

REGIANE DEGAN FÁVARO

**ANÁLISE BIOQUÍMICA, ESTUDOS DA RELAÇÃO
ESTRUTURA-FUNÇÃO E DE EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL DE
PLANTAS**

**Botucatu-SP
2008**

REGIANE DEGAN FÁVARO

**ANÁLISE BIOQUÍMICA, ESTUDOS DA RELAÇÃO
ESTRUTURA-FUNÇÃO E DE EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL DE
PLANTAS**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista - Campus
de Botucatu (SP), para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Genética).**

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

**Botucatu-SP
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Favaro, Regiane Degan.

Análise bioquímica, estudos da relação estrutura-função e de expressão da proteína desacopladora mitocondrial de plantas / Regiane Degan Fávaro. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2008.

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Assunto CAPES: 20204000

1. Genética vegetal 2. Plantas - Genética

CDD 581.3

Palavras-chave: Expressão gênica; Propriedades bioquímicas; Proteínas desacopladoras; Relação estrutura-função

*Dedico essa tese a minha mãe, meu pai (in memoriam), meu irmão
(obrigada pelas horas de sono perdidas) e meus avós;*

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**;

À **Universidade Estadual Paulista**, pela sua estrutura e oportunidade;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo suporte financeiro;

Ao Prof. Dr. **Ivan de Godoy Maia**, pela orientação dedicada;

Ao Prof. Dr. **Jiri Borecký**, pela grande colaboração nesse trabalho e pelos muitos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. **Aníbal Eugênio de Vercesi**, pela atenção e estrutura disponibilizadas;

Ao Profa. Dra. **Iolanda Midea Cuccovia**, pelo apoio no desenvolvimento dos ensaios;

A **Menina Akemi** por ser uma amiga sempre presente e pelas discussões que muito acrescentaram em minha vida e na tese;

Aos meus queridos amigos e companheiros de tese, **Adriana, Ana Teresa, Antonio, Bob, Bonsa, Débora, Desiré, Fábio, Negin e Thaís**, pelos ótimos anos de convivência;

As minhas amigas de Campinas **Ana Luiza, Daniela, Elane, Heidi, Kívia, e Paula**, pela convivência;

Ao **Marco Figueiredo** pelo exemplo de vida, ensinamentos, carinho e companheirismo;

Muito Obrigada!!!

**“A vida é a arte de tirar conclusões suficientes
de dados insuficientes.”**

Luiz Fernando Veríssimo (1936 -)

**“Se, a princípio, a idéia não é absurda,
então não há esperança para ela.”**

Albert Einstein (1879 - 1955)

RESUMO

Proteínas desacopladoras (UCPs; do inglês *uncoupling proteins*) são proteínas especializadas no transporte mitocondrial que desacoplam a respiração da síntese de ATP. UCPs geram um fluxo de prótons através da membrana mitocondrial interna, dependente de ácidos graxos e sensível a nucleotídeos purínicos (PN). No presente trabalho, foram realizados vários estudos empregando UCPs de plantas (pUCP). Inicialmente, foi empreendida a caracterização bioquímica de uma UCP de milho (*Zea mays*; ZmUCP), representativa de espécies monocotiledôneas. Essa proteína, quando expressa em *Escherichia coli* e reconstituída em lipossomos, foi capaz de induzir um fluxo de prótons dependente de ácido linoléico (LA) e sensível a ATP com valores de K_m , V_{max} e K_i similares àqueles observados para pUCPs de espécies dicotiledôneas. A ZmUCP foi utilizada para investigar a importância de um par de histidinas presente no segundo *loop* matricial da UCP1 de mamíferos e ausente nas pUCPs. A introdução do referido par de histidinas na ZmUCP (Lys155His e Ala157His) provocou um aumento na afinidade por LA enquanto que a sua atividade permaneceu inalterada. Em um estudo mais abrangente de estrutura-função, mutações pontuais nos resíduos Lys147, Arg155 e Tyr269, localizados nas chamadas assinaturas das UCPs, e Cys28 e His83, específicos para pUCPs, foram introduzidas na proteína AtUCP1 de *Arabidopsis*. Os efeitos de tais mutações nas propriedades bioquímicas da AtUCP1 foram examinados usando sistema de reconstituição em lipossomos. O resíduo Arg155 parece ser crucial para a afinidade da AtUCP1 por LA enquanto que His83 tem importante função na atividade de transporte. Os resíduos Cys28, Lys147, e também Tyr269, são importantes para a correta funcionalidade da AtUCP1, já que suas substituições afetaram, ou a afinidade por LA e a atividade de transporte da proteína, ou a sensibilidade a inibidores PN. Além disso, analisou-se o

