorpo anti – *StPUMP* (1:1000) como descrito em Metodologia. A coluna (+) representa o controle positivo (*AtPUMP1* expressa em *E. coli*).

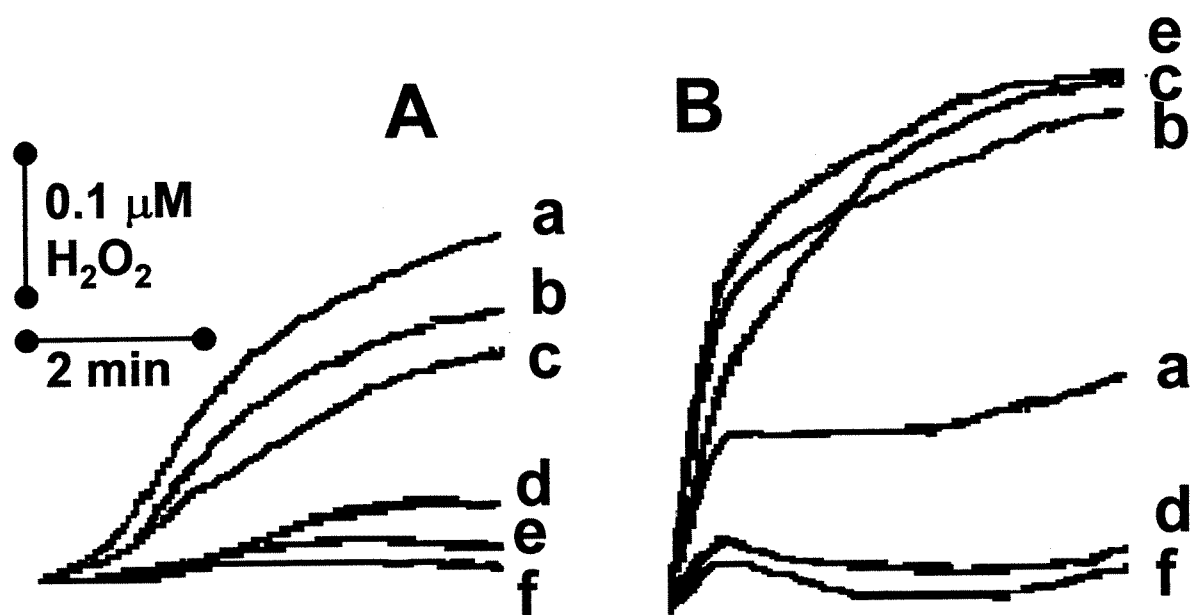


Figura 15. Efeitos de substratos e inibidores da *SrPUMP1* na geração de H₂O₂ pela cadeia respiratória. Mitocôndrias de batata (0,5 mg/ml, painel A) e de fígado de rato (0,5 mg/ml, painel B) foram incubadas em meio de reação respirando com succinato (2 mM). As adições foram realizadas no início dos experimentos. Linha a: ATP 2,5 mM e BSA 0,1%; linha b, ácido fenilvalérico 40 μM; linha c, sem adições; linha d, ausência de succinato; linha e, ácido linoléico 40 μM; e linha f, FCCP 1 μM.

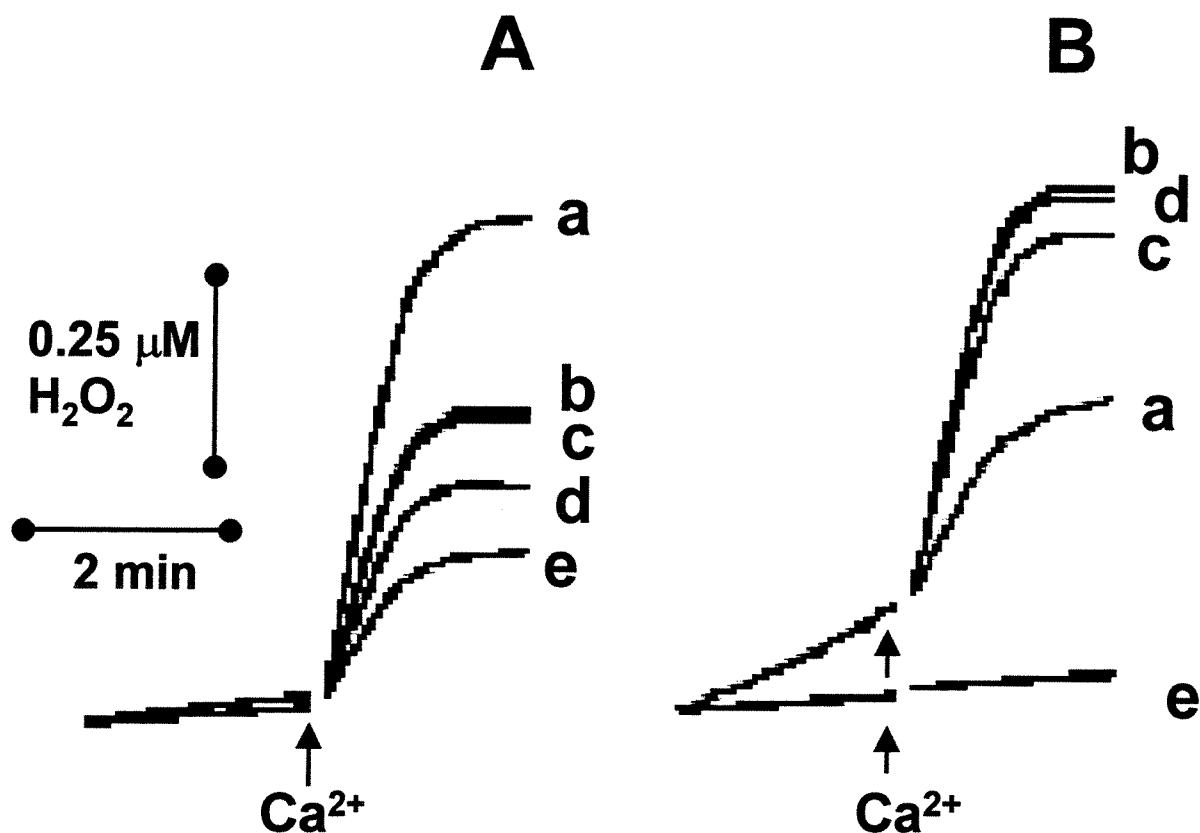
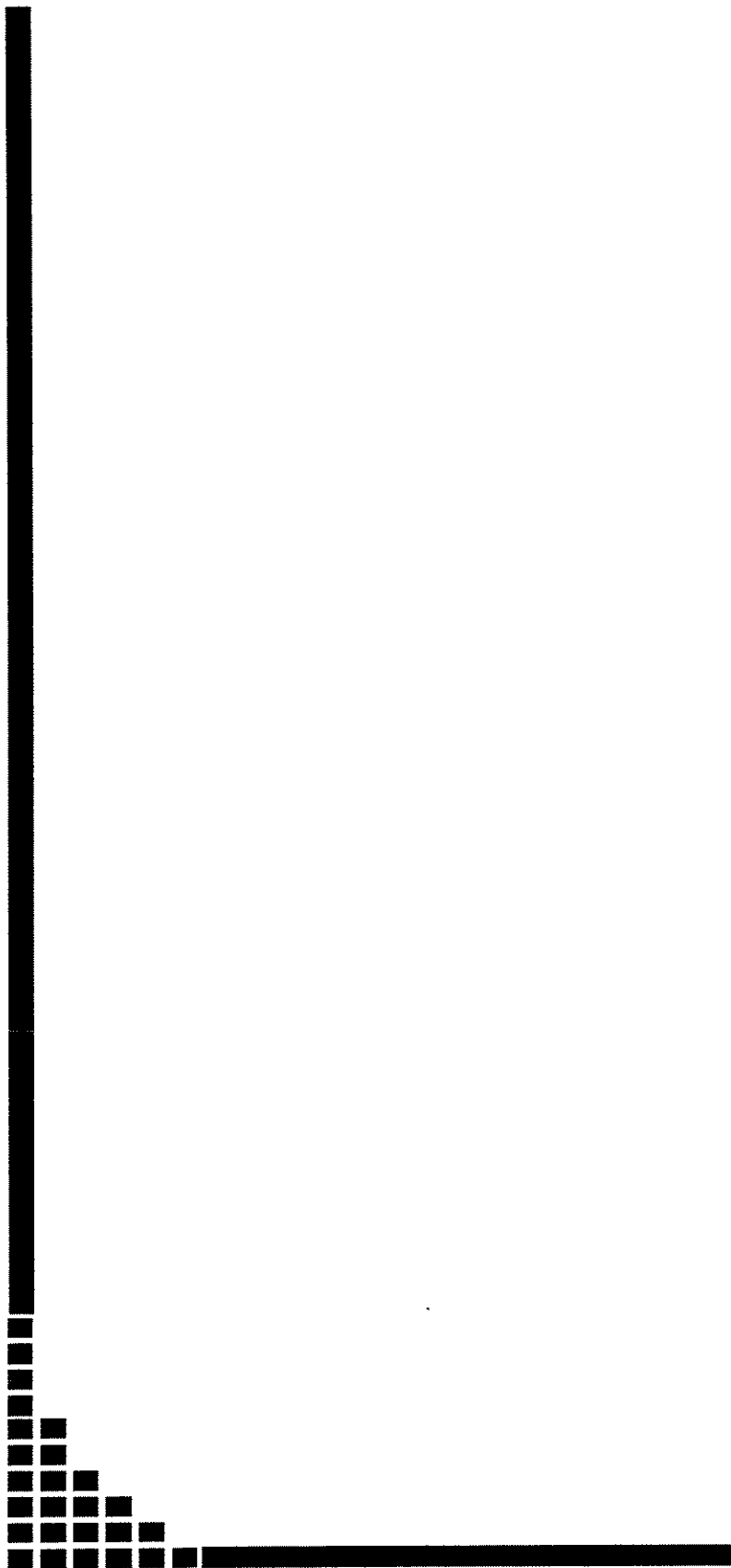


Figura 16. Efeitos de substratos e inibidores da *SrpPUMP1* na geração de H_2O_2 pela cadeia respiratória na presença de Ca^{2+} . Mitocôndrias de batata (0,5 mg/ml, painel A) e de fígado de rato (0,5 mg/ml, painel B) foram incubadas em meio de reação respirando com succinato (2 mM). As adições foram realizadas no início dos experimentos. Linha a: ATP 2,5 mM e BSA 0,1%; linha b, sem adições; linha c, ácido fenilvalérico 40 μM ; linha d, ácido linoléico 40 μM ; linha e, FCCP 1 μM . A concentração de Ca^{2+} no meio de reação foi de 500 μM (painel A) e de 50 μM (painel B).



5. DISCUSSÃO

Até o presente momento, a termogênese propriamente dita, isto é, regulada pelo organismo frente a determinados fatores, foi apenas demonstrada para a UCP1, em mamíferos (Nicholls e Locke, 1982; Argyropoulos e Harper, 2002). Hinz e colaboradores (1999) demonstraram que leveduras que expressam a UCP3 tinham seu crescimento afetado (diminuição média de 50%) e uma maior produção de calor que leveduras controle. Nossos resultados de crescimento de leveduras expressando o gene *AtPUMP1* (Figura 1) mostram que esta proteína provavelmente dissipa parte da energia que a célula usaria para crescer em um ambiente termoneutro (neste caso, à 28 °C). Entretanto, quando a temperatura ambiente cai (para 14 °C), observamos que a energia dissipada em forma de calor não é desperdiçada pela célula, mas aproveitada provavelmente para aumentar a temperatura no microambiente do citoplasma e permitir ao metabolismo apresentar níveis semelhantes aos níveis de células controle naquela situação (Skulachev, 1999). A possibilidade de um desacoplamento controlado para aumentar as taxas metabólicas e manter o “pool” celular de equivalentes reduzidos também não pode ser desprezada, uma vez que não existe uma via alternativa insensível a cianeto em *S. cerevisiae* (El- Moualij e col., 1997; Skulachev, 1999, Affourtit e col., 1999). Neste sentido, a expressão da proteína desacopladora em baixas temperaturas causaria aceleração do transporte de elétrons na cadeia respiratória, conseqüente redução da formação de EAOs e facilitação do crescimento, como demonstrado em mitocôndrias de batatas e para a oxidase alternativa em *S. pombe* (Kowaltowski e col., 1998; Nantes e col., 1999; Affourtit e col., 1999).

Com o objetivo de obter grandes quantidades da proteína desacopladora, utilizamos vetores de expressão procarióticos (Ausubel e col., 1987; Sambrook e col., 1989). A expressão da proteína *AtPUMP1* fusionada com uma proteína solúvel (MBP) para posterior clivagem, purificação em coluna de Sepharose e reconstituição não se mostrou eficaz em virtude da baixa eficiência de clivagem da proteína de fusão e da alta hidrofobicidade da proteína, que se liga fortemente à coluna. Expressamos então a proteína em corpúsculos de inclusão, que são vesículas lipídicas nas quais as bactérias acumulam resíduos tóxicos (ou exógenos)(Fiermonte e col., 1993). Existem numerosos estudos na literatura descrevendo funções específicas de diversos carreadores mitocondriais através da reconstituição funcional da proteína recombinante, demonstrando que este método é extremamente útil para correlacionar determinado gene à proteína. Recentemente, este

método foi utilizado com sucesso para as proteínas desacopladoras UCP2 e UCP3 (Jabůrek e col., 1999, Echtay e col., 2001), além de ter sido largamente utilizado para a UCP1 (Ježek e col., 1996; Echtay e col., 2000; Jabůrek e col., 2001; para revisão mais detalhada veja Garlid e col., 1998 e Ježek e col., 1998). A enorme dificuldade em se obter mitocôndrias das minúsculas plantas de *Arabidopsis* corroborou nossa alternativa em se utilizar a expressão da proteína recombinante produzida em *E. coli*.

Os resultados aqui apresentados confirmam que o produto de expressão do gene *AtPUMP1* (Maia e col., 1998) realmente codifica uma proteína desacopladora genuína, isto é, capaz de dissipar o potencial eletroquímico de H^+ gerado pela cadeia transportadora de elétrons sem conservação de energia (Skulachev, 1991; 1999). A PUMP1 de *Arabidopsis* mostrou as mesmas características funcionais das proteínas desacopladoras de plantas já descritas: além do transporte dos ânions de ácidos graxos, os níveis de nucleotídeos de purina necessários para inibir a atividade protonofórica da *AtPUMP1* (assim como os K_i) são fisiológicos e bastante próximos aos já obtidos para mitocôndrias de batata, de tomates e diversos outros vegetais (Ježek e col., 1996; Costa e col., 1999; Ježek e col. 2000).

A inibição competitiva do transporte de ácidos graxos pelo ácido undecanossulfônico demonstra que ambos os ânions competem pelo mesmo sítio de ligação na proteína, como já demonstrado para a PUMP de batatas (Ježek e col., 1997a), de tomates (Costa e col., 1999), para UCP1 (Garlid e col., 1996) e para as UCP2 e 3 (Jabůrek e col., 1999). Esta competição sugere que se os aminoácidos não são conservados entre as proteínas, as cargas dos resíduos laterais substituintes devem ser (Garlid e col., 1998). Confirmando esta hipótese, estudos de modificações químicas demonstraram que a proteína desacopladora presente em mitocôndrias de batatas possui determinados resíduos laterais de aminoácidos essenciais para suas ações de ligação com nucleotídeos e com ácidos graxos, exatamente como demonstrado para a UCP1 (Garlid e Ježek, 1998; Ježek e col., 2000b). Como também já demonstrado para a UCP1, o aumento do pH do meio resulta num decréscimo da inibição dos nucleotídeos de purina na atividade da *AtPUMP1*, enquanto que esta inibição aumenta quando o pH abaixa para 6,3. Diante destes resultados, é possível sugerir que o sítio de ligação dos nucleotídeos na *AtPUMP1* tem propriedades similares aos das proteínas UCP2 e 3 (Jabůrek e col., 1999) e da PUMP de batatas (Costa, 1998; Ježek e

col., 2000b), demonstrando surpreendente semelhança nos mecanismos de afinidade pelos nucleotídeos. Porém, a UCP1 (Garlid e col., 1996; 1998; Echtay e col., 2000) possui afinidade por nucleotídeos de purina muito maior, assim como afirmam alguns autores a respeito das UCP2 e 3 (Echtay e col., 2001).

Os valores máximos de transporte para o ácido linoléico obtidos para a PUMP de *Arabidopsis* foram similares aos obtidos para a PUMP de batatas com o mesmo substrato (Ježek e col., 1997a). Considerando os ácidos graxos testados, os valores de K_m obtidos para os ácidos láurico (12:0) e linoléico (18:2) foram semelhantes (43 μM e 55 μM , respectivamente), enquanto o obtido para o ácido palmítico (16:0) foi mais alto (129 μM). Entretanto, apesar dos diferentes coeficientes de partição, as concentrações dos ácidos graxos presentes na membrana foram de 48, 61 e 143 mM para os ácidos linoleico, láurico e palmítico, respectivamente (eq.1 de Garlid e col., 1998). Neste sentido, os valores de velocidade máxima de transporte (V_{max}) obtidos (ácido linoleico 0,32, ácido láurico 0,22 e ácido palmítico 0,43, em $\text{nmol H}^+ \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{mg lipídio})^{-1}$), foram maiores para os ácidos graxos com maiores coeficientes de partição. Este fato reflete algumas características da natureza do sítio de ligação dos ácidos graxos, como profundidade e formato, pois o ácido linoléico parece conjugar a afinidade apresentada pelo ácido láurico com a velocidade apresentada pelo ácido palmítico. Resultados obtidos para a UCP1 sugerem que o tamanho ideal da cadeia hidrofóbica estaria em torno de 11-12 carbonos (Ježek e col., 1990; 1994).