perfil de expressão dos seis genes que codificam *pUCPs* em *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1-6*) em resposta a tratamentos geradores de estresse salino (NaCl) e osmótico (manitol), e aos fito-hormônios ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano (ACC) e ácido abscísico (ABA). Nossos resultados demonstraram uma inibição significativa na expressão do gene *AtUCP4* em resposta a todos os tratamentos. A expressão dos genes *AtUCP5* e *AtUCP6* foi induzida em resposta ao tratamento com manitol, sendo o mesmo efeito observado para os genes *AtUCP2*, *AtUCP5* e *AtUCP6* mediante tratamento com ABA e *AtUCP2* para o tratamento com NaCl. Em um estudo complementar, os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* foram isolados e fusionados ao gene repórter que codifica a β -glucuronidase. Os cassetes de expressão resultantes foram introduzidos em *Nicotiana tabacum* SR1, por processo de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, e análises histoquímicas subsequentes indicaram um padrão de expressão ubíquo ou preferencialmente em raízes, para os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2*, respectivamente.

Palavras-chave: Proteínas desacopladoras, propriedades bioquímicas, relação estrutura-função, expressão gênica.

ABSTRACT

Uncoupling proteins (UCPs) are specialized mitochondrial transporter proteins, which uncouple respiration from ATP synthesis. UCPs mediate a fatty acid (FA)-dependent, purine nucleotide (PN)-inhibitable proton flux across the inner membrane mitochondrial. In the present study, several assays on plant UCPs (pUCP) were performed. Firstly, we biochemically characterized an UCP from maize (*Zea mays*; ZmUCP), a representative uncoupling protein from monocot species. This protein was expressed in *Escherichia coli* and reconstituted in liposomes. ZmUCP was fully active and induced a linoleic acid-dependent proton flux that was sensitive to ATP. The obtained K_m , V_{max} and K_i values were similar to those observed for dicot pUCPs. ZmUCP was also used to investigate the importance of a histidine pair present in the second matrix loop of mammalian UCP1 and absent in pUCPs. ZmUCP with the introduced histidine pair (Lys155His and Ala157His) displayed increased LA-affinity while its activity remained unchanged. In a subsequent study using AtUCP1, point mutations were introduced in amino acid residues Lys147, Arg155 and Tyr269, located inside the so-called UCP-signatures, and Cys28 and His83, specific for pUCPs. The effects of amino acid replacements on AtUCP1 biochemical properties were examined using reconstituted liposomes. Residue Arg155 appears to be crucial for AtUCP1 affinity to LA whereas His83 plays an important role in transport activity. Residues Cys28, Lys147, and also Tyr269 are important for correct AtUCP1 function, as their substitutions affected either the AtUCP1 affinity to LA and its transport activity, or sensitivity to PN inhibitors. Furthermore, we analyzed the expression profiles of the six genes encoding pUCP in *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1-6*) in response to salt (NaCl) and osmotic (mannitol) stress treatments, and to the fitohormones 1-aminocyclopropane 1- carboxylic acid (ACC) and abscisic acid

(ABA). Our results demonstrated a significant inhibition in the *AtUCP4* gene expression in response to all treatments. The *AtUCP5* and *AtUCP6* gene expression was induced in response to the treatment with mannitol, being the same effect observed for the genes *AtUCP2*, *AtUCP5* and *AtUCP6* in response to the treatment with ABA and *AtUCP2* in the treatment with NaCl. In a complementary study, the promoters of *AtUCP1* and *AtUCP2* genes were isolated and transcriptionally fused to the β -*glucuronidase* reporter gene. The resulting expression cassettes were introduced into *Nicotiana tabacum* SR1 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Subsequent histochemical analysis indicated that *AtUCP1* is ubiquitously expressed while *AtUCP2* is expressed preferentially in roots.

Keywords: Uncoupling protein, biochemical properties, structure function relationships, gene expression.

SUMÁRIO

Resumo	iv
Abstract.....	vi
1. Introdução	11
1.1. A importância da mitocôndria.....	11
1.2. A proteína desacopladora mitocondrial	14
1.3. Modelos do mecanismo de transporte de prótons	22
1.4. Atividade bioquímica de UCPs mutantes	26
1.5. Proteínas desacopladoras mitocondriais de plantas.....	28
1.6. Desacoplamento mitocondrial em plantas	34
2. Objetivos	37
Capítulo I. Caracterização Bioquímica das pUCPs e estudos de estrutura-função.....	38
1.1. Artigo 1: <i>ZmPUMP encodes a fully functional monocot plant uncoupling mitochondrial protein whose affinity to fatty acid is increased with the introduction of a His pair at the second matrix loop</i>	
1.2. Artigo 2: <i>Mutational analysis of Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein</i>	
Capítulo II. Estudos de expressão gênica em <i>Arabidopsis</i> e de caracterização funcional de promotores	42
II.1. Material e Métodos	42
II.1.1. Análises de expressão gênica em <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
II.1.1.1. Cultivo das sementes de <i>A. thaliana</i>	42
II.1.1.2. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR (quantitative <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction.....	43
II.1.2. Análise das regiões promotoras dos genes AtUCP1 e AtUCP2	48
II.1.2.1. Amplificação e clonagem das referidas regiões promotoras	48

II.1.2.2. Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i>	50
II.1.2.3. Análise histoquímica da atividade β -Glucuronidase (GUS) nas linhagens transformadas	52
II.1.2.4. Quantificação da expressão relativa do gene repórter uidA nas plantas transgênicas transformadas com os cassetes de expressão	53
II.2. Resultados e Discussão	54
II.2.1. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR.....	54
II.2.2. Amplificação e clonagem das regiões promotoras.....	59
II.2.3. Análises moleculares das plantas transformadas.....	59
II.2.4. Análise histoquímica da atividade GUS nas linhagens transformadas	60
Conclusões Gerais	64
Referências.....	65
Apêndice 1	79
Apêndice 2	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. A IMPORTÂNCIA DA MITOCÔNDRIA

A energia necessária para a manutenção da estrutura e função celular provém do catabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos. Estas fontes de energia passam por uma série de rotas metabólicas, iniciando-se no compartimento citosólico. Nas células procarióticas devido à ausência de organelas, o processo de produção de energia biológica fica restrito ao citosol, enquanto que nas células eucarióticas ele tem continuidade nas mitocôndrias.

As mitocôndrias são organelas formadas por duas membranas, interna e externa. A membrana mitocondrial externa controla o acesso de íons e metabólitos para o espaço intermembranas, sendo que o canal de ânion voltagem dependente (VDAC; do inglês *Voltage-Dependent Anion Channel*) é a proteína mais abundante nessa membrana (corresponde a mais de 50% do total de proteínas da membrana mitocondrial externa; Mannela, 1998). O VDAC está envolvido numa ampla gama de processos, como a passagem de ATP para fora da mitocôndria, liberação de ânions superóxido, além de uma função no processo de apoptose (revisado em Gonçalves *et al.*, 2007).

A organização estrutural da membrana mitocondrial interna permite distinguir três componentes básicos: a membrana interna propriamente dita, a membrana da crista e o espaço intercrista (revisado em Logan, 2006). A membrana mitocondrial interna é rica em proteínas (80% de proteínas e 20% de lipídeos), sendo estas proteínas componentes da cadeia respiratória e proteínas transportadoras de metabólitos como, citrato, oxoglutarato, malato, ATP, ADP, piruvato, Ca^{+2} e fosfato. A membrana mitocondrial interna é permeável a O_2 , ao CO_2 , e H_2O .