Recentemente, foram identificadas proteínas desacopladoras em quase todos os reinos de seres vivos, desde plantas inferiores a insetos, nematóides e fungos (Ježek e col., 2000a, Hanák e Ježek, 2001 e referências citadas). Através de buscas em bancos de dados, foi possível identificar a sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína desacopladora presente no genoma de milho (*Zea mays*, Figura 8), que apresenta alta identidade com a sequência deduzida de aminoácidos de outras proteínas desacopladoras vegetais, assim como de outros animais. É interessante observar que esta a sequência deduzida da proteína de milho possui os aminoácidos que são responsáveis pela ligação com os nucleotídeos de purina (Modriansky e col., 1997), podendo se esperar então alguma inibição da sua atividade por estes compostos. Entretanto, a proteína não possui as histidinas 145 e 147 (como a UCP1 humana possui), que segundo Klingenberg e Huang

(1999), seriam necessárias para o transporte de prótons. Mas, considerando que a proteína *StPUMP1* (Ježek e col., 1997a), produto do gene *StUCP* (Laloi e col., 1997; Ruzicka e col., 1999) transporta prótons de maneira semelhante à UCP1 e também não possui as histidinas (aminoácidos em amarelo na figura 8), podemos esperar que a *ZmPUMP1* também conduza prótons quando reconstituída. Vale ainda ressaltar que esta região (2º segmento matricial) da *StPUMP1* é bastante semelhante à da *ZmPUMP1*, assim como todas as regiões próximas às inserções da proteína na membrana (aminoácidos em preto e azul), indicando uma significativa importância destas regiões para a estrutura e/ou função da proteína.

Confirmando as hipóteses de estímulo e inibição da atividade da *ZmPUMP1* por ácidos graxos e nucleotídeos de purina formuladas no parágrafo anterior, os resultados obtidos com mitocôndrias isoladas permitem afirmar que, além de ser inibida por ATP, a *ZmPUMP1* também é capaz de mediar uma perda no potencial elétrico das mitocôndrias, induzida por ácido graxo exógeno, de maneira sensível a ATP (figura 9). Este padrão de resposta já havia sido observado em mitocôndrias isoladas de tomates e de batatas (Vercesi e col., 1995; Ježek e col., 1996; Costa e col., 1999, Almeida e col., 1999). Estes resultados sugerem que a proteína desacopladora de milho tenha características bioquímicas, como necessidade de ácidos graxos para catalizar o fluxo de prótons e regulação por nucleotídeos de purina, semelhantes às já descritas para outras UCPs (figuras 5 a 7, 8 e 9; Jaburek e col., 1999; Echtay e col., 2001). Estudos de reconstituição em vesículas lipídicas serão realizados para confirmar estas evidências.

Estudos anteriores mostraram que baixas temperaturas induzem a expressão de várias enzimas antioxidantes como parte do desenvolvimento de tolerância a este estresse (Prasad e col., 1994; Prasad, 1996). Em milho, e nas condições trabalhadas por estes autores, demonstrou-se o aumento da expressão de uma isozima de catalase (Prasad, 1996), indicando que o estresse térmico causa aumento da produção de peróxido de hidrogênio nestas plantas (Prasad, 1996). Entretanto, o H₂O₂ formado por estresses térmicos curtos (até três dias a 14°C, que é a temperatura mínima para manutenção do crescimento do coleóptile) pode ser responsável por um aumento da expressão de enzimas antioxidantes (Prasad e col., 1994; Prasad, 1996). Na realidade, existem evidências de que vários outros estresses abióticos, como salino, seco, osmótico ou ataque por patógenos, resultam em

estresse oxidativo, indicando que a resposta a diferentes estresses em coleóptiles de milho é bastante complexa (Prasad, 1996; Borsani e col., 2001; Hamilton and Heckathorn, 2001; Gong e col., 2001).

Dados do nosso laboratório mostram que a expressão do gene da proteína desacopladora de milho não é induzida por estresse térmico (Figura 11; Brandalise e col., submetido). Estes autores mostraram que a expressão da mensagem da *ZmPUMP1* é bastante reduzida após a exposição dos coleóptiles a temperaturas inibitórias de crescimento (6 °C). Verificou-se ainda que a geração de um estresse oxidativo exógeno (através de H₂O₂ ou menadiona) induz um aumento da expressão da *ZmPUMP1* (Brandalise e col., submetido).

A relação entre as proteínas desacopladoras e o estresse oxidativo têm sido bastante estudada. Em mamíferos, mostrou-se que a regulação da geração de EAOs é significativamente influenciada pela UCP2 (Negre-Salvayre e col., 1997; Arsenijevic e col., 2000). Em *Arabidopsis thaliana*, análises de microarranjos de DNA revelaram a existência de uma possível proteína desacopladora induzida por peróxido de hidrogênio (Desikan e col., 2001). Em mitocôndrias isoladas de batatas, o aumento da atividade da proteína desacopladora foi fortemente correlacionado com a diminuição da geração de EAOs (Kowaltowski e col., 1998). Outros dados do nosso grupo sugerem que a superexpressão da *AtPUMP1* em tabaco confere proteção contra estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio exógeno ou menadiona (Brandalise e col., submetido-2).

O estresse oxidativo causado pelos diversos estresses abióticos, por sua vez, pode induzir lipoperoxidação, resultando no aumento de ácido graxos livres na célula (Prasad, 1996; Rao e col., 1997; Borsani e col., 2001). Neste sentido, a diminuição da razão ADP/O (Tabela III) em mitocôndrias de coleóptiles de milho submetidos ao frio e excesso de sal pode ser explicada pelo aumento da atividade da proteína desacopladora devido a maior disponibilidade de substratos. A maior disponibilidade de substratos para a *ZmPUMP1* foi confirmada pelo aumento da produção de TBARS (Tabela IV), confirmando dados da literatura que indicam ocorrência de lipoperoxidação após estresse térmico (Prasad, 1996; Rao e col., 1997).

Estudos com mitocôndrias isoladas de tomates em diversos níveis de amadurecimento sugerem que o desacoplamento mitocondrial observado não é devido a um aumento da expressão da proteína desacopladora, mas sim da maior disponibilidade de substratos lipídicos (Güçlü e col., 1989; Rouet-Mayer e col., 1995; Costa e col., 1999; Almeida e col., 1999). Com os resultados aqui apresentados, podemos sugerir que a proteína desacopladora tem sua atividade estimulada durante estresse térmico e salino também em coleóptiles de milho, estendendo os resultados obtidos com tubérculos de batata (Nantes e col., 1999). Estes autores mostraram aumento da expressão e da atividade da proteína desacopladora quando tubérculos de batata foram submetidos a baixas temperaturas. Confirmando as inúmeras evidências de respostas semelhantes a estresses que induzem EAOs, a expressão e a atividade da *ZmPUMP1* também foram aumentadas (Figura 11 e Tabela III).

Nas situações apresentadas, é possível então visualizar duas respostas dos coleóptiles de milho frente aos estresses salino e de baixa temperatura. Ambas convergem para a formação da EAOs, com aumento da peroxidação lipídica e diminuição da razão ADP/O. Entretanto, no estresse salino ocorre aumento da mensagem para produção da proteína, enquanto que no estresse por baixas temperaturas a expressão do mRNA da *ZmPUMP1* permanece inalterada. Considerando ainda que a lipoperoxidação ocorrida no estresse salino foi maior que a ocorrida no frio, podemos especular que o estresse oxidativo causado *in vivo* pelo estresse salino é maior que o causado pelo frio, de forma que o organismo percebe que é necessário um desacoplamento maior e aumenta a mensagem para produção da proteína *ZmPUMP1*. Por outro lado, não se pode descartar as possibilidades de regulação pós – transcricional, como descrito para a UCP2 (Pecqueur e col., 2000).

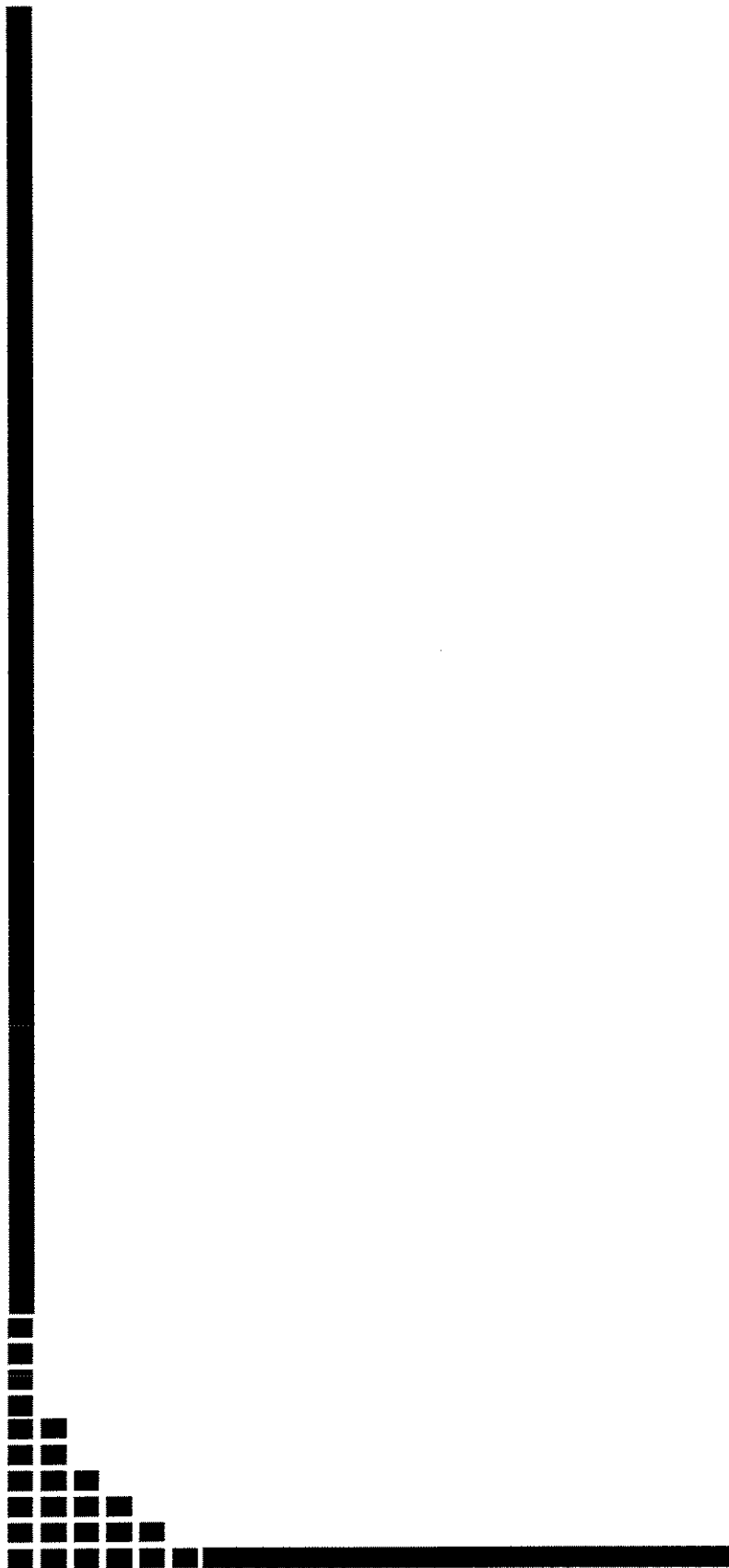
Com grande surpresa, em uma observação casual, notamos que a exposição de tomates a atmosferas ricas em oxigênio resultou numa aparente aceleração do amadurecimento dos frutos. Na tentativa de identificar alguma mudança nas vias dissipadoras de energia, como já foi observado para couve-flor (Popov e col., submetido), as mitocôndrias isoladas foram testadas quanto à presença da proteína desacopladora e quanto à atividade da oxidase alternativa. Entretanto, diferentemente do observado previamente (Popov e col., 1997; Popov e col., submetido), não pudemos observar aumento

na atividade da oxidase alternativa (Tabela V). A detecção imunoquímica da proteína desacopladora revelou um padrão de diminuição da expressão já observado para tomates amadurecidos no pós-colheita (Almeida e col., 1999).

Desta forma, nossos resultados sugerem que tomates submetidos a uma atmosfera hiperoxigenada são induzidos ao amadurecimento, e que este amadurecimento não tem relação com a atividade da via oxidase alternativa. Por outro lado, a falta de ativação da via oxidase alternativa permite supor que o amadurecimento seja mediado pela ação da proteína desacopladora que, apesar de ter sua expressão diminuída (Figura 14), teria maior disponibilidade de substratos provenientes da degradação de lipídios que ocorre durante o amadurecimento (Güçlü e col., 1989; Rouet-Mayer e col., 1995, Costa e col., 1999; Almeida e col., submetido). Novos estudos deverão ser realizados para confirmar a aceleração do amadurecimento promovida por uma atmosfera hiperoxigenada, utilizando os pigmentos clorofila, β -caroteno e licopeno como marcadores do amadurecimento (Almeida e col., submetido).

O mecanismo através do qual proteínas dissipadoras de energia diminuem a geração mitocondrial de EAOs ainda não é totalmente claro. Os resultados aqui apresentados (Figuras 15 e 16) indicam claramente que a diminuição do potencial transmembrânico pela PUMP em mitocôndrias de batatas inibe a geração de EAOs, como já demonstrado para a UCP2 e para a oxidase alternativa (Popov e col., 1997; Nègre-Salvayre e col., 1997). Atualmente, acredita-se que o aumento na velocidade da respiração mitocondrial promovido por estas proteínas resulte num tempo de vida menor da forma semiquinona da coenzima Q, reduzindo a probabilidade de formação do ânion superóxido através da transferência de elétrons destas formas semiquinonas para o oxigênio molecular (Skulachev, 1999).

Desta forma, a promoção de um desacoplamento controlado (“mild uncoupling”) por quaisquer dos mecanismos dissipadores de energia existentes (proteínas desacopladoras e oxidase alternativa) diminui significativamente a geração mitocondrial de EAOs, podendo agir como reguladores desta produção ou como protetores em casos de desbalanço nos sistemas oxidante e antioxidante (estresse oxidativo)(Skulachev, 1997).



6. CONCLUSÕES

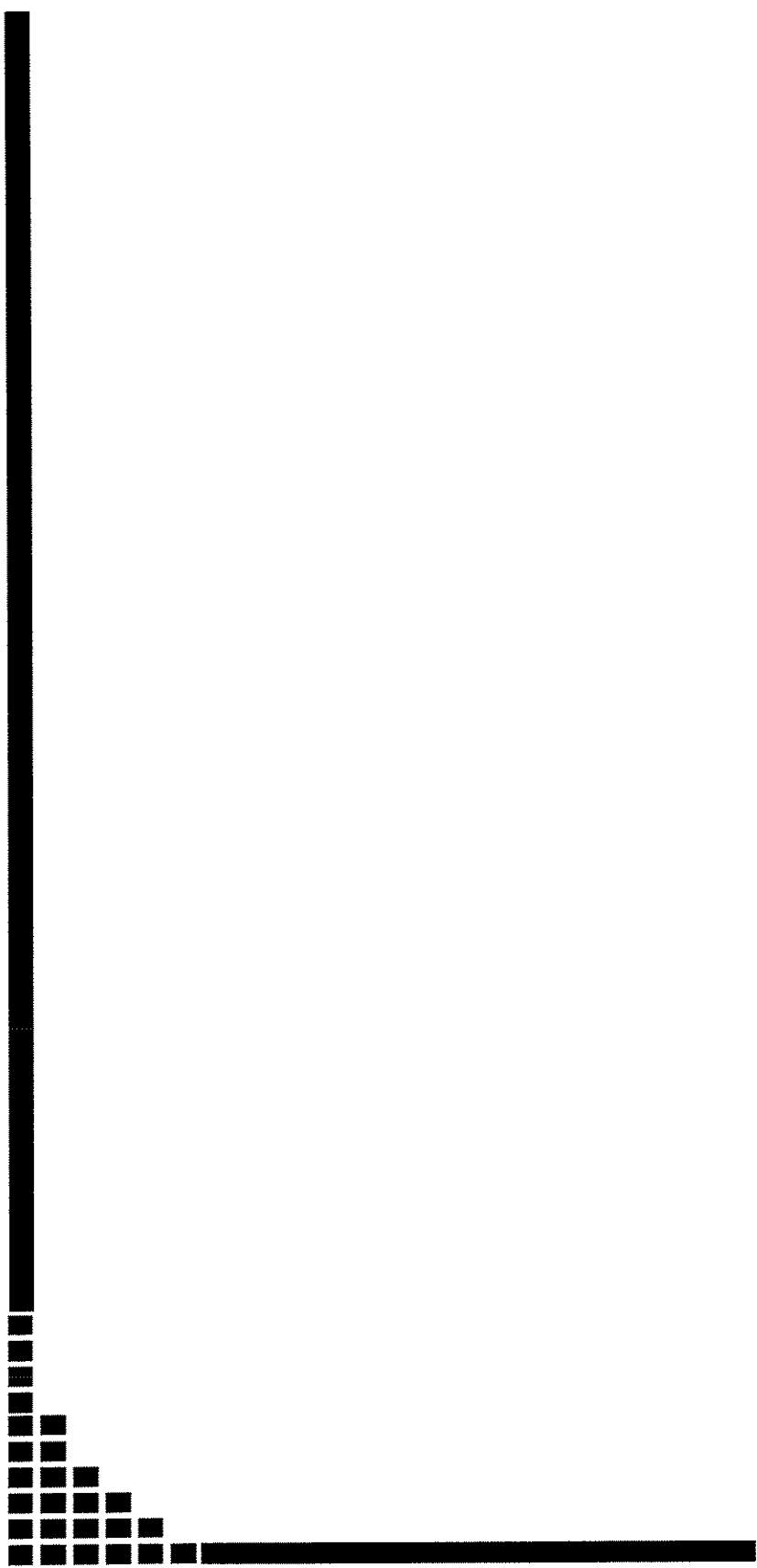
Há alguns anos, evidências têm sido acumuladas relacionando estresses abióticos, como excesso de sais, extremos de temperatura, injúrias mecânicas e radiações a situações de estresse oxidativo. Este estresse gerado provoca diversas alterações no metabolismo celular, sendo a peroxidação lipídica um dos mais evidentes resultados. Coleóptiles de milho submetidos a estresse salino e baixas temperaturas mostram aumento no conteúdo de lipídios oxidados, confirmando a produção de uma situação de estresse oxidativo. Interessantemente, a expressão do mRNA proteína desacopladora mostrou-se aumentado apenas no estresse salino, sugerindo mecanismos de regulação transcricional diferentes para as duas situações. Entretanto, a detecção imunoquímica da proteína mostrou que ocorre aumento da expressão da proteína em ambas as situações. Este dado sugere também que existam mecanismos de regulação traducional (ou mesmo pós-traducional), como já demonstrado para a UCP2, além de possíveis reguladores alostéricos, como demonstrado para as UCP1,2 e 3.

O desbalanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes também afeta o crescimento celular, como demonstrado para diversos organismos. Neste sentido, demonstramos que a expressão da proteína desacopladora retarda o crescimento de leveduras mantidas em 28 °C, porém, sob baixas temperaturas, o seu desenvolvimento se iguala ao das leveduras não-transformadas. Acreditamos que, ao permitir o desacoplamento da sua cadeia respiratória, a levedura transformada seja capaz de detoxificar as espécies reativas de oxigênio geradas, impedindo sua ação deletéria no ambiente intracelular. Corroborando esta hipótese, verificamos que a atividade da proteína desacopladora em batatas pode estar relacionada com o controle da geração mitocondrial de EAOs. O estímulo da atividade da proteína desacopladora resultou numa diminuição da produção de EAOs, enquanto que a inibição da atividade desacopladora da proteína aumentou esta produção.

Apesar de submetidos a uma atmosfera hiperoxigenada, os níveis de expressão da proteína desacopladora, assim como da atividade da oxidase alternativa, seguiram os padrões já descritos para o amadurecimento de tomates pós-colheita, sugerindo que talvez estas vias não sejam mais capazes de reverter a situação adversa produzida pelo estresse abiótico de uma atmosfera hiperoxigenada. Entretanto, experimentos preliminares mostram

que ocorre lipoperoxidação durante o amadurecimento promovido pela atmosfera hiperoxigenada, indicando que a falta de aumento da atividade da oxidase alternativa se deve ao aumento da concentração de ácidos graxos livres, inibidores desta enzima e ativadores das proteínas desacopladoras.

Por fim, os experimentos de reconstituição demonstram inequivocamente que o produto de expressão do gene *AtPUMP1* é uma proteína desacopladora, com características bioquímicas semelhantes às já descritas para a proteína desacopladora clássica (UCP1), assim como para outras proteínas desacopladoras, como as UCP2 e 3 e a *StPUMP*, presente em batatas.



***7. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E., Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A and Struhl, K. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, 3rd edition, John Wiley & Sons Inc., New York

Affourtit, C.; Albury, M.S.; Krab, K.; e Moore, A.L. (1999). Functional expression of the plant alternative oxidase affects growth of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*, 274:6212 - 6218

Akerman, K.E.O. e Nicholls, D.G. (1983). Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 95: 149 – 201

Allakhverdiev, S.I.; Sakamoto, A.; Nishiyama, Y.; Inaba, M.; e Murata, N. (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol*, 123:1047 – 1056

Almeida, A.M.; Jarmuszkiewicz, W.; Khomsi, H.; Arruda, P.; Vercesi, A.E. and Sluse, F.E. (1999). Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Pl. Phys.*, 119: 1323 – 1329

Almeida, A.M.; Navet, R.; Jarmuszkiewicz, W.; Vercesi, A.E.; Sluse-Goffart, C.M.; Sluse, F.E. (submetido). Redox free-energy dissipation and conservation during tomato fruit ripening on plant of wild type and non-ripening (*nor*) mutant.

Arora, R.; Pitchay, D.S.; e Bearce, B.C. (1998). Water stress – induced heat tolerance in geranium leaf tissues: a possible linkage through stress proteins? *Physiol. Plant*, 103: 24 – 34

Arsenijevic, D.; Onuma, H.; Pecqueur, C.; Raimbault, S. e outros (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 26(4):435-439

Argyropoulos, G., e Harper, M.E. (2002). Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol*, 92:2187 - 2198

Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 355(1402):1419 – 1431

- Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13: 17 – 42
- Bahr, J.T. e Bonner Jr., W.D. (1973a) Cyanide-insensitive respiration I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 248(10): 3441-3445
- Bahr, J.T. e Bonner Jr., W.D. (1973b) Cyanide-insensitive respiration II. Control of the alternate pathway. *J. Biol. Chem.*, 248(10): 3446-3450
- Beavis, A.D. e Vercesi, A.E. (1992) Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.*, 267(5): 3079-3087
- Bergevin, M.; L'Heureux, G.P.; Thompson, J.E. e Willemot, C. (1993). Effect of chilling and subsequent storage at 20 °C on electrolyte leakage and phospholipid fatty acid composition on tomato pericarp. *Physiol. Plant.*, 87: 522 – 527
- Berridge, M.J. (1987). Inositol triphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 159 – 193
- Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.*, 499: 291 – 306
- Bienengraeber, M.; Echtay, K.S.; e Klingenberg, M. (1998). H^+ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry*, 37:3 – 8
- Borsani, O.; Valpuesta, V.; e Botella, M.A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative stress in arabidopsis seedlings. *Pl. Physiol.*, 126: 1024 – 1030
- Boss, O.; Samec, S.; Paoloni-Giacobino, A.; Rossier, C.; Dullo, A.; Seydoux, J.; Muzzin, P. e Giacobino, J-P. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, 408: 39-42
- Boveris, A.; Oshino, N.; Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128: 617 – 630

- Boveris, A.; Martino, E.; Stoppani, A. O. M. (1977). Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems. *Anal. biochem*, 80: 145 - 158
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443 – 448
- Bowler, C. e Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-adaptation. *Trends Plant Sci.*, 5: 241 – 246
- Brand, M.D. (1985A). Electroneutral efflux of Ca^{2+} from liver mitochondria. *Biochem. J.*, 225: 413 – 419
- Brand, M.D. (1985B). The stoichiometry of the exchange catalyzed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter. *Biochem. J.*, 229: 161 – 166
- Brandalise, M., Maia, I.G., Borecky, J. Vercesi, A.E. e Arruda, P. (submetido – 2). Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress.
- Brandalise, M., Maia, I.G., Borecky, J., Vercesi, A.E. e Arruda, P. (submetido). *ZmPUMP*: a novel gene encoding a mitochondrial uncoupling protein in maize.
- Breidenbach, R.W.; Saxton, M.J.; Hansen, L.D.; e Criddle, R.S. (1997). Heat generation and dissipation in plants: can the alternative oxidative phosphorylation pathway serve a thermoregulatory role in plant tissues other than specialized organs? *Plant Physiol.*, 114:1137 – 1140
- Butt, H.J.; Fendler, K.; Bamberg, E.; Tittor, J. e Oesterhelt, D. (1989) Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump. *EMBO J.*, 8: 1657-1663
- Buege, J.A. e Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52: 302 - 310
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6:391 – 397
- Cadenas, E. e Boveris, A. (1980). Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem. J.*, 188: 31 – 37

- Cadenas, E.; Boveris, A.; Ragan, C.I.; e Stoppani, A.O.M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180: 248 – 257
- Caldwell, C.R. (1994). Modification of the cellular heat sensitivity of cucumber by growth under supplemental ultraviolet – B radiation. *Plant Physiol.*, 104: 395 – 399
- Camirand, A.; Marie, V.; Rabelo, R.; e Silva, J.E. (1998). Thiazolidinediones stimulate uncoupling protein-2 expression in cell lines representing white and brown adipose tissues and skeletal muscle. *Endocrinology*, 139(1):428-31
- Camirand, A.; Marie, V.; Rabelo, R.; e Silva, J.E. (1998). Thiazolidinediones stimulate uncoupling protein-2 expression in cell lines representing white and brown adipose tissues and skeletal muscle. *Endocrinology*, 139:428 – 431
- Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 395 – 433
- Carafoli, E. (1989). The plasma membrane calcium pump. In: Cell calcium metabolism, Fiskum, S. (ed), Olenum Press, New Press, Nova York e Londres, pp 21 – 26
- Carafoli, E. (1994). Biogenesis of plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.*, 8: 993 – 1002
- Carmona, M.C.; Valmaseda, A.; Iglesias, R.; Mampel, T.; Vinas, O.; Giralt, M.; Villarroja, F. (1998). 9-cis retinoic acid induces the expression of the uncoupling protein-2 gene in brown adipocytes. *FEBS Lett*, 441(3):447-50
- Castilho, R.F.; Kowaltowski, A.J.; Meinicke, A.R.; e Vercesi AE. (1995). Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca²⁺: effect of coenzyme Q redox state. *Free Radic. Biol. Med.*, 18:55 – 59
- Chandler, P.M. e Robertson, M. (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45: 113 - 141

- Chevillotte, E.; Rieusset, J.; Roques, M.; Desage, M.; e Vidal, H. (2001). The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by omega-6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells involves multiple pathways, including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta. *J Biol Chem*, 276(14):10853-60
- Clarkson, A.B.; Bienen, E.J.; Pollakis, G.; e Grady, R.J. (1989) Respiration of blood-stream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J. Biol. Chem.*, 264: 17770 – 17776
- Costa, A.D.T.; Nantes, I.L., Ježek, P., Leite, A., Arruda, P. e Vercesi, A.E. (1999a). Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31(5): 523-527
- Crompton, M.; Capano, M.; e Carafoli, E. (1976). The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. *Eur. J. Biochem.*, 69: 453 – 462
- Cruz-Hernández, A. e Gómez-Lim, M.A. (1995). Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L..) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta*, 197: 569 – 576
- Day, D. e Wiskich, J.T. (1995) Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27: 379-386
- Day, D.; Arron, G. e Laties, G. (1980) Nature an Control of Respiratory Pathways in Plants: The Interaction of Cyanide-Resistant Respiration with the Cyanide-Sensitive Pathway. In The Biochemistry of Plants, Vol 2, pp. 197-241, Academic Press Inc., New York
- Decker, M. e Tanner, W. (1975) Rapid release of free fatty acids during cell breakage and their effects on a sugar-proton cotransport system in *Chlorella vulgaris*. *FEBS Lett.*, 60: 346 - 348
- Desikan, R.; A-H-Mackerness, S.; Hancock, J.T.; e Neill, S.J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, 127:159 – 172
- Diolez, P. e Moreau, F. (1995). Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 806: 56 – 63

- Douce, R.; Bourguinhon, J.; Brouquisse, R.; e Neuburger, M. (1987). Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Methods Enzymol.*, 148: 403 – 417
- Drøbak, B.K. e Watkins, P.A.C. (2000) Inositol(1,4,5)triphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Lett.*, 481: 240 – 244
- Dulloo, A.G. e Samec, S. (2000). Uncoupling Proteins: do they have a role in body weight regulation? *News Physiol Sci*, 15:313-318
- Dunning, C.A.; Chalker-Scott, L.; e Scott, J.D. (1994). Exposure to ultraviolet – B radiation increases cold hardiness in Rhododendron. *Physiol. Plant.*, 92: 516 – 520
- Duque, P. e Arrabaça, J.D. (1999). Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit II. Alternative oxidase is induced at the climateric (1999). *Physiol. Plant.*, 107: 24 – 31
- Dure, L. 3rd (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.*, 3, 363 - 369
- Echtay, K.S.; Winkler, E.; Frischmuth, K.; e Klingenberg, M. (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1416-21
- Echtay, K.S.; Winkler, E.; e Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, 408(6812):609 – 613
- El-Moualij, B.; Duyckaerts, C.; Lamotte-Brasseur, J.; e Sluse, F.E. (1997). Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13: 573 – 581
- Elthon, T.E.; Nickels, R.L.; e McIntosh, L.. (1989) Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum guttatum* (Schott.). *Planta*, 180: 82 – 89
- Faggioni, R.; Shigenaga, J.; Moser, A.; Feingold, K.R.; e Grunfeld, C. (1998). Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 244(1):75-8

- Fiermonte, G.; Walker, J.E.; e Palmieri, F. (1993). Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem. J.*, 294 :293 – 299
- Fiskum, G. e Lehninger, A.L. (1979). Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ antiporter. *J. Biol. Chem.*, 254: 6236 - 6239
- Fleury, C.; Neverova, M.; Collins, S.; Raimbault, S.; Champigny, O.; Levi-Meyrueis, C.; Bouillaud, F.; Seldin, M.F.; Surwit, R.S.; Ricquier, D. e Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature genetics*, 15: 269-272
- Foellmi-Adams, L.A.; Wyse, B.M.; Herron, D.; Nedergaard, J. e Kletzien, R.F. (1996) Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue: synergy between norepinephrine and plio-glitazone, an insulin-sensitizing agent. *Biochem. Pharmacol.*, 52: 693-701
- Foster, D.O. e Frydman, M. (1978) Non-shivering thermogenesis in the rat, 2: measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of calorogenesis induced by norepinephrine. *Can. J. Pharmacol. Physiol.*, 56: 110
- Foyer, C.H.; Lopez-Delgado, H.; Dat, J.F.; e Scott, I.M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.*, 100: 241-254
- Fu, P.; Wilen, R.W.; Roertson, A.J.; Low, N.H.; Tyler, R.T.; e Gusta, L.V. (1998). Heat tolerance of cold-acclimated Puma winter rye seedlings and the effect of a heat shock on freezing tolerance. *Plant Cell Physiol.*, 39: 942 – 949
- Galliard, T. (1980). Degradation of acyl lipids: hydrolytic and oxidative enzymes. In The Biochemistry of Plants (vol.4), Stumpf, P.K. (ed.), Academic Press Inc, New York, pp 85-116
- Gardestrom, P. e Lernmark, U. (1995) The contribution of mitochondria to energetic metabolism in photosynthetic cells. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27: 415-421
- Garlid, K.D.; Jaburek, M.; Ježek, P.; e Varecha, M. (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta*, 1459(2-3): 383-9

- Garlid, K.D. (1978). Unmasking the mitochondria K^+/H^+ exchanger: swelling – induced K^+ -loss. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 83: 1450 – 1455
- Garlid, K.D.; Orosz, D.E.; Modrianský, M.; Vassanelli, S. e Ježek, P. (1996) On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem*, 269:2615-2620
- Garlid, K.D; Jaburek, M. and Ježek, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Letters*, 438: 10 – 14
- Genevois, M.L. (1929) Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens. *Rev. Gen. Bot.*, 41: 252 – 271
- Gietz, R.D.; Schiestl, R.H.; Willems, A.R.; e Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11:355 – 360
- Gong, D-W.; He, Y.; Karas, M. e Reitman, M. (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β_3 -adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem*, 272: 24129-24132
- Gong, M.; Chen, B.; Li, Z.; e Gou, L. (2001). Heat shock – induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H_2O_2 . *J. Plant Physiol.*, 158: 1125 – 1130
- Grijalba, M.T.; Vercesi, A.E.; e Schreier, S. (1999). Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry*, 38:13279 – 13287
- Groover, S.D. e Laties, G.G. (1978). Characterization of the binding properties of disulfiram, na inhibitor of cyanide – resistant respiration. In: Plant Mitochondria, Ducet, G. e Lance, C. (eds), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 259 - 266
- Güçlü, J.; Paulin, A.; e Soudain, P. (1989). Changes in polar lipids during ripening and senescence of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum*): relation to climateric and ethylene increases. *Physiol. Plant.*, 77: 413 – 419

- Guan, L.; Zhao, J.; e Scandalios, J.G. (2000). *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signalling molecule for the response. *Plant J.*, 22: 87 – 95
- Gueta-Dahan, Y.; Yaniv, Z.; Zilinskas, B.A.; e Ben-Hayyim, G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta*, 203: 460 – 469
- Gunter, K.K. e Gunter, T.E. (1994). Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 26(5):471-85
- Gunter, T.E. e Pfeiffer, D.R. (1990). Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.*, 258: C755 – 786
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186:1 – 85
- Hamilton III, E.W. e Heckathorn, S.A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Pl. Physiol.*, 126: 1266 – 1274
- Hanák, P. e Ježek, P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett*, 495(3):137-41
- Hansford, R.G. (1985). Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev. Phys. Biochem. Pharm.*, 102: 1 – 72
- Hinz, W.; Faller, B.; Gruninger, S.; Gazzotti, P.; e Chiesi, M. (1999). Recombinant human uncoupling protein-3 increases thermogenesis in yeast cells. *FEBS Lett.*, 448:57 – 61
- Hoek, J.B. e Rydstrom, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J*, 254(1):1-10
- Holden, M.J. e Sze, H. (1989). Effects of helminthosporium-maydis race T-toxin on electron transport in susceptible corn mitochondria and prevention of toxin actions by dicyclohexylcarbodiimide. *Pl. Physiol.*, 89: 1296 – 1302
- Huq, S. e Palmer, J.M. (1978) Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett.*, 95: 217 – 220

- Imai, R.; Chang, L.; Ohta, A.; Bray, E.A.; e Takagi, M. (1996). A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170:243 – 248
- Ito, K. (1999). Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Pl. Sci.*, 149(2): 167-173
- Jabůrek, M.; Varecha, M.; Gimeno, R.E.; Dembski, M.; Ježek, P.; Zhang, M.; Burn, P.; Tartaglia, L.A.; e Garlid, K.D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial proteins 2 and 3. *J.Biol. Chem.*, 274(37): 26003 – 26007
- Jabůrek, M.; Varecha, M.; Ježek, P. and Garlid, K. (2001). Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. *J. Biol. Chem.*, 276: 31897 – 31905
- Jabůrek, M.; Yarov-Yarovoy, V.; Paucek, P.; e Garlid, K.D. (1998). State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecane. *J. Biol. Chem.*, 273: 13578 – 13582
- Jain, M.; Mathur, G.; Koul, S.; e Sarin, N.B. (2001). Ameliorative effects of proline on salt stress – induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.*, 20: 463 – 468
- Jansky, L. (1995). Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol Rev*, 75(2):237-59
- Jarmuskiewicz, W.; Wagner, A.N.; Wagner, J.M.; e Hryniewiecka, L. (1997) Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.*, 411: 110 – 114
- Jarmuszkiewicz, W.; Sluse-Goffart, C.M.; Hryniewiecka, L.; e Sluse, F.E. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* *J Biol Chem*, 274(33):23198-202
- Jarmuszkiewicz, W.; Almeida, A.M.; Vercesi, A.E.; Sluse, F.E.; e Sluse-Goffart, C.M. (2000). Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 275:13315 – 13320