Na matriz mitocondrial estão localizadas as enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo, bem como substratos, co-fatores, nucleotídeos, íons inorgânicos, e a maquinaria genética mitocondrial (DNA, RNA e ribossomos). O DNA mitocondrial (mtDNA) é “empacotado” com proteínas formando complexos DNA-proteína chamados nucleóides, por analogia com a organização do DNA em células procariontes. Cada nucleóide, considerado uma unidade hereditária do mtDNA, contém diversas cópias do genoma mitocondrial e diferentes proteínas (Kucej *et al.*, 2007).

A oxidação de combustíveis (glicídeos, lipídeos e às vezes aminoácidos) no metabolismo celular libera energia (elétrons) que é conservada nos compostos reduzidos NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) e FADH₂ (flavina-adenina-dinucleotídeo). O NADH (um carreador de elétrons) e o FADH₂ (o qual funciona como um grupo prostético de um grande número de enzimas) são produzidos na mitocôndria, ou então no citosol. NADH e FADH₂ doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, uma série de complexos protéicos que são localizados, como mencionado anteriormente, na membrana mitocondrial interna. O movimento dos elétrons entre os componentes da cadeia transportadora é dirigido pelo potencial redox. O destino final dos elétrons é o oxigênio molecular, em organismos aeróbicos, o qual é reduzido para H₂O no último passo da cadeia transportadora de elétrons, sendo desta forma, o processo de oxidação dos substratos e redução do oxigênio denominado de respiração celular (Voet *et al.*, 2002).

Durante a respiração celular, o movimento dos elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons [Complexo I (NADH-desidrogenase); Complexo II (succinato desidogrenase); Complexo III (citocromo *bc*₁) e IV (citocromo *c* oxidase)] gera um bombeamento de prótons (H⁺) por alguns dos componentes da cadeia

(Complexos I, III e IV). Estes irão bombear os prótons da matriz mitocondrial (região com baixa $[H^+]$) para o espaço intermembrana da mitocôndria (região com alta $[H^+]$), o qual estabelece um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. A medida termodinâmica quantitativa para o gradiente de prótons é um gradiente eletroquímico, o qual tem dois componentes: uma diferença na concentração de prótons, e uma diferença no potencial elétrico através da membrana. Como convenção em bioenergética, o gradiente eletroquímico de prótons é frequentemente convertido em unidades de potencial elétrico (o qual tipicamente varia de 150-200 mV) e é referido como uma força prótonmotriz (fmp) (Krauss *et al.*, 2005).

A energia que é conservada no gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna é usada pela ATP-sintase (complexo V), um complexo protéico da membrana mitocondrial interna que sintetiza ATP a partir de ADP mais fosfato inorgânico (P_i), processo denominado de fosforilação. A síntese de ATP está acoplada ao gradiente de prótons, isto é, ela necessita da descarga do gradiente de prótons, ou seja, o retorno dos mesmos para a matriz mitocondrial via ATP-sintase. Tal acoplamento depende da impermeabilidade da membrana interna aos prótons, que permite o estabelecimento de um gradiente eletroquímico através da membrana. No estado de repouso, quando a fosforilação oxidativa é mínima, o gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial interna acumula-se e impede a continuidade do bombeamento de prótons, inibindo, portanto, o transporte de elétrons. Quando a síntese de ATP aumenta, o gradiente eletroquímico é utilizado, permitindo o reinício do transporte de elétrons.

O gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons não é totalmente acoplado com a síntese de ATP, já que os prótons podem retornar para a matriz mitocondrial por intermédio de uma proteína presente na

membrana mitocondrial interna, a proteína desacopladora mitocondrial (UCP; do inglês *Uncoupling Protein*). Como consequência, o potencial de membrana é ligeiramente reduzido e a energia derivada da oxidação dos substratos é dissipada na forma de calor.

1.2. A PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL

O transporte de metabólicos (nucleotídeos, fosfatos, piruvato etc.) através da membrana mitocondrial interna é essencial para o metabolismo dos eucariontes. A maioria dos carreadores são transportadores de ânions (ânions de ácidos-graxos, ADP, ATP, fosfato, malato, aspartato, glutamato, citrato ou piruvato), mas alguns transportam substratos (ornitina, carnitina ou glutamato) (Borecký *et al.*, 2001a). A família dos carreadores mitoncodriais (MCF; do inglês *Mitochondrial Carrier Family*) (revisado em Haferkamp, 2007) é composta por proteínas com peso molecular entre 28-34 kDa (Borecký *et al.*, 2001a) codificadas exclusivamente por genes nucleares. Em plantas, Millar e Heazlewood (2003) identificaram 45 genes que codificam para proteínas da MCF em *Arabidopsis*, enquanto que numa análise *in silico* realizada em 2004, o número de membros dessa família subiu para aproximadamente 60 genes (preditos na sua maioria) (Picault *et al.*, 2004).