- Jarmuszkiewicz, W.; Milani, G.; Fortes, F.; Schreiber, A.Z.; Sluse, F.E.; e Vercesi, A.E. (1999b). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett.*, 467:145 – 149
- Javier, P.D.; Jose, I.J.; e Manuel, S.D. (1997). Chilling of drought-hardened and non-hardened plants of different chilling-sensitive maize lines – changes in water relations and ABA content. *Plant Sci.*, 122: 71 –79
- Jekabsons, M.B.; Gregoire, F.M.; Schonfeld-Warden, N.A.; Warden, C.H.; e Horwitz, B.A. (1999). T(3) stimulates resting metabolism and UCP-2 and UCP-3 mRNA but not nonphosphorylating mitochondrial respiration in mice. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 1):E380-9
- Ježek, P.; Bauer, M.; e Trommer, W.E. (1995). EPR spectroscopy of 5-DOXYL-stearic acid bound to the mitochondrial uncoupling protein reveals its competitive displacement by alkylsulfonates in the channel and allosteric displacement by ATP. *FEBS Lett.*, 361(2-3):303-307
- Ježek, P.; Borecký, J.; Zácková, M.; Costa A.D.T. e Arruda, P. (2001). Possible basic and specific functions of plant uncoupling proteins (pUCP). *Biosci. Rep.*, .21: 237 – 245
- Ježek, P.; Costa, A.D.T.; e Vercesi, A.E. (1996). Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *J Biol Chem*, 271(51):32743-8
- Ježek, P.; Costa, A.D.T.; e Vercesi, A.E. (1997a). Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. *J Biol Chem*, 272(39):24272-24278
- Ježek, P.; Costa, A.D.T.; e Vercesi AE. (2000b). Important amino acid residues of potato plant uncoupling protein (StUCP). *Braz J Med Biol Res*, 33(12):1413-20
- Ježek, P. e Urbánková, E. (2000). Specific sequence of motifs of mitochondrial uncoupling proteins. *IUBMB Life*, 49(1):63-70
- Ježek, P.; Modriansky, M.; e Garlid, K.D. (1997b) A structure activity study of fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling protein. *FEBS Lett.*, 408:166-170
- Ježek, P.; Modriansky, M.; e Garlid, K.D. (1997c) Inactive fatty acids are unable to flip flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett.*, 408: 161-165, 1997

- Ježek, P.; Orosz, D.E.; Modriansky, M.; e Garlid, K.D. (1994). Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J. Biol. Chem.*, 269:26184 – 26190
- Ježek, P.; Zackova, M.; Kosarova, J.; Rodriguez, E.T.S.; Madeira, V.M.C. e Vicente, J.Á.F. (2000a) Occurrence of plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) in diverse organs and tissues of severa plants. *J. Bionerg. Biomembr.*, 32: 423-436
- Ježek, P.; Zackova, M.; Rehakova, Z.; Ruzicka, M.; Borecký, J.; Skobisova, E.; Brucknerova, J.; Garlid., K.D.; Gimeno., R.E.; e Tartaglia, L.A. (1999a) Existence of uncoupling protein-2 antigen in isolated mitochondria from various tissues. *FEBS Lett.*, 455: 79 – 82
- Ježek, P; Orosz, D.E. e Garlid, K. (1990) Reconstitution of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Demonstration of GDP-sensitive halide anion uniport. *J. Biol. Chem.*, 265: 19296-19302
- Ježek,P.; Engstova, H.; Zackova, M.; Vercesi, A.E.; Costa, A.D.T.; Arruda, P. and Garlid, K.D. (1998). Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1365: 319 – 327
- Jiang, M. e Zhang, J. (2001). Effects of abscisic acid on active oxygen species, antioxidante defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 42: 1265 – 1273
- Kadenbach, B.; Huttemann, M.; Arnold, S.; Lee, I.; e Bender, E. (2000). Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic. Biol. Med.*, 29:211 – 221
- Kadyrzhanova, D.K.; Vlachonasios, K.E.; Ververidis, P.; e Dilley, D.R. (1998) Molecular cloning of a novel heat-induced/chilling-tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Mol. Biol.*, 36: 885 – 895
- Kaminaka, H.; Morita, S.; Tokumoto, M.; Masumura, T.; e Tanaka, K. (1999). Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic. Res.*, Suppl:S219 – 225

- Kamp, F. e Hamilton, J.A. (1993) Movement of fatty acids, fatty acids analogues and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 32: 11074-11086
- Katiyar, S.S. e Shrago, E. (1989) Reconstitution of purified brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein: Demonstration of separate identity of nucleotide binding and proton translocation sites by chemical probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2559-2562
- Klaus, S.; Ely, M.; Encke, D. e Heldmaier, G. (1995) Functional assessment of white and brown adipocyte and energy metabolism in cell culture. Dissociation of terminal differentiation and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Cell Sci.*, 108: 3171-3180
- Klingenberg, M. (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *TIBS*, 15:108-112
- Klingenberg, M. and Huang, S. (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 1415: 271 – 296
- Klingenberg, M.; e Winkler, E. (1986). Reconstitution of an H⁺ translocator, the "uncoupling protein" from brown adipose tissue mitochondria, in phospholipid vesicles. *Methods Enzymol.*, 127:772 – 779
- Klingenberg, M.; Winkler, E.; e Echtay, K. (2001). Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation. *Biochem Soc Trans.*, 29:806 – 811
- Kowaltowski, A.J. e Vercesi, A.E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 26:463 – 471
- Kowaltowski, A.J.; Costa, A.D.T. e Vercesi, A.E. (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letters*, 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 – 57
- Krab, K. (1995) Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative oxidase in plant respiration. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27: 387-396

- Kuznetsov, V.V.; Rakutin, V.Y.; Borisova, N.N.; e Rotschupkin, B.V. (1993). Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? *Plant Physiol. Biochem.*, 31: 181 – 188
- Kuznetsov, V.V.; Rakutin, V.Y.; Zholkevich, V.N. (1999) Effect of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. *Plant. Physiol.*, 107: 399 – 406
- Laloi, M.; Klein, M.; Riesmeier, J.W.; Müller-Röber, B.; Fleury, C.; Bouillaud, F. e Ricquier, D. (1997) A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature*, 389: 135-136
- Lambers, H. (1980) The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cell Environ.*, 3: 293-302
- Lambowitz, A.M.; Sabourin, J.R.; Bertrand, H.; Nickels, R.; e McIntosh, L. (1989). Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol. Cell Biol.*, 9: 1362 – 1364
- Leite, H.F. (1992) "Caracterização de uma proteína de 35 KDa isolada de mitocôndrias de batata com possível função termogênica". Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas
- Li, W.; Shariat-Madar, Z.; Powers, M.; Sun, X.; Lane, R.D.; e Garlid, K.D. (1992). Reconstitution, identification, purification and immunological characterization of the 110 kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 267: 17983 – 17989
- Livne A e Levin N (1967) Tissue respiration and mitochondrial phosphorylation of NaCl-treated pea seedlings. *Plant Phys.*, 42: 407 – 414
- Locke, R.M.; Rial, E.; Scott, I.D. e Nicholls, D.G. (1982) Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown fat mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 1129: 373
- Maia, I.G. Benedetti, C.E., Leite, A., Turcinelli, S.R., Vercesi, A.E. e Arruda, P. (1998). *AtPUMP*: An Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Letters*, 429: 403 – 406
- Mao, W.; Xing, Y.X.; Zhong, A.; Li, W.; Brush, J.; Sherwood, S.W.; Adams, S.H. and Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Letters*, 443: 326 – 330

- Maxwell, D.P.; Wang, Y.; McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 8271 – 8276
- McCabe, T.C.; Finnegan, P.M.A.; Millar, H.; Day, D.A.; e Whelan, J. (1998). Differential expression of alternative oxidase genes from soybean cotyledons during postgerminative development. *Plant Physiol.*, 118: 675 – 682
- McCormack, J.G. e Denton, R.M. (1986). Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, 11: 258 – 262
- McCormack, J.G.; Halestrap, A.P.; e Denton, R.M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.*, 70: 391 – 425
- Meeuse, B.J.D. (1975). Thermogenic respiration in Aroids. *Ann Rev Plant Physiol.*, 26: 117 – 126
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191: 144 – 148
- Modriansky, M.; Murdza-Inglis, D.L.; Patel, H.V.; Freeman, K.B. e Garlid, K.D. (1997) Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide inhibition. *J. Biol. Chem.*, 272: 24759 – 24762
- Moons, A.; Prinsen, E.; Bauw, G.; e Montagu, M.V. (1997). Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Pl. Cell*, 9: 2243 – 2259
- Moore, A.L., Umbach, A.L. e Siedow, J.N. (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27:367 – 377
- Moynihan, M.R.; Ordentlich, A.; e Raskin, I. (1995). Chilling induced heat evolution in plants. *Plant. Physiol.*, 108: 995 – 999
- Munnik, T. e Meijer, H.J.G. (2001). Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Lett.*, 498: 172 – 178

- Murayama, S. e Handa, H. (2000). Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature. *Mol Gen Genet*, 264(1-2):112-8
- Nambara, E.; Kawaide, H.; Kamiya, Y.; e Naito S. (1998). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant Cell Physiol.*, 39:853 – 858
- Nantes, I.L.; Fagian, M.M.; Catisti, R.; Arruda, P.; Maia, I.G.; e Vercesi, A.E. (1999). Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.*, 457:103 – 106
- Nègre-Salvayre, A.; Hirtz, C.; Carrera, G.; Cazenave, R.; Troly, M.; Salvayre, R.; Penicaud, L.; e Casteilla L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.*, 11:809 – 815
- Neumann, D.; Lichtenberger, O.; Tschiersh, K.; e Nover, L. (1994). Heat shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*, 194: 360 – 367
- Nicholls, D. G. e Ferguson, S. J. (1982) Bioenergetics 2. *Academic Press Inc.* London, UK
- Nicholls, D.G. (1974) Hamster Brown-Adipose-Tissue Mitochondria: The chloride permeability of the inner membrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. *Eur. J. Biochem.*, 49: 585-593
- Nicholls, D.G. (1976) Brown adipose tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.*, 62: 223-228
- Nicholls, D.G. (1978). Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem. J.*, 170: 511 – 522
- Nicholls, D.G. (1979) Brown adipose tissue mitochondria. *Biochem. Bioph. Acta*, 549: 1-29

- Nicholls, D.G. e Berson, V.S.M. (1977) Inner relationships between proton electronchemical gradient, adenine-nucleotide phosphorylation potencial and respiration, during substrate-level phosphorilation by mitochondria from brown adipose tissue of cold-adapted guinea-pigs. *Eur. J. Biochem.*, 75: 601
- Nicholls, D.G. e Lindberg, O. (1973) Brown-Adipose Tissue Mitochondria: The influence of albumin and nucleotides on passive ion permeabilities. *Eur. J. Biochem.*, 37: 523-530
- Nicholls, D.G. e Locke, R.M. (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.*, 64: 1-64
- Noctor, G. e Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249 – 279
- Nuccio, M.L.; Rhodes, D.; McNeil, S.D.; e Hanson, A.D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:128 – 134
- Orosz, D.E. e Garlid, K.D. (1993). A sensitive new fluorescence assay for measuring proton transport across liposomal membranes. *Anal. Biochem.*, 210: 7 - 15
- Pardo, J.M.; Reddy, M.P.; Yang, S.; e outros. (1998). Stress signalling through Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9681 – 9686
- Pastore, D.; Stoppelli, M.C.; di Fonzo, N.; e Passarella, S. (1999). The existence of the K^{+} channel in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 274: 26683 – 26690
- Paucek, P.; Mironova, G.; Mahdi, F.; Beavis, A.D., Woldegiorgis, G.; e Garlid, K.D. (1992). 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
- Pecqueur, C.; Alves-Guerra, M.C.; Gelly, C.; Levi-Meyrueis, C.; Couplan, E.; Collins, S.; Ricquier, D.; Bouillaud, F.; e Miroux, B. (2000). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*, 275(12):8705 – 8712

- Peña-Cortés, H.; Sanchez-Serrano, J.; Mertens, R., Willmitzer, L. e Prat, S. (1989). Abscissic acid is involved in the wounding-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86: 9851 – 9855
- Polidoros, A.N. e Scandalion, J.G. (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.*, 106: 112 - 120
- Popov, V.N.; Simonian, R.A.; Skulachev, V.P.; e Starkov, A.A. (1997). Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett*, 415(1):87 – 90
- Popov, VN, Purvis, A.C., Skulachev, VP e Wagner, A.M. (submetido) Stress-induced changes in ubiquinone concentration and alternative oxidase in plant mitochondria.
- Prasad, T.K. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J*, 10(6): 1017 – 102
- Prasad, T.K.; Anderson, M.D.; Martin, B.A.; e Stewart, C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6: 65 – 74
- Puigserver, P.; Vazquez, F.; Bonet, M.L.; Pico, C. e Palon, A. (1996) *In vitro* e *in vivo* induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem. J.*, 37: 827-833
- Rao, M.V.; Paliyath, G.; Ormrod, D.P.; Murr, D.P.; e Watkins, C.B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol.*, 115:137 – 149
- Reeves, J.P. e Hale, C.C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium – calcium exchange system. *J. Biol. Chem.*, 259: 7733 – 7739
- Rehnmarm, S., Bianco, A.C., Kieffer, J.D., Silva, J.E. (1992) Transcriptional and post-transcriptional mechanisms in the uncoupling protein mRNA response to cold. *Am. J. Physiol.*, 262: E58-E67

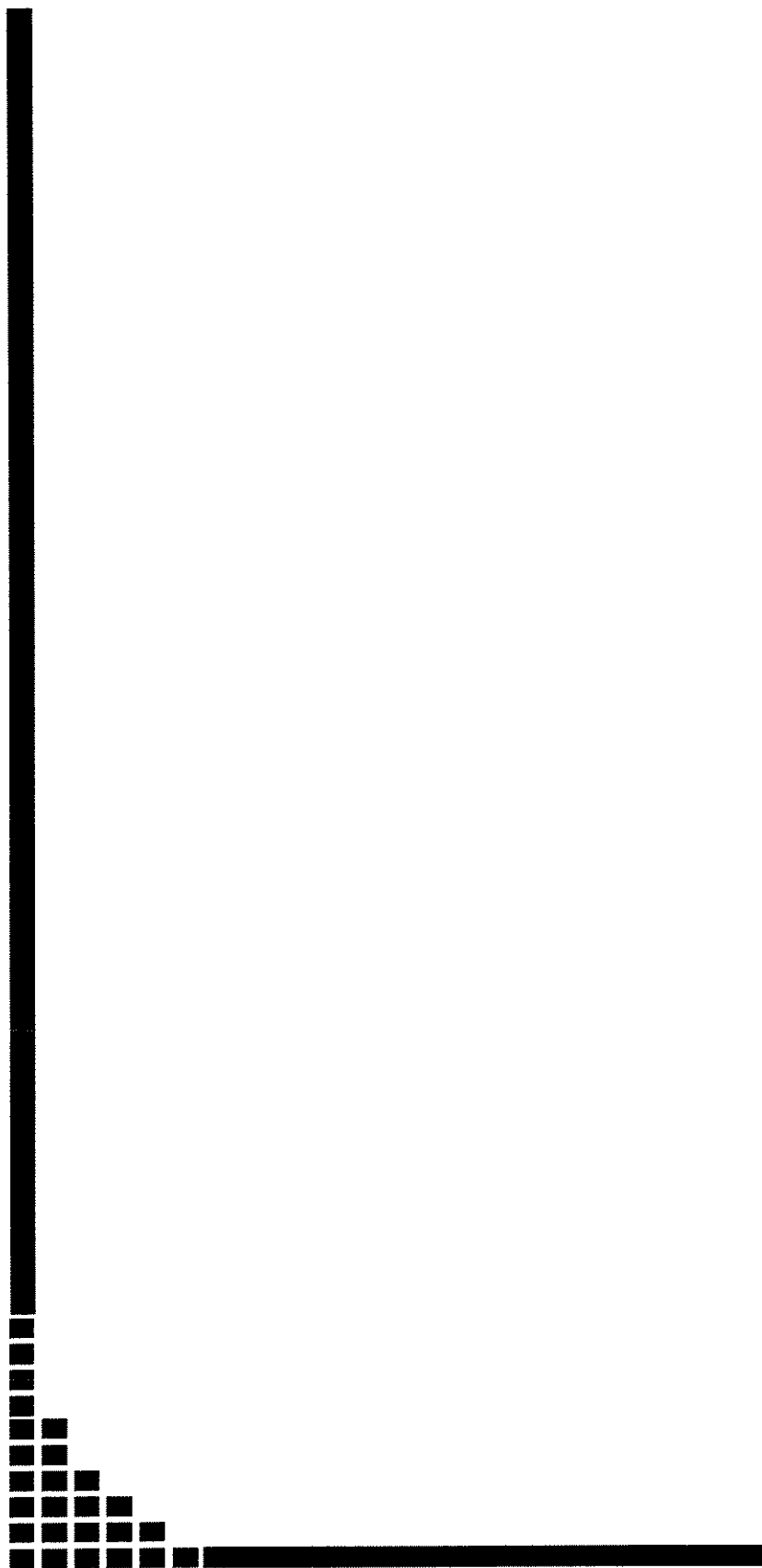
- Rial, E. e Gonzalez-Barroso, M.M. (2001). Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta*, 1504(1):70-81
- Rial, E. e Nicholls, D.G. (1984) The mitochondrial uncoupling protein from brown adipose tissue: uncoupling of oxidative phosphorylation by long chain fatty acids and recoupling by guanosine triphosphate. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350: 1211
- Rial, E.; Gonzalez-Barroso, M.M.; Fleury, C. and Bouillaud, F. (1998) The structure and function of the brown fat uncoupling protein UCP1: current status. *BioFactors*, 8: 209
- Rich, P.R. (1978) Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilization and partial purification of the alternative oxidase. *FEBS Lett.*, 96: 252 – 256
- Rottemberg, H. e Scarpa, A. (1974). Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry*, 13: 4811 – 4817
- Rouet-Mayer, M.A.; Valentova, O.; Simond-Cote, E.; Daussant, J.; e Thevenot, C. (1995). Critical analysis of phospholipid hydrolyzing activities in ripening tomato fruits. Study by spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography. *Lipids*, 30:739 – 746
- Roxas, V.P.; Lodhi, S.A.; Garret, D.K.; Mahan, J.R.; e Allen, R.D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.*, 41: 1229 – 1234
- Ruzicka, M.; Novak, P.; Zackova, M.; Costa, A.D.T.; Vercesi, A.E.; e Ježek, P. (1999). Plant Uncoupling Mitochondrial Protein is the product of *StUCP* gene. *Resumos XXVIII Reunião Anual da SBBq*, poster A-13, Caxambu MG
- Sakajo, S.; Minagawa, N.; Komiyama, T.; e Yoshimoto, A. (1991). 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
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour, NY.

- Sanchis, D.; Fleury, C.; Chomiki, N.; Goubern, M.; Huang, Q.; e outros (1998). 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(51):34611-5
- Schonbaum, G.R., Bonner Jr., W.D., Storey, B.T. and Bahr J.T. (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.*, 47: 124
- Schrauwen, P.; Saris, W.H.M.; e Hesselink, M.K.C. (2001). An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acid inside the mitochondrial matrix. *FASEB J.*, 15: 2497 – 2502
- Serrano, R.; Mulet, J.M.; Rios, G.; e outros. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.*, 50: 1023 – 1036
- Seymour, R.S. (1997). Plants that warm themselves. *Sci. Am.*, 276(3): 104-109
- Siedow, J.N. e Grivin, M.E. (1980). Alternative respiratory pathway. Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol.*, 65: 669 – 674
- Siedow, J.N. e Umbach, A. L. (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell*, 7: 821 – 831
- Silva, M.A.P. (1991) "Características do transporte de cálcio, fosfato e prótons em mitocôndrias de plantas". Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas
- Simons, B.H.; Milenaar, F.F.; Mulder, L.; Van Loon, L.C.; e Lambers, H. (1999). Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv.potato. *Plant Physiol.*, 120: 529 – 538
- Skubatz, H.; Williamson, P.A.; Schneider, E.L.; e Meeuse, B.J.D. (1990). Cyanide-insensitive respiration in thermogenic flowers of *Victoria* and *Nelumbo*. *J. Exp. Bot.*, 41: 1335 -1339
- Skulachev, V.P. (1999). Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J Bioenerg Biomembr*, 31(5):431-45

- Skulachev, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 294:158-162
- Skulachev, V.P. (1997) Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosc. Rep.*, 17, 347-366
- Skulachev, V.P. (1999). Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31:431 – 445
- Sluse, F.; Almeida, A.M.; Jarmuszkiewicz, W. and Vercesi, A.E. (1998). Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Letters*, 433: 237 – 240
- Solomos, T. e Laties, G.G. (1976). Induction of ethylene of cyanide-resistant respiration. *Biochem Biophys Res Commun*, 70(2):663-71
- Solomos, T. (1977). Cyanide – resistant respiration in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 28: 279 – 297
- Solomos, T. e Laties, G.G. (1976) Induction by ethylene of cyanide-resistant respiration. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 70(2): 663 - 671
- Somlyo, A.P.; Urbanics, R.; Vadasz, G.; e outros (1985). Mitochondrial calcium and cellular electrolytes in brain cortex from *in situ*: electron probe analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 132: 1071 – 1078
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M. e Brand, M.D. (1999). Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim.Biophys.Acta*, 1413: 50 – 54
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M.; Jekabsons, M.B. e Brand, M.D. (2001). Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 276:18633 - 18639
- Sutton, H.C. e Winterbourn, C.C. (1984). Chelated iron-catalyzed OH. formation from paraquat radicals and H₂O₂: mechanism of formate oxidation. *Arch Biochem Biophys.*, 235:106 – 115

- Takahashi, S.; Katagiri, T.; Hirayama, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; e Shinozaki, K. (2001). Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-triphosphate independent of abscisic acid in Arabidopsis cell culture. *Plant Cell Physiol.*, 42: 214 – 222
- Umbach, A.L. e Siedow, J.N. (1993). Covalent and noncovalent dimers of the cyanide – resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondrial and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.*, 103: 845 – 854
- Uyemura, S.A., Luo, S., Moreno, S.N.J. and Docampo, R. (2000). Oxidative phosphorylation, Ca^{2+} transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 275(13): 9709 – 9715
- Vanlerbergue, G.C.; McIntosh, L. ; e Yip, J.Y.H. (1998) Molecular localization of a redox – modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell*, 10: 1551 – 1560
- Vercesi, A.E. e Hoffmann, M.E. (1993). Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In Methods in Toxicology, Jones, D.P. e Lash, L.H. (eds), vol. 2, cap. 21, Academic Press, Nova York, EUA
- Vercesi, A.E.; Martins, I.S.; Silva, M.A.P.; Leite, H.M.F.; Cuccovia, I.M. e Chaimovich, H. (1995) PUMPing plants. *Nature*, 375:24
- Vianna, C.R.; Hagen, T.; Zhang, C.Y.; Bachman, E.; Boss, O.; e outros (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol Genomics*, 5(3):137-45
- Vidal-Puig, A.; Gemma, S.; Danica, G.; Flier, J.S. e Lowell, B.B. (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 235: 79-82
- Voehringer, D.W.; McConkey, D.J.; McDonnell, T.J.; Brisbay, S.; Meyn, R.E. (1998). Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(6):2956-60

- Walker, B.A.; Pate, J.S.; e Kuo, J. (1983). Nitrogen-fixation by nodulated roots of *Viminaria-Juncea* (SCHRAD AND WENDL) Hoffmans (*Fabaceae*) when subemerged in water. *Austr J Pl Phy*, 10(4-5): 409-421
- Watanabe, A.; Nakazono, M.; Tsutsumi, N.; e Hirai, A. (1999). AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 40(11):1160-6
- Whelan, J. (1996) Hot PUMPing plants? *Nature*, 376: 220
- Wilson, C.; Clark, R.A.; e Nieman, R.H. (1992) Effects of salinity, diurnal cycle and age on nucleotide pools of bean leaves. *J. Exp Bot*, 43: 1009-1014
- Winkler, E. e Klingenberg, M. (1994) Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, 269: 2508-2515
- Zhao, Y.; Aspinall, D.; e Paleg, L.G. (1992). Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *J. Plant Physiol.*, 140: 541 – 543
- Zhou, Y.T.; Shimabukuro, M.; Koyama, K.; Lee, Y.; Wang, M.Y.; Trieu, F.; Newgard, C.B.; e Unger, R.H. (1997). Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(12):6386-90



8. *APÊNDICES*

Reconstituted Plant Uncoupling Mitochondrial Protein Allows for Proton Translocation via Fatty Acid Cycling Mechanism*

(Received for publication, November 8, 1996, and in revised form, May 28, 1997)

Petr Ježek†§, Alexandre D. T. Costa‡||, and Anibal E. Vercesi¶

From the ‡Department of Membrane Transport Biophysics, Institute of Physiology, Academy of Sciences, 14220 Prague 4, Czech Republic and ||Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

Potato and tomato plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) was reconstituted into liposomes, and K^+ or H^+ fluxes associated with fatty acid (FA)-induced ion movement were measured using fluorescent ion indicators potassium binding benzofuraneisophthalate and 6-methoxy-*N*-(3-sulfoethyl)-quinolinium. We suggest that PUMP, like its mammalian counterpart, the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria (Garlid, K. D., Orosz, D. E., Modrianský, M., Vassanelli, S., and Ježek, P. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 2615–2702), allows for H^+ translocation via a FA cycling mechanism.

Reconstituted PUMP translocated anionic linoleic and heptylbenzoic acids, undecanesulfonate, and hexanesulfonate, but not phenylvaleric and abscisic acids or Cl^- . Transport was inhibited by ATP and GDP. Internal acidification of protein-free liposomes by linoleic or heptylbenzoic acid indicated that H^+ translocation occurs by FA flip-flopping across the lipid bilayer. However, addition of valinomycin after FA-initiated GDP-sensitive H^+ efflux solely in proteoliposomes, indicating that influx of anionic FA via PUMP precedes a return of protonated FA carrying H^+ . Phenylvaleric acid, unable to flip-flop, was without effect. Kinetics of FA and undecanesulfonate uniport suggested the existence of an internal anion binding site. Exponential flux-voltage characteristics were also studied. We suggest that regulated uncoupling in plant mitochondria may be important during fruit ripening, senescence, and seed dormancy.

The plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP)¹ was discovered in potato tubers by Vercesi *et al.* (1), who demon-

strated that a fully coupled state can be attained in potato mitochondria only when a purine nucleotide such as ATP is present, and, simultaneously, free fatty acids (FAs) are absent. A hydrophobic, 32-kDa-protein was isolated, similar in all respects to the mammalian uncoupling protein (UcP) of brown adipose tissue mitochondria (1). Thus, as in the brown adipose tissue, the site of mammalian nonshivering thermogenesis, mitochondria from certain plant tissues may contain a protein that allows for regulated uncoupling (2), and consequently for overall regulation of oxidative phosphorylation and heat production (1). In the first reconstitution experiments with PUMP (1), it was shown that its incorporation into liposomes led to H^+ transport that was inhibited by ATP and GTP. In this respect, PUMP was found indistinguishable from the mammalian UcP.

Further studies using potato mitochondria have shown that FAs interact directly with PUMP, since they induce an H^+ -dependent swelling in potassium acetate medium in the presence of valinomycin (2). A purine nucleotide-sensitive transport of hexanesulfonate was also demonstrated. Interestingly, PUMP was not able to conduct significant amounts of pyruvate or Cl^- (2), indicating that it is selective for more hydrophobic unipolar monovalent anions. Taken together, all these results suggest that PUMP and UcP (3–6) might function by the same mechanism. Both proteins facilitate the uniport of amphiphilic anions, including fatty acids. This should lead to uncoupling by the FA-cycling mechanism (7), as suggested by Garlid *et al.* (6) for UcP. This mechanism is based upon a natural ability of protonated FAs to cross the membrane at fast rate (8), and thus carry H^+ . If a membrane protein possesses the ability to mediate uniport of anionic FAs, then they must undergo cycling, alternating between protonated and anionic forms. The overall cycle leads to uncoupling of mitochondria (6).

Evidence for the UcP-mediated FA cycling was provided by the following findings (3–6): (i) nontransportable substrate analogs (*i.e.* anions which are not translocated but which competitively inhibit transport) were never found for UcP (3–6, 9) and, consequently, no external translocation sites can be detected; (ii) UcP transport substrates, such as long-chain alkylsulfonates (which are fully dissociated at neutral pH), are unable to induce an H^+ flux in the proteoliposomes containing UcP (6), but they competitively inhibit the FA-induced H^+ transport (4, 6); (iii) FAs inhibit the Cl^- and alkylsulfonate transport (4–6); and (iv) “inactive FAs,” which are unable to flip-flop across the lipid bilayer but still partition into the membrane, do not induce H^+ transport in the UcP-containing vesicles, do not inhibit Cl^- uniport via the reconstituted UcP, and are not transported by UcP as anions (9).

In this study, we use the reconstituted system to evaluate whether a mechanism of transport similar to that suggested for UcP could also be valid for PUMP. In particular, we investigate, whether PUMP is able to conduct anionic fatty acids.

* This work was supported in part by grants from the Brazilian agencies Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT). Some chemicals were purchased with funds from the Granting Agency of the Czech Republic (Grant 301/95/0620). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Visiting Professor at the Universidade Estadual de Campinas, Brazil, supported by FAPESP. To whom correspondence should be addressed: Institute of Physiology Dept. No. 375, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic. Tel.: 011-420-2-4752285; Fax: 011-420-2-4719517; E-mail: jezek@sun1.biomed.cas.cz.

|| Graduate Student of Molecular Biology, UNIFESP/PEM (Escola Paulista de Medicina), São Paulo, supported by a FAPESP Fellowship.

¹ The abbreviations used are: PUMP, plant uncoupling mitochondrial protein; BSA, bovine serum albumin; FA, fatty acid; MOPS, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid; PBFI, potassium binding benzofuraneisophthalate; SPQ, 6-methoxy-*N*-(3-sulfoethyl)-quinolinium; TEA, tetraethylammonium; TES, (*N*-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethane-sulfonic acid; UcP, uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria; $\Delta\psi$ transmembrane electric potential.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Artificial and natural FAs were from Fluka (Switzerland) or Sigma, undecanesulfonate was from Lancaster (UK), hydroxylapatite from Bio-Rad, PBFI and SPQ were from Molecular Probes. Reconstitution was carried out using materials as described elsewhere (4–6).

PUMP Isolation—Potatoes and tomatoes were obtained in a local market. Mitochondria were isolated by differential centrifugation in a medium of 250 mM sucrose, 10 mM K-MOPS, 1 mM Tris-EGTA, pH 7.4 (10), routinely containing 1% BSA. The acidic tomato homogenate was neutralized immediately by KOH. Extraction was performed by suspending mitochondria (60 mg of protein) in 2.5 ml of 50 mM TEA- SO_4 , 20 mM TEA-TES, pH 7.2 ([TEA] = 6.6 mM), 0.2 mM Tris-EDTA, containing 4.5% octylpentaoxyethylene, while stirring for 30 min at 0 °C. The extract was spun at $100,000 \times g$ for 30 min (Beckman L8-M), and then the supernatant was applied to a spin-column containing 3 g of hydroxylapatite, prewashed with the “elution medium” (30 mM TEA- SO_4 , 5 mM TEA-TES, pH 7.2 ([TES] = 1.66 mM), 0.2 mM Tris-EDTA). The paste was incubated for 45 min at 5 °C and then centrifuged at 2000 rpm for 2 min. A step-wise elution (1 ml per step) (11) yielded the diluted first fraction and three additional fractions containing approximately 0.1 mg of protein/ml. All four fractions contained the 32-kDa PUMP protein.

PUMP Reconstitution—Isolated PUMP and PBFI or SPQ were added to lipid/octylpentaoxyethylene micellar solution, and the detergent was removed using Bio-Beads SM2 (Bio-Rad). The external probe was washed out using Sephadex G-25-300 (11). Transport in proteoliposomes containing one of the fluorescent indicators PBFI (12) or SPQ (13) was detected using a Hitachi model F-4010 fluorometer (Hitachi, Japan). FAs were added directly to the assay medium as microliter aliquots of the stock solutions in ethanol.

PBFI Detection of Anion Uniport—PBFI fluorescence is enhanced by $[\text{K}^+]$ and can be used to monitor the uptake of K^+ that accompanies uptake of anionic FA. Thus, addition of K^+ ionophore valinomycin (1.3 μM) was used to initiate a net charge flux (the influx of FA anion) together with the return of protonated FA in proteoliposomes containing PUMP. In other experiments, the net influx of alkylsulfonates was detected in the same way. Fluorescence records were transformed into “ K^+ traces” using calibration curves (12) constructed by adding KCl stepwise in the presence of 0.2 μM nigericin. The initial rates ($d[\text{K}^+]/dt$) were calculated in $\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$. Vesicle interiors contained 75 mM TEA- SO_4 , 75 mM TEA-TES, pH 7.2, 0.05 mM K_2SO_4 and 300 μM PBFI. Vesicles (25 μl) were added to 1.475 ml of 75 mM K_2SO_4 , 75 mM TEA-TES, pH 7.2, or to mixtures of the external and internal medium to vary the K^+ -diffusion potential. Vesicle volume was estimated as described previously (6).

“SPQ Quenching” Method for Measuring Net H^+ Efflux or Influx—The method is based on the quenching of SPQ fluorescence by the TES[−] anion, but not by neutral TES (13), and was employed to monitor the internal acidification that results from FA’s flipping to the internal lipid leaflet. Alternatively, SPQ served as an indicator of the internal alkalization resulting from the valinomycin-induced uptake of anionic FAs and the concomitant H^+ efflux. Vesicles (25 μl) containing 84.4 mM TEA- SO_4 , 28.9 mM TEA-TES, pH 7.2 ([TEA] = 9.2 mM), and 0.6 mM Tris-EGTA, were added to external medium (1.475 ml) containing 84.4 mM K_2SO_4 , 28.85 mM TEA-TES, pH 7.2, ([TEA] = 9.2 mM), and 0.6 mM Tris-EGTA. PUMP-mediated FA cycling was initiated by adding 1.3 μM valinomycin. Calibration curves were constructed by adding KOH stepwise in the presence of nigericin (6, 13).

Analysis of Flux-Voltage Characteristics—According to the Eyring theory (14, 15), the movement of an ion across a single energetic barrier (a sharp peak) depends exponentially upon the applied voltage. Garlid *et al.* (16) have developed a simplified description of flux-voltage characteristics, which is valid at higher potentials and relates a net ion flux J with the reduced voltage, u

$$J = P \cdot C_1 \cdot e^{\beta u} \quad (\text{Eq. 1})$$

where parameter β describes the degree of nonlinearity and its value reflects the particular energetic barrier model; $u = -zF\Delta\psi/RT$, where the terms have their usual meanings; P is the permeability coefficient, and C_1 is the concentration of species in the membrane/water interface at the *cis*-side. Linearization of Equation 1 yields the simple expression (in the case of an anion with $z = -1$)

$$\ln J = \ln PC_1 + \beta u = \ln PC_1 + \beta F\Delta\psi/RT \quad (\text{Eq. 2})$$

It has been shown that for a single-sharp-peak barrier, $\beta = 0.5$ and this was experimentally found for tetramethylammonium ion perme-

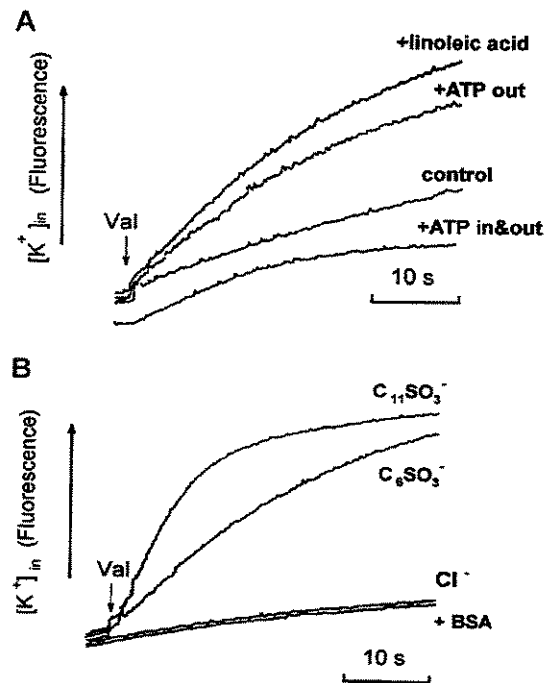


FIG. 1. PBFI detection of fatty acid and alkylsulfonate uniport in proteoliposomes containing PUMP. Traces show increasing PBFI fluorescence with increasing internal $[\text{K}^+]$; hence, they indicate K^+ uptake in the presence of 1.3 μM valinomycin. K^+ entry accompanies the influx of a net negative charge resulting from the influx of FA or alkylsulfonate anion via potato PUMP. A, transport of linoleic acid and its inhibition by ATP. Prior to valinomycin, 40 μM linoleic acid (+linoleic acid) was added, or an equal volume of ethanol alone was added (control), when testing the basal K^+ influx. Addition of 2 mM ATP to the external medium (+ATP out) partially inhibited (by 31%) FA uptake. In a separate preparation of proteoliposomes containing 5 mM Tris-ATP in the lumen, addition of 5 mM Tris-ATP to the medium inhibited FA uptake nearly completely (trace +ATP in&out), so that the magnitude of K^+ influx was reduced almost to the basal value. B, uniport of undecanesulfonate and hexanesulfonate, and lack of Cl^- transport. 100 μM undecanesulfonate ($\text{C}_{11}\text{SO}_3^-$) or 30 mM hexanesulfonate (C_6SO_3^-) was added prior to valinomycin, both as sodium salts. Attempts to register a Cl^- uniport in the presence of 40–150 mM $[\text{Cl}^-]$ (trace Cl^- , TEA-salts) failed. The rates barely reached values of leak obtained in the external assay medium with 0.4% BSA (+BSA). The vesicle interior contained 75 mM TEA- SO_4 , 75 mM TEA-TES, pH 7.2, 0.05 mM K_2SO_4 , and 300 μM PBFI. In a typical assay, vesicles (25 μl) were added to 1.475 ml of 75 mM K_2SO_4 , 75 mM TEA-TES, pH 7.2. Rates were calibrated as described under “Experimental Procedures”.

ation (16) and for SCN^- influx² into liposomes; for the extreme case of a “smoothed multiple barrier,” β approaches 0.16, the value for a rectangular barrier, thus giving nearly linear (ohmic) J - $\Delta\psi$ characteristics. Interestingly, in the case of two sharp barriers with an energy well (an internal binding site) in the middle, this theory predicts that $\beta = 0.25$, and this was indeed found for Cl^- uniport via UCP (17), in which the existence of an internal anion binding site was documented (3–6, 11).

The experimental approach based on creation of a K^+ -diffusion potential in liposomes has a drawback due to a capacitance effect that causes a parasitic K^+ influx at large external $[\text{K}^+]$ and limits flux at low external $[\text{K}^+]$. However, since the same interference is expected in each case, a flux-voltage analysis derived from the experimental data can be valuable for comparing different translocated ions. In addition, this analysis allows one to determine permeability coefficients P , calculated by extrapolating flux-voltage data to zero voltage, where $J_0 = P \cdot C_1$ (in $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1}$) and using theoretical values for surface area (lipid packing 70 $\text{\AA}^2$ per molecule).

RESULTS

Translocation of Alkylsulfonates and Anionic Fatty Acids by PUMP—Purified PUMP from potato (Fig. 1, A and B) and red tomato mitochondria (not shown) reconstituted in lecithin lipo-

² P. Ježek and K. D. Garlid, unpublished data.

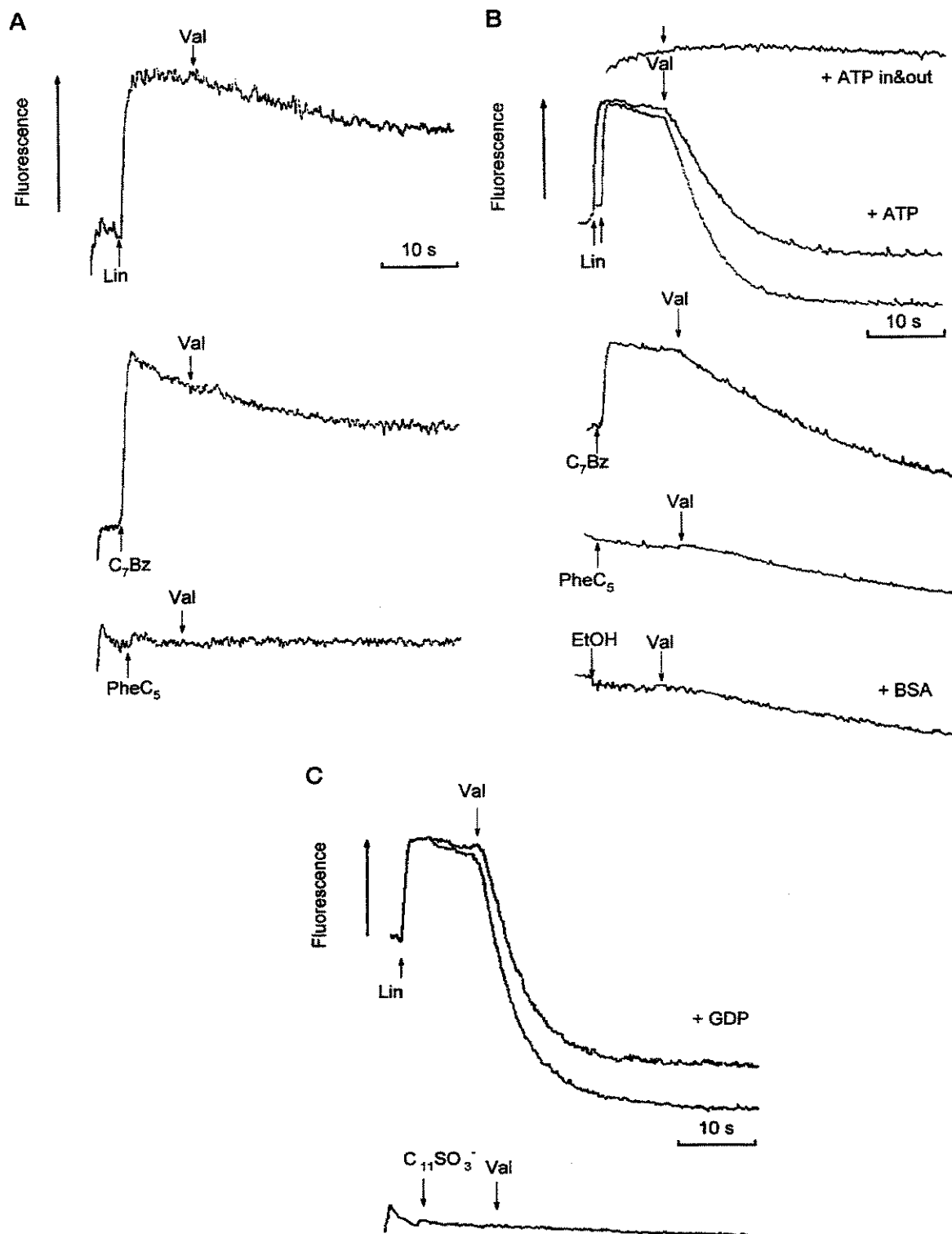


FIG. 2. PUMP-mediated H⁺ efflux as a result of FA cycling. A, acidification of protein-free liposomes upon the addition of linoleic (Lin) or heptylbenzoic (C₇Bz) acid to the external medium is indicated by the increased SPQ fluorescence. The subsequent addition of 1.3 μ M valinomycin (Val) did not cause any further significant acidity changes, despite the existing high K⁺ gradient. This confirms the tightness and low H⁺ permeability of the liposomes. The inability of phenylvaleric acid (PheC₅) to flip-flop across the lipid bilayer is also demonstrated, since the lumen is not acidified. B and C, H⁺ efflux as a result of fatty acid cycling in proteoliposomes containing potato (B) and tomato PUMP (C). H⁺ efflux (internal alkalization), indicated by the decrease in SPQ fluorescence, was induced by 1.3 μ M valinomycin (Val) after addition of 66 μ M linoleic acid (Lin), in the absence of ATP. In the presence of 3.3 mM Na-ATP (B, +ATP) or 4 mM Na-GDP (C, +GDP), the H⁺ efflux was inhibited by 49 and 35%, respectively. Inhibition by external Na-ATP was also tested on a separate preparation of proteoliposomes loaded with 5 mM Na-ATP (top trace, +ATP in&out, initial part not shown), where addition of 5 mM ATP inhibited completely. The fourth trace from the top was measured with 66 μ M heptylbenzoic acid (C₇Bz). The two bottom traces illustrate the inability of phenylvaleric acid (PheC₅) to induce a significant PUMP-mediated H⁺ efflux. The observed slow rate was equal to the basal H⁺ flux in the presence of 0.4% BSA (+BSA). In the latter case, only ethanol (EtOH) was

some containing cardiolipin was able to mediate a net uptake of anionic FAs and alkylsulfonates as indicated by the fluorescent K^+ probe, PBFI. PUMP was able to translocate anionic forms of linoleic acid (Fig. 1A), stearic and heptylbenzoic acid, but not phenylvaleric or abscisic acid (not shown). Undecanesulfonate and, at 10-fold higher concentration, hexanesulfonate were also translocated, but not Cl^- (Fig. 1B). With both potato and tomato PUMP, all these transport activities were inhibited up to 50% by externally added ATP (Fig. 1A) and GDP, indicating that 50% of the PUMP molecules are oriented with the nucleotide binding site outward. In proteoliposomes loaded with 5 mM Tris-ATP, addition of 5 mM ATP to the external medium inhibited by 70%. The remaining flux represented the leak. Consequently, the overall inhibition with ATP present both externally and internally was 80–90% (Fig. 1A).

H^+ Transport in Proteoliposomes Containing PUMP—The SPQ probe, in combination with TES, provides a sensitive system for the measurement of H^+ fluxes. In accordance with Kamp and Hamilton (8) and Garlid *et al.* (6), we show (Fig. 2A) that the addition of linoleic acid to protein-free liposomes causes an internal acidification concomitant to a flipping of FA to the inner lipid leaflet and subsequent dissociation of H^+ into the vesicle interior. When valinomycin is added, no significant H^+ movement occurs (Fig. 2A). This demonstrates an important property of prepared vesicles. They must be tightly sealed, having membranes with a low H^+ permeability. In contrast, when proteoliposomes containing potato (Fig. 2B) or tomato PUMP (Fig. 2C) are used, the addition of valinomycin after FA induces a purine nucleotide-sensitive H^+ efflux. Note that the addition of linoleic acid to the proteoliposomes caused similar acidification of the interior, as it did in liposomes. External ATP inhibited the linoleic acid-induced H^+ efflux by 94%, when proteoliposomes were loaded with 5 mM Na-ATP (Fig. 2B). This accounts for the overall 97% inhibition by external plus internal ATP. The dose-response curve for externally added ATP (not shown) yielded an apparent K_i of 1.5 mM at pH 7.2, a value comparable to the K_i (0.8 mM) for ATP inhibition of H^+ -dependent swelling of potato mitochondria in the presence of FA (2).

The H^+ efflux was induced only by FAs that were able to acidify the liposome interior (Fig. 2B) and were translocated in the anionic form as indicated by the PBFI probe. Besides linoleic acid, this was observed with stearic and heptylbenzoic acid, but not with phenylvaleric or abscisic acid. Although the latter FAs exist in a dissociated form, they were unable to flip-flop in the lipid bilayer, as indicated by the lack of liposome acidification (Fig. 2A). Being unable to flip-flop, they did not promote H^+ efflux (Fig. 2B) or the anion transport activity (see above) in vesicles containing PUMP. As reported before (6), undecanesulfonate was unable to acidify the vesicles' interior, nor did it induce an H^+ efflux after the addition of valinomycin (Fig. 2C).

Kinetics of FA and Alkylsulfonate Transport by PUMP—Using PBFI we evaluated the kinetics of linoleic acid anion uniport. With plain rates (not shown), the K_m derived from the double-reciprocal plot was 45 μM at 135 mV, a value close to K_m obtained by the SPQ technique (43 or 57 μM , cf. below). The V_{max} was 1.16 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$ at 135 mV and 3 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$ at 187 mV. These values correspond to minimum specific activities³ of 35

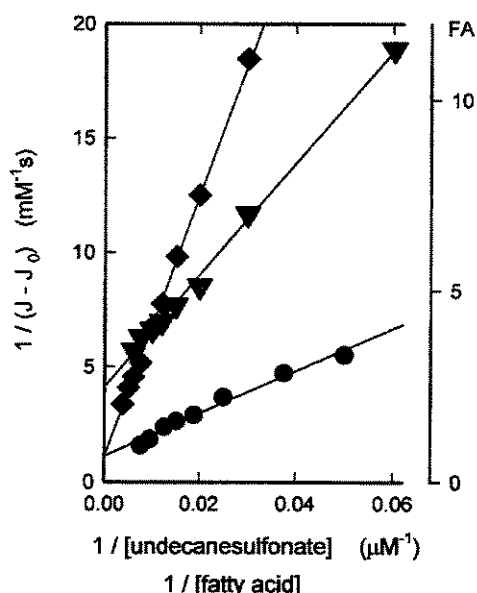


FIG. 3. Kinetics of FA and undecanesulfonate transport mediated by PUMP. Rates of transport (J) were measured using either PBFI (as in Fig. 1) and different concentrations of linoleic acid (●), or undecanesulfonate (▼) or SPQ (as in Fig. 2) and heptylbenzoic acid (◆). Thus, the kinetics of linoleate or undecanesulfonate uniport and heptylbenzoic acid-mediated H^+ efflux was evaluated. K^+ diffusion potentials were set at 135 mV for PBFI using 19.67 mM external $[K^+]$ and 0.1 mM internal $[K^+]$; and 189 mV for SPQ (168 mM external $[K^+]$). Basal rates in the presence of 0.4% BSA (J_0) were subtracted from each measured rate (J); for SPQ they were close to zero. The graph shows double-reciprocal plots, where the right ordinate (FA) is valid for linoleic and heptylbenzoic acid and the left ordinate for undecanesulfonate. Linear regressions using the Marquart algorithm yielded the following kinetic constants: for linoleic acid: $K_m = 83 \mu M$, $V_{max} = 1.49 mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$; for undecanesulfonate: $K_m = 59 \mu M$, $V_{max} = 0.24 mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$; for heptylbenzoic acid: $K_m = 504 \mu M$, $V_{max} = 1.48 mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$.

and 90 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$, respectively. A slightly higher K_m (80–115 μM , Fig. 3) was obtained for linoleic acid when the basal rates obtained in the presence of BSA were subtracted, and in this case V_{max} reached 1.4–1.5 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$ at 135 mV. The kinetics of undecanesulfonate uniport exhibited a lower K_m , 18 μM at 187 mV and 16 μM at 135 mV without corrections, increasing to 64 μM and 59 μM , respectively, with corrections (Fig. 3). In this case the V_{max} values were lower: 0.5–0.6 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$ at 187 mV and 0.24 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$ at 135 mV (15–18 and 7.3 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$, respectively). The kinetics of heptylbenzoic acid-induced H^+ transport (Fig. 3, SPQ detection) exhibited much higher values: a K_m of 504 μM and V_{max} of 1.48 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$, or 44 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$. The lowest apparent affinity for PUMP was found for hexanesulfonate uniport (K_m between 7 and 10 mM and V_{max} of 0.3–0.5 $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ of protein $^{-1}$ at 180 mV).

As a PUMP substrate, undecanesulfonate was also able to inhibit the FA-induced H^+ efflux in proteoliposomes containing PUMP. The inhibitory constant K_i (around 92 μM , Fig. 4) was slightly higher than the K_i for inhibition of Ucp-mediated transport (6). Preincubation with undecanesulfonate was required to obtain reproducible results. The observed inhibition may reflect a competition of undecanesulfonate and linoleate at a hypothetical internal FA binding site of PUMP. One factor

³ Minimum specific activities (rates) were calculated on the assumption that 100% of the added isolated PUMP protein was inserted properly into the membrane.

added prior to valinomycin. In addition, the bottom trace in panel C demonstrates the inability of 66 μM undecanesulfonate ($C_{11}H_{23}SO_3^-$) to acidify the interior of proteoliposomes containing potato PUMP and to induce an H^+ efflux after the addition of valinomycin. Changes in internal pH were indicated by the SPQ probe in combination with TES buffer (13). SPQ is quenched by TES $^-$ anion but not by neutral TES, thus allowing for monitoring of H^+ fluxes in TES-buffered media. Vesicles (25 μl per assay) contained 84.4 mM TEA- SO_4 , 28.85 mM TEA-TES, pH 7.2 ([TEA] 9.2 mM) and 0.6 mM Tris-EGTA. External medium contained 84.4 mM K_2SO_4 , 28.85 mM TEA-TES, pH 7.2 ([TEA] 9.2 mM), and 0.6 mM Tris-EGTA.

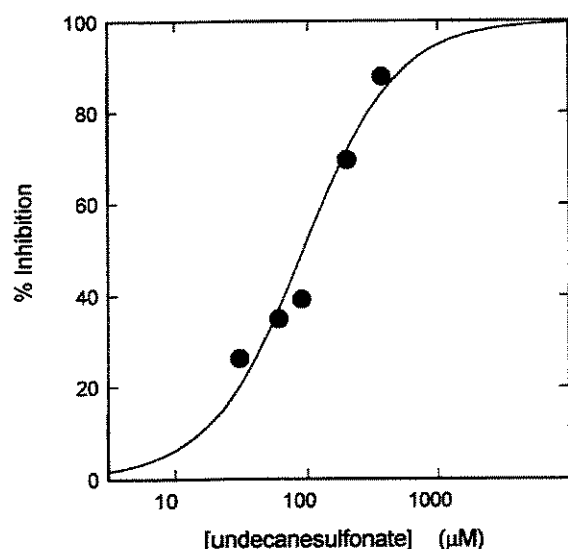


FIG. 4. Dose response for undecanesulfonate inhibition of linoleic acid-induced H^+ efflux in proteoliposomes containing PUMP. Proteoliposomes containing tomato PUMP were preincubated with different concentrations of undecanesulfonate and then diluted to the final concentrations shown on the abscissa and assayed as described in Fig. 2B in the presence of $53 \mu M$ linoleic acid. Data were fit using the Hill equation, yielding a Hill coefficient of 1.2 and an apparent K_i of $92 \mu M$.

that may artificially enhance the inhibition is the negative surface charge that is created by the added alkylsulfonate due to its inability to flip-flop. This charge would not be present with FA alone. Its presence can be inferred from the effect of 100 – $400 \mu M$ undecanesulfonate, which partially suppressed the initial acidification of the proteoliposome interior upon addition of FA. However, since addition of KOH in the presence of nigericin results in alkalization of the vesicle interior even with $366 \mu M$ undecanesulfonate present, it is unlikely that the surface charge effect obstructs inhibitory dose responses. Moreover, the kinetics of H^+ efflux in proteoliposomes containing PUMP measured at various undecanesulfonate concentrations showed a pattern that is typical of specific inhibition (Fig. 5). The scatter of the data did not allow us to determine precisely the nature of the inhibition, but it was possible to fit the data using a model for competitive inhibition (Fig. 5, solid lines), in which K_m increases at constant V_{max} . Thus, K_m increased from $57 \mu M$ in the absence of undecanesulfonate to 90 , 124 , and $182 \mu M$ in the presence of 90 , 200 , and $366 \mu M$ undecanesulfonate, respectively.

Flux-Voltage Characteristics of FA-induced H^+ Transport and Alkylsulfonate Uniport in Proteoliposomes Containing PUMP.—The rates of PUMP-mediated H^+ efflux induced by linoleic (Fig. 6A) and heptylbenzoic acid (not shown) increased exponentially with the applied voltage (K^+ diffusion potential, $\Delta\psi$). An identical exponential dependence was obtained, independently of whether PBFI or SPQ was used (Fig. 6A). Linearization of the flux-voltage characteristics for linoleic acid using Equation 2 (Fig. 6, insets) yielded a slope (β) of 0.85 when the probe was PBFI, 0.75 when the probe was SPQ, and 1 for heptylbenzoic acid (SPQ probe). The rates of undecanesulfonate and hexanesulfonate uniport via PUMP also increased exponentially with $\Delta\psi$ (Fig. 6B), but linearizations yielded lower slopes, 0.35 and 0.36 , respectively.

The H^+ permeability coefficients for proteoliposomes containing PUMP in the presence of linoleic acid were $4.5 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ when PBFI was used and $5.8 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ when SPQ was used. These values are two orders of magnitude higher than the coefficients for the basal H^+ permeability of lipid

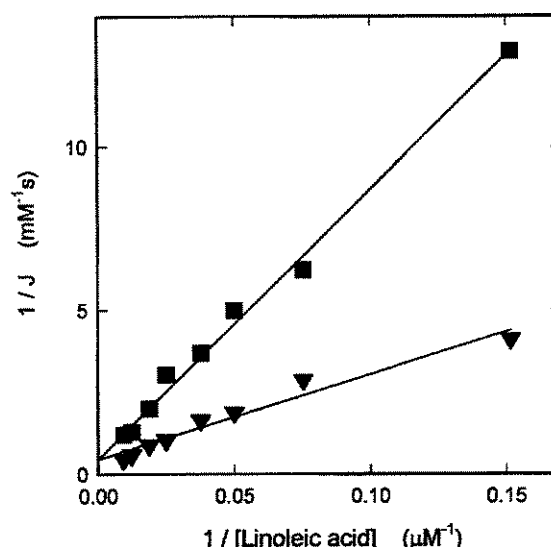


FIG. 5. Undecanesulfonate inhibition of PUMP-mediated, linoleate-induced H^+ efflux. Double-reciprocal plots of the valinomycin-induced H^+ efflux detected with SPQ (see Fig. 2B) were constructed from the uncorrected rates at different concentrations of linoleic acid in the absence (∇) and in the presence of undecanesulfonate ($\blacksquare$) at a final concentration of $366 \mu M$. Samples of proteoliposomes were preincubated with undecanesulfonate (see legend to Fig. 4). Linear regressions using a Marquart algorithm yielded $K_m = 57.3 \mu M$, $V_{max} = 2.19 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ and the $K_m = 182 \mu M$ in the presence of undecanesulfonate.

bilayer measured in liposomes (18). For the transport of alkylsulfonates at zero $\Delta\psi$ permeability coefficients of proteoliposomes were even higher (see legend to Fig. 6B).

DISCUSSION

We have demonstrated the ability of the PUMP to interact with FAs and conduct monovalent unipolar amphiphilic anions, such as alkylsulfonates. The mutual competition between FAs and alkylsulfonates (Figs. 4 and 5) (2) and induction of H^+ transport exclusively with FAs having the ability to flip-flop across the lipid bilayer in a protonated form, suggest that PUMP conducts FA anions and, consequently, allows for FA cycling, which leads to uncoupling (6). PUMP is the third example of an integral membrane protein possessing this ability, besides the mammalian uncoupling protein Ucp (6) and the ADP/ATP carrier (19, 20).

Although discovered recently (1), PUMP is now well characterized functionally. Similarly to the mammalian Ucp, PUMP does not act as an H^+ conductor, but ensures the uniport of fatty acids and long-chain amphiphiles in a process that is inhibited by purine nucleotide di- and triphosphates. However, PUMP exhibits a much lower affinity toward nucleotides than does Ucp (2). Contrary to Ucp, PUMP is unable to conduct small hydrophilic anions such as Cl^- . Indeed, Cl^- flux via PUMP is nearly zero, since no transport was observed even at $150 \text{ mM } Cl^-$ (the rates were equal to the basal rates in the presence of BSA). This may reflect limited access of Cl^- to a hypothetical intramembraneous FA (anion) binding site.

The existence of such a site is suggested by the fact that PUMP exhibits higher affinities for more hydrophobic substrates, linoleate and undecanesulfonate (lower K_m values for their uniport) and lower affinities for less hydrophobic hexanesulfonate and heptylbenzoate (higher K_m values for uniport). Note, for example, that heptylbenzoic acid, as a medium-chain FA, should cross the membrane faster than linoleic acid, as observed in liposomes (Fig. 2A). Its partition coefficient is no lower than that for linoleate, since the extent of acidification of the vesicles' interior upon addition of heptylbenzoic acid is even

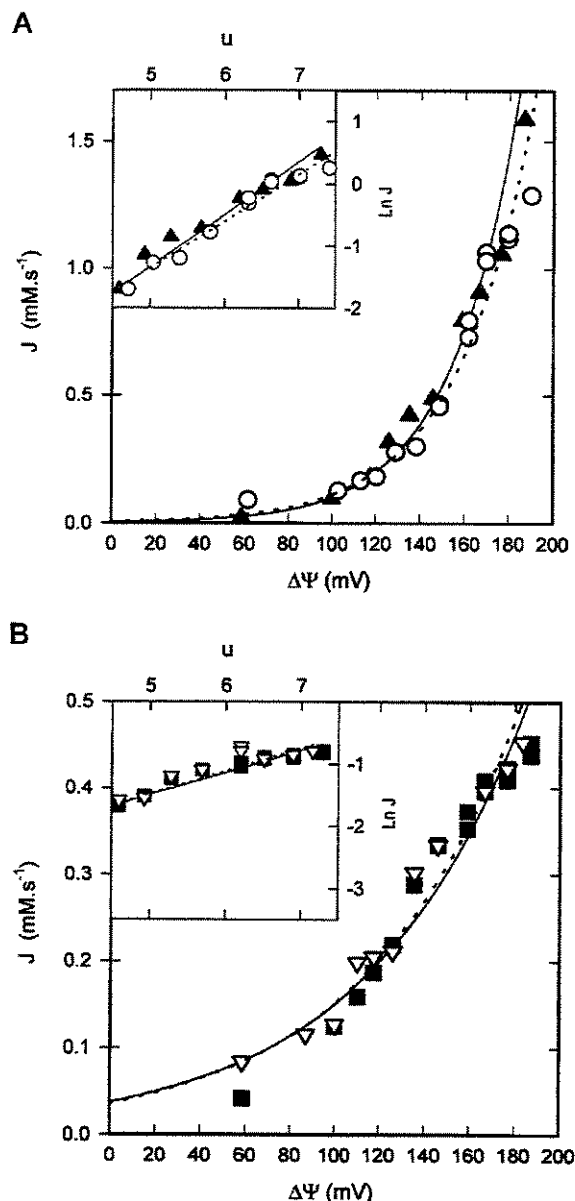


FIG. 6. Flux-voltage characteristics of PUMP-mediated transport. *A*, comparison of PBFI (Δ) and SPQ probes ($\circ$) for detection of net charge uptake and H^+ efflux, respectively, induced by $67 \mu M$ linoleic acid. The uncorrected flux rates J obtained on varying external $[K^+]$ with proteoliposomes containing $0.1 mM$ internal $[K^+]$ are plotted against the K^+ -diffusion potential ($\Delta\Psi$) estimated on the basis of the Nernst equation. The insets show the linearizations according Equation 2 (see "Experimental Procedures"), where $\ln J$ is plotted against reduced voltage u ($u = -zF\Delta\Psi/RT$). Data were fitted above $100 mV$ (where the equation is valid), using a Marquart algorithm. Slopes (β) were 0.85 with PBFI and 0.75 with SPQ, respectively. These fits are also represented as the exponential *solid* and *dotted* line, respectively, on the main graph. The zero potential fluxes J_0^{FA} derived from these plots are 0.0037 and $0.0059 mM \cdot s^{-1}$, respectively. Based on proteoliposome volume ($0.672 \mu L/mg$ lipid in the PBFI assay and $0.547 \mu L/mg$ lipid in the SPQ assay) and the calculated surface areas, the PUMP-related H^+ permeability coefficients are $4.5 \cdot 10^{-2} cm \cdot s^{-1}$ and $5.8 \cdot 10^{-2} cm \cdot s^{-1}$, respectively. *B*, uniport of undecanesulfonate ($\blacksquare$, $50 \mu M$ sodium salt, fit: *solid* line) and hexanesulfonate (∇ , $50 mM$ sodium salt in the presence of 0.4% BSA, fit: *dotted* line) assayed using the PBFI probe. The J - $\Delta\Psi$ data and their linearizations were plotted as described in *A*. Slopes (β) are 0.35 for undecanesulfonate (0.29 , when two data points obtained at low $\Delta\Psi$ are omitted) and 0.36 for hexanesulfonate. The derived zero potential fluxes J_0^{AS} are 0.037 and $0.036 mM \cdot s^{-1}$ which yields permeability coefficients of 0.56 and $0.54 cm \cdot s^{-1}$, respectively (proteoliposome volume was $0.84 \mu L/mg$ lipid).

higher than for linoleic acid (Fig. 2A). Nevertheless, its affinity for PUMP is lower, suggesting that a rate-limiting step is imposed by the PUMP-mediated transport of FA. The existence of the anion binding site of PUMP is also implied by the mutual competition between FAs and alkylsulfonates (Figs. 4 and 5) (2). Such competition has been documented for the mammalian UCP by numerous kinetic (4, 6), binding (21), and photoaffinity-labeling experiments (5, 22).

The FA cycling mechanism for PUMP is suggested by phenomena similar to those found for UCP (6). Thus, both FAs and alkylsulfonates exhibit a net charge transfer. However, undecanesulfonate, having a pK_a around 2, cannot be protonated at pH 7.2, and cannot flip across the lipid bilayer to acidify the vesicles' interior (6). Also, in contrast to FA, it does not induce H^+ transport in proteoliposomes containing UCP (6) or PUMP (Fig. 2C). Since FAs such as linoleic acid do induce H^+ transport in proteoliposomes, we conclude that this is due to their ability to flip-flop across the lipid bilayer in a protonated form. This conclusion was confirmed by the experiments with so-called "inactive" FAs which are unable to flip-flop, but retain the ability to partition into the membrane (9). For example, phenylvaleric acid did not acidify the lumen of liposomes or proteoliposomes (Fig. 2, A and B), did not induce significant H^+ transport in proteoliposomes (Fig. 2B) and did not exhibit charge transfer. The analog, heptylbenzoic acid, was able to flip-flop (Fig. 2A) and exhibited both H^+ transport and the charge transfer in proteoliposomes (Fig. 2B).

The K_m values for FA uniport (FA cycling) were similar to those found for the mammalian UCP (6). When expressed in terms of total concentrations added to the bulk medium, the K_m values reflect an overall sequence of events: partitioning into the membrane, binding to the internal FA binding site, and the kinetics of flip-flop. Based on the partition coefficient of $100,000$ for linoleic acid (23), at a total concentration of $50 \mu M$, it will be distributed with $0.56 \mu M$ free in solution and $49.44 \mu M$ in the membrane. If 100% insertion of PUMP is assumed, the molar ratio of linoleic acid to the dimeric PUMP is 11 . Since the observed K_m is well above the critical micellar concentration ($13 \mu M$) for linoleic acid in water (24), micelles will be formed when it is first added, but they will disappear immediately after its partitioning into the bilayer. Consequently, FA is embedded in the membrane before it can interact with PUMP.

We have also documented that FA-induced H^+ transport and alkylsulfonate uniport depends exponentially on membrane potential, $\Delta\Psi$, as predicted (16) and as found for Cl^- uniport via UCP (17). Note that a linear (ohmic) J - $\Delta\Psi$ characteristic was found only for the uncoupler-mediated H^+ transport (25). The linearized J - $\Delta\Psi$ characteristics obtained for alkylsulfonate uniport via PUMP yielded slopes around 0.35 , which are close to the value found for Cl^- uniport via UCP. Bearing in mind possible interfering effects (see "Experimental Procedures"), we cannot determine whether the data are compatible with an existence of an internal anion binding site.⁴ Also, the J - $\Delta\Psi$ characteristics for PUMP-mediated H^+ transport induced by FAs differ from the characteristics reported in the literature.⁵ In this case, additional effects might interfere, such as pre-equilibration of FA in both leaflets of the lipid bilayer, increasing background flux with $\Delta\Psi$ and other phenomena which will

⁴ Hydrophobicity of alkylsulfonates or capacitance effects might contribute to a slightly higher value of slope (β) when compared with Cl^- uniport via UCP (17).

⁵ This is not an argument against a common transport pathway for FAs and alkylsulfonates, which is supported by their mutual competition and common ATP inhibition. Rather, the interfering effects might be stronger with FA, since higher slopes of linearizations of the J - $\Delta\Psi$ plots were also found for UCP (P. Jezek, unpublished data) for which the common pathway was demonstrated.

tend to exaggerate the $\Delta\psi$ dependence and increase the slope β .

Having suggested a mechanism of PUMP function, we can propose some of the consequences for plant mitochondria that have this protein. As found for thermogenic brown fat in mammals (26), regulated uncoupling should lead to the release of heat. The question of whether this heat production is the primary function of PUMP, or whether modulation of oxidative phosphorylation is the primary one must be resolved in further studies. Our findings of active PUMP in the ripe (red) tomatoes and in potato tubers suggest a role for regulated uncoupling during fruit ripening, senescence, and seed dormancy. Mitochondria in fruits play their role until the final stages of ripening (27, 28), and in storage tissues during the whole lifetime. A regulated uncoupling promoted by PUMP could be the primary cause of the climacteric rise in respiration (29), known since 1925 (30). Ethylene (C_2H_4), a natural ripening hormone, was recently shown to initiate these marked biochemical changes in climacteric fruits (31), including tomato, banana, mango, avocado, pineapple, and pome fruits. The respiration burst in these fruits has been traditionally explained as a function of the alternative oxidase (32–35), the expression of which has been found to increase during ripening (36). If PUMP was active in the climacteric fruits, storage tissues, and other plant organs, their mitochondria would possess a fine control of oxidative phosphorylation, not only by eliminating H^+ pumping when switching to alternative oxidase, but also by shortcircuiting the H^+ pumping, i.e. also by protonmotive force consumption.

Acknowledgment—We thank Dr. Martha Sorenson, Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, for critical reading of the manuscript and Dr. Andre R. Meinicke for scanning of figures. We are also grateful to Marcia Marília Fagian and Luis Henrique G. Ribeiro for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Vercosi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A. P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I. M., and Chaimovich, H. (1995) *Nature* **375**, 24
2. Ježek, P., Costa, A. D. T., and Vercosi, A. E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32743–32749
3. Ježek, P., and Garlid, K. D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19303–19311
4. Ježek, P., Orosz, D. E., Modrianský, M., and Garlid, K. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26184–26190
5. Ježek, P., Hanuš, J., Semrad, C., and Garlid, K. D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6199–6205
6. Garlid, K. D., Orosz, D. E., Modrianský, M., Vassanelli, S., and Ježek, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2615–2702
7. Skulachev, V. P. (1991) *FEBS Lett.* **294**, 158–162
8. Kamp, F., and Hamilton, J. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 11074–11086
9. Ježek, P., Modrianský, M., and Garlid, K. D. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 166–170
10. Beavis, A. D., and Vercosi, A. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3079–3087
11. Ježek, P., and Freisleben, H.-J. (1994) *FEBS Lett.* **343**, 22–26
12. Ježek, P., Mahdi, F., and Garlid, K. D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10522–10526
13. Orosz, D. E., and Garlid, K. D. (1993) *Anal. Biochem.* **150**, 97–104
14. Eyring, H., and Eyring, E. (1963) *Modern Chemical Kinetics*, Reinhold, New York
15. Laughler, P., and Stark, G. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 458–466
16. Garlid, K. D., Beavis, A. D., and Ratkaj, S. K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **976**, 109–120
17. Garlid, K. D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 141–154
18. Freisleben, H.-J., Zwicker, K., Ježek, P., John, G., Bettin-Bogutski, A., Ring, K., and Nawroth, T. (1995) *Chem. Phys. Lipids* **78**, 137–147
19. Brustovetsky, N., and Klingenberg, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27329–27336
20. Schönfeld, P., Ježek, P., Borecký, J., Belyaeva, E., Slyshenkov, V. S., Wiecekowiak, M. R., and Wojtczak, L. (1996) *Eur. J. Biochem.* **240**, 387–393
21. Ježek, P., Bauer, M., and Trommer, W. E. (1995) *FEBS Lett.* **361**, 303–307
22. Růžicka, M., Borecký, J., Hanuš, J., and Ježek, P. (1996) *FEBS Lett.* **382**, 239–243
23. Anel, A., Richieri, G. V., and Kleinfeld, A. M. (1995) *Biochemistry* **32**, 530–536
24. Richieri, G. V., Ogata, R. T., and Kleinfeld, A. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 23495–23501
25. Krishnamoorthy, G., and Hinkle, P. C. (1984) *Biochemistry* **23**, 1640–1645
26. Nedergaard, J., and Cannon, B. (1992) in *New Compr. Biochem.* **23**, 385–420
27. Gardestrom, P., and Lernmark, U. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 415–421
28. Smart, C. M. (1994) *New Phytol.* **126**, 419–448
29. Hulme, A. C. (ed) *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, Academic Press, London
30. Kidd, F., and West, C. (1925) *Great Britain Department of Science and Industry Research Food Invests. Board Report* 27
31. Oeller, P. W., Min-Wong, L., Taylor, L. P., Pike, D. A., and Theologis, A. (1991) *Science* **254**, 437–439
32. Moore, A. L., Umbach, A. L., and Siedow, J. N. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 367–377
33. Day, A. D., and Wiskich, J. T. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 379–385
34. Krab, K. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 387–396
35. Soole, K. L., and Menz, R. I. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 397–406
36. Cruz-Hernandez, A., and Gomez-Lim, M. A. (1995) *Planta* **197**, 569–576

Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain

Alicia J. Kowaltowski, Alexandre D.T. Costa, Anibal E. Vercesi*

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 5 February 1998

Abstract A variety of plant tissues contain an uncoupling mitochondrial protein (PUMP), recently described and characterized by our group. In this study we show that the inhibition of PUMP activity in potato tuber mitochondria significantly increases mitochondrial H_2O_2 generation, while PUMP substrates, such as linoleic acid, reduce mitochondrial H_2O_2 generation. This H_2O_2 generation occurred mainly by the dismutation of superoxide radicals formed through monoelectronic reduction of O_2 by semiquinone forms of coenzyme Q. The results presented suggest that protection against mitochondrial oxidative stress may be a physiological role of PUMP.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Reactive oxygen species; Free radical; Plant uncoupling mitochondrial protein; Coenzyme Q; Mitochondrion

1. Introduction

The generation of reactive oxygen species (ROS) by the mitochondrial respiratory chain is a physiological and continuous process. Indeed, up to 2% of the oxygen consumed by the mitochondrial respiratory chain suffers monoelectronic reduction, leading to the production of superoxide radicals [1–3]. Under physiological conditions, ROS are readily removed by mitochondrial antioxidant systems, but under pathological conditions, in which these antioxidant systems are defective or mitochondrial ROS generation is increased, oxidative damage of the inner mitochondrial membrane may occur, with impairment of mitochondrial function (for review see [4]). In this situation, accidental or programmed cell death may follow mitochondrial dysfunction [5].

One of the many proposed mechanisms which mitochondria use to decrease ROS generation is the uncoupling between mitochondrial respiration and membrane potential, resulting in increased respiratory rates (for review see [6,7]). Protonophores are well known to decrease mitochondrial ROS generation [3], and mitochondrial respiratory energy dissipative pathways, such as the plant alternative oxidase [8,9] and mammalian uncoupling proteins [10], have been demonstrated to present the same effect. Based on these observations, Skulachev [6,7] formulated the hypothesis that mild uncoupling of mitochondria may be an effective mechanism to reduce mitochondrial ROS generation without seriously compromising cellular energetics.

We have recently described and characterized a plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) [11–14], present in a variety of plant tissues (P. Ježek, A.D.T. Costa, P. Arruda and A.E. Vercesi, unpublished results). Later, the complementary DNA from potatoes that probably encodes PUMP was identified and expressed in yeast, resulting in mitochondrial membrane potential decrease in these cells [15]. PUMP is a 32 kDa protein which transports anionic fatty acids across the inner mitochondrial membrane [12], in a manner similar to the mammalian brown adipose tissue uncoupling protein [16,17]. Protonated fatty acids are capable of diffusing through the inner mitochondrial membrane from the mitochondrial intermembrane space to the matrix [17]. PUMP removes the anionic fatty acids from the mitochondrial matrix back into the intermembrane space, resulting in fatty acid cycling, and mitochondrial uncoupling [12]. In consequence, the addition of anionic fatty acids, such as linoleic acid, to plant mitochondria results in mitochondrial uncoupling, while the presence of ATP, which inhibits PUMP, and bovine serum albumin (BSA), which removes free fatty acids, increases the membrane potential of these mitochondria [11–14].

In this report we demonstrate that the activity of PUMP decreases mitochondrial reactive oxygen species formation at the respiratory chain, in a manner dependent on the decrease in mitochondrial membrane potential induced by PUMP activity.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of rat liver and potato tuber mitochondria

Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation, as described [11,12,18].

2.2. Standard incubation procedure

The experiments were carried out at 28°C, with continuous magnetic stirring, in a standard reaction medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES buffer pH 7.2, 4 μ M rotenone, 1 μ M horseradish peroxidase, 1 μ M scopoletin and 1 μ M cyclosporin A. Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are representative of a series of at least three experiments.

2.3. Determination of mitochondrial H_2O_2 generation

H_2O_2 production was assessed by the oxidation of scopoletin by horseradish peroxidase in the presence of H_2O_2 [19]. Scopoletin fluorescence was monitored at excitation and emission wavelengths of, respectively, 365 and 450 nm, on a Hitachi F-4010 fluorimeter. Calibration was performed by adding known quantities of H_2O_2 . Cyclosporin A was present in all determinations in order to prevent artifacts due to mitochondrial swelling.

2.4. Measurements of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$)

Mitochondrial $\Delta\Psi$ was estimated through fluorescence changes of safranin O (5 μ M), recorded on a model F-4010 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) operating at excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm, with a slit width of 5 nm.

*Corresponding author. Fax: (55) (19) 2393184.
E-mail: anibal@obelix.unicamp.br

2.5. Determination of mitochondrial Ca^{2+} uptake

Mitochondrial Ca^{2+} uptake was determined by measuring the absorbance changes of arsenazo III on a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer at the wavelength pair of 675/685 nm.

2.6. Materials

Horseradish peroxidase (type IV-A), scopoletin, safranin O, H_2O_2 , cyclosporin A, HEPES, rotenone, antimycin A, myxothiazol, linoleic acid, phenylvaleric acid, heptylbenzoic acid, BSA, ATP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (FCCP) and succinate were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

3. Results and discussion

We have previously shown that the addition of linoleic acid to respiring potato mitochondria reduces their membrane potential, while full coupling of these mitochondria was obtained only in the presence of ATP and BSA [11,12]. These results are reproduced in Fig. 1, which demonstrates that the membrane potential of potato mitochondria respiring on succinate (state 4, panel A, line b) is increased by the presence of ATP and BSA (line a) and reduced by the presence of linoleic acid (line c). These effects were attributed to the presence of a plant mitochondrial uncoupling protein (PUMP) similar to the mammalian mitochondrial uncoupling protein [16,20], which is inhibited by purine nucleotides and uses fatty acids as substrates [11–14]. Rat liver mitochondria, which do not contain uncoupling proteins [10], did not suffer significant alterations in membrane potential (Fig. 1B, line b) in the presence of ATP plus BSA (line a) or linoleic acid (line c).

Fig. 2 monitors mitochondrial generation of H_2O_2 through the oxidation of scopoletin in the presence of horseradish peroxidase. We observed that the generation of H_2O_2 by potato mitochondria incubated in the presence of rotenone (panel A, line d) is largely increased by the addition of succinate (line c). The addition of the PUMP substrate linoleic acid significantly decreased potato mitochondrial respiration-supported H_2O_2 generation (line e) while phenylvaleric acid, a fatty acid unable to flip-flop across lipid bilayers, which does not act as a PUMP substrate [13], did not inhibit mitochondrial H_2O_2 generation in the presence of succinate (line b). The addition of ATP, which inhibits PUMP activity, and

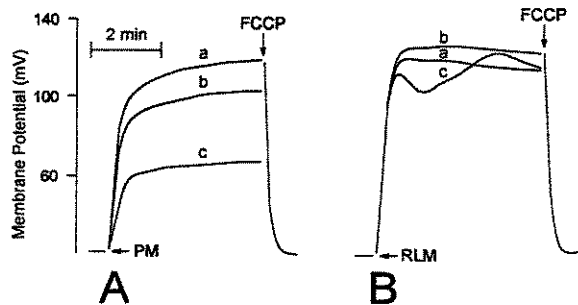


Fig. 1. Effect of PUMP substrates and inhibitors on mitochondrial membrane potential. Potato mitochondria (PM, 1 mg/ml, A) or rat liver mitochondria (RLM, 1 mg/ml, B) were incubated in standard reaction medium in the absence of scopoletin and horseradish peroxidase and in the presence of 5 μM safranin O, 2 mM succinate, 100 μM EGTA, 1 μM oligomycin and: (lines a) 0.1% BSA plus 2.5 mM ATP, (lines b) no further additions or (lines c) 40 μM linoleic acid. 5 μM FCCP was added to all experiments where indicated.

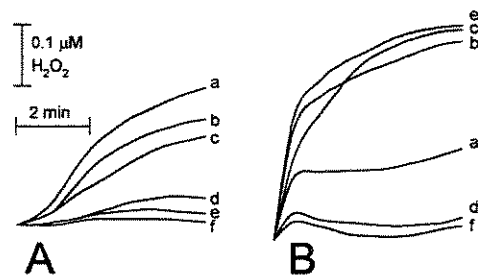


Fig. 2. Effect of PUMP substrates and inhibitors on mitochondrial respiration-stimulated H_2O_2 generation. Potato mitochondria (0.5 mg/ml, A) or rat liver mitochondria (0.5 mg/ml, B) were incubated in standard reaction medium containing 2 mM succinate and: (lines a) 0.1% BSA plus 2.5 mM ATP, (lines b) 40 μM phenylvaleric acid, (lines c) no further additions, (lines e) 40 μM linoleic acid or (lines f) 1 μM FCCP. Lines d represent experiments conducted in the absence of succinate.

BSA, which removes free fatty acids from the mitochondrial suspension, increased mitochondrial H_2O_2 generation (line a), confirming that PUMP activity decreases mitochondrial ROS generation. The presence of the uncoupler FCCP completely inhibited mitochondrial H_2O_2 generation both in the presence (not shown) and in the absence (line f) of BSA and ATP, suggesting that the increase in mitochondrial H_2O_2 generation induced by PUMP inhibition is dependent on the effects of PUMP on mitochondrial membrane potential. This increase in mitochondrial H_2O_2 generation may be attributed directly to a decrease in mitochondrial membrane potential or to the increased rates of mitochondrial respiration under lower membrane potentials.

Parenchymal rat liver cells do not contain uncoupling proteins, such as the uncoupling protein-2, distributed in many mammalian tissues [10]. Fig. 2 shows that the H_2O_2 generation of mitochondria isolated from rat liver incubated in the presence of rotenone (panel B, line d), was also largely increased by the addition of succinate (line c). The presence of linoleic acid did not decrease this production (line e), which was only reduced in the presence of FCCP (line f). The addition of BSA and ATP to rat liver mitochondria partially inhibited mitochondrial H_2O_2 generation (line a), probably due to the decrease in the free Ca^{2+} concentration of the reaction medium promoted by ATP and BSA, which complex Ca^{2+} . Ca^{2+} is well known to increase mitochondrial ROS generation (for review see [4]). BSA may also quench mitochondrial-generated ROS.

In Fig. 3, mitochondrial H_2O_2 generation was stimulated by the addition of Ca^{2+} to a mitochondrial suspension respiring on succinate. Potato mitochondria, which are much less active in Ca^{2+} accumulation than liver mitochondria (results not shown), required the addition of high Ca^{2+} concentrations (500 μM) in order to produce a burst in mitochondrial ROS generation (panel A, line b) similar to that obtained by the addition of 50 μM Ca^{2+} to rat liver mitochondria (panel B, line b). Like respiration-induced mitochondrial H_2O_2 generation in potato mitochondria, the Ca^{2+} -induced burst in H_2O_2 production was decreased by the presence of linoleic acid (panel A, line d), but not by phenylvaleric acid (line c), and was increased by the presence of ATP plus BSA (line a). Rat liver mitochondrial H_2O_2 production stimulated by Ca^{2+} (panel B, line b) was not affected by the presence of linoleic

(line d) or phenylvaleric acids (line c), and was partially inhibited by ATP plus BSA (line a). Indeed, the addition of 50 μM Ca^{2+} to the reaction medium in the presence of ATP results in a free Ca^{2+} concentration lower than 10 μM , which would certainly explain the reduction of the Ca^{2+} -stimulated burst in mitochondrial H_2O_2 generation. The presence of FCCP decreased mitochondrial H_2O_2 generation stimulated by Ca^{2+} in both rat liver and potato mitochondria (lines e). This decrease was most evident in rat liver mitochondria, which in the presence of FCCP were unable to take up 50 μM Ca^{2+} down their membrane potential. In potato mitochondria, the addition of 500 μM Ca^{2+} resulted in Ca^{2+} influx even in the presence of FCCP, driven by a chemical Ca^{2+} gradient [18].

Mitochondrial ROS generation at the respiratory chain occurs mainly due to the transfer of electrons from the semiquinone form of coenzyme Q to oxygen, leading to the formation of the superoxide radical, which is readily dismutated by mitochondrial superoxide dismutase to H_2O_2 [1,3,18,21]. In order to verify if this was the main process occurring in our experimental conditions, we tested the effect of different mitochondrial respiratory chain inhibitors on mitochondrial Ca^{2+} -stimulated H_2O_2 generation (Fig. 4). FCCP was present in all determinations in order to prevent the occurrence of different membrane potentials, and mitochondrial H_2O_2 generation was stimulated by the addition of Ca^{2+} . We observed that H_2O_2 generation in both potato (panel A) and rat liver (panel B) mitochondria incubated in the presence of rotenone and treated with Ca^{2+} (lines c) was stimulated by succinate-supported respiration (lines b) and by the presence of antimycin A, which promotes the accumulation of semiquinone forms of coenzyme Q (lines a). Myxothiazol, which prevents the formation of the semiquinone anion [3], inhibited mitochondrial Ca^{2+} -stimulated H_2O_2 generation (lines d), confirming that this generation occurs mainly due to dismutation of superoxide radicals formed through the transfer of electrons from the semiquinone form of coenzyme Q to molecular oxygen.

The results presented in this paper demonstrate that the decrease in mitochondrial membrane potential induced by PUMP activity inhibits mitochondrial generation of ROS at the level of the semiquinone forms of coenzyme Q, as observed previously with the plant alternative oxidase [8,9] and mammalian uncoupling proteins [10]. The mechanism by

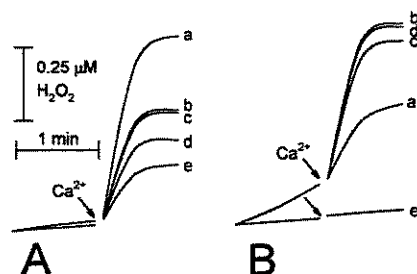


Fig. 3. Effect of PUMP substrates and inhibitors on Ca^{2+} -stimulated mitochondrial H_2O_2 generation. Potato mitochondria (0.5 mg/ml, A) or rat liver mitochondria (0.5 mg/ml, B) were incubated in standard reaction medium containing 2 mM succinate and: (lines a) 0.1% BSA plus 2.5 mM ATP, (lines b) no further additions, (lines c) 40 μM phenylvaleric acid, (lines d) 40 μM linoleic acid or (lines e) 1 μM FCCP. 500 μM Ca^{2+} (A) or 50 μM Ca^{2+} (B) was added where indicated by the arrows.

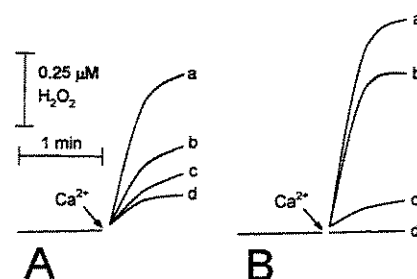


Fig. 4. Effect of respiratory chain inhibitors on Ca^{2+} -stimulated mitochondrial H_2O_2 generation. Potato mitochondria (0.5 mg/ml, A) or rat liver mitochondria (0.5 mg/ml, B) were incubated in standard reaction medium containing 1 μM FCCP and: (lines a) 1 μM antimycin A and 2 mM succinate, (lines b) 2 mM succinate, (lines c) no further additions or (lines d) 1 $\mu\text{g/ml}$ myxothiazol and 2 mM succinate. 500 μM Ca^{2+} was added where indicated by the arrows.

which mitochondrial uncoupling decreases mitochondrial ROS generation is not yet clear, but it may be attributed to the increase in mitochondrial respiration rates, decreasing the life time of the semiquinone forms of coenzyme Q and reducing the probability of superoxide anion formation through electron transfer from semiquinone forms of coenzyme Q to molecular oxygen [7]. Alternatively, as suggested by Liu [2], the presence of low mitochondrial membrane potentials could decrease the reaction between superoxide anions and protons at the cytoplasmic side of the inner mitochondrial membrane, resulting in the formation of the perhydroxyl radical. This would reduce the dismutation of superoxide anions by intramitochondrial superoxide dismutase, decreasing the detection of mitochondrial-generated H_2O_2 , because diffusion of the superoxide anions through the inner mitochondrial membrane occurs mainly in the perhydroxyl form [2].

Independently of the mechanism by which mitochondrial uncoupling reduces the generation of ROS at the mitochondrial respiratory chain, the regulation of mitochondrial ROS production should be regarded as a function of respiratory energy dissipative pathways, such as PUMP, the alternative oxidase and mammalian uncoupling proteins. Activation of these pathways promoting a mild uncoupling [7] of mitochondria efficiently reduces mitochondrial ROS generation, and may prevent oxidative mitochondrial damage.

Acknowledgements: We thank Mr. Matheus P.C. Vercesi and Caroline S. Fukushima for the preparation of rat liver mitochondria and Luis H.G. Ribeiro for the preparation of potato mitochondria. Prof. Francis Sluse is gratefully acknowledged for the critical reading of the manuscript. This work was partially supported by grants from the Brazilian agencies FAPESP, CNPq-PADCT, PRONEX and FAEP-UNICAMP.

References

- [1] Boveris, A. and Chance, B. (1973) *Biochem. J.* 134, 707–716.
- [2] Liu, S.S. (1997) *Biosci. Rep.* 17, 259–272.
- [3] Turrens, J.F. (1997) *Biosci. Rep.* 17, 3–8.
- [4] Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meimicke, A.R. and Castilho, R.F. (1997) *Biosci. Rep.* 17, 43–51.
- [5] Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P.X. and Kroemer, G. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 185–193.
- [6] Skulachev, V.P. (1996) *FEBS Lett.* 397, 7–10.
- [7] Skulachev, V.P. (1997) *Biosci. Rep.* 17, 347–366.
- [8] Wagner, A.M. and Moore, A.L. (1997) *Biosci. Rep.* 17, 319–333.

- [9] Popov, V.N., Simonian, R.A., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1997) *FEBS Lett.* 415, 87–90.
- [10] Nègre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Pénicaud, L. and Casteilla, L. (1997) *FASEB J.* 11, 809–815.
- [11] Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (1995) *Nature* 375, 24.
- [12] Ježek, P., Costa, A.D.T. and Vercesi, A.E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 32743–32749.
- [13] Ježek, P., Costa, A.D.T. and Vercesi, A.E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 24272–24278.
- [14] Vercesi, A.E., Chaimovich, H. and Cuccovia, I.M. (1997) *Recent Res. Dev. Plant Physiol.* 1, 85–91.
- [15] Laloi, M., Klein, M., Reismeyer, J.W. and Müller-Röber, B. (1997) *Nature* 389, 135–136.
- [16] Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, S. and Ježek, P. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 2615–2702.
- [17] Skulachev, V.P. (1991) *FEBS Lett.* 294, 158–162.
- [18] Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. and Vercesi, A.E. (1995) *Am. J. Physiol.* 269, C141–147.
- [19] Boveris, A., Martino, E. and Stoppani, A.O.M. (1977) *Anal. Biochem.* 80, 145–158.
- [20] Nicholls, D.G. and Locke, R.M. (1984) *Physiol. Rev.* 64, 1–64.
- [21] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.