Até o presente momento, o carreador ADP/ATP é o único membro da família que teve a sua estrutura resolvida por difração de raios X em resolução de 2,2 Å (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003), sendo a mesma depositada no *Protein Data Bank*. Os carreadores mitocôndrias apresentam uma estrutura tripartida que consiste em três repetições, cada qual contendo duas regiões hidrofóbicas que formam α -hélices transmembranas (Figura 1). As α -hélices de cada repetição são conectadas por *loops* hidrofílicos localizados no espaço intermembrana (Figura 1). Todas as proteínas

carreadoras mitocondriais apresentam um motivo altamente conservado denominado *Energy Transfer Proteins Signature* (ETPS) – P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY] (Borecký *et al.*, 2001a).

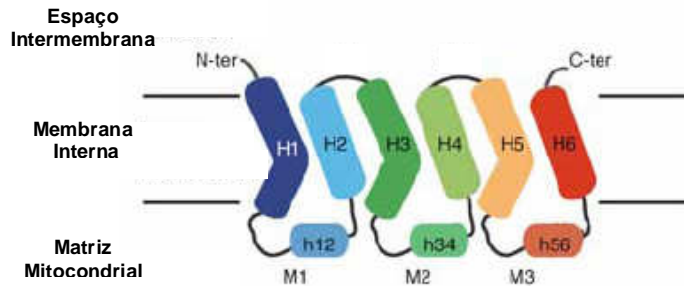


Figura 1. Modelo topológico dos carreadores mitocondriais. As α -hélices e os *loops* localizados na matriz mitocondrial estão representados pelas letras H e h, respectivamente. A estrutura tripartida está dividida em cores, azul (M1), verde (M2) e vermelho (M3). As regiões N- e C-terminal da proteína estão localizadas no espaço intermembranas. Adaptação do modelo proposto a partir da estrutura tridimensional do carreador ATP/ADP (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).

As proteínas desacopladoras mitocondriais formam uma subfamília dentro da família dos carreadores aniônicos mitocondriais (MACF; do inglês *Mitochondrial Anion Carrier Family*). As proteínas desacopladoras possuem três cópias do motivo ETPS, enquanto que os outros membros da MACF possuem somente uma ou duas cópias do mesmo (Borecký *et al.*, 2006). As proteínas desacopladoras mitocondriais foram inicialmente denominadas de termogenina ou proteína de ligação ao GDP (Nicholls, 2001). Porém, após a sua devida descoberta e caracterização em tecido adiposo marrom de camundongos por Ricquier e Kader em 1976, a sigla UCP passou a ser empregada. A descoberta de diferentes isoformas de UCPs em mamíferos fez com que essas fossem numeradas de acordo com a ordem de suas descobertas. A função fisiológica do tecido adiposo marrom, termogênese (produção de calor sem requerer contração muscular), está diretamente relacionada com a atividade da UCP1 presente nas

numerosas mitocôndrias deste tecido. Nesse caso, a UCP1 corresponde até 10% do total das proteínas da membrana mitocondrial interna dos adipócitos (Esteves e Brand, 2005). A sua função termogênica foi caracterizada em mamíferos hibernantes (Nicholls e Rial, 1999), em mamíferos recém-nascidos adaptados ao frio (Argyropoulos *et al.*, 2002; Mozo *et al.*, 2005), e durante a termogênese induzida por dieta rica em gorduras em pequenos roedores (Erlanson-Albertsson, 2003). A termogênese relacionada ao tecido adiposo marrom está sob o controle hormonal da norepinefrina, ou noradrenalina, que atua nos β -receptores induzindo a lipólise e mobilizando ácidos graxos livres (Cannon e Nedergaard, 2004). O mecanismo pelo qual os ácidos graxos livres ativam a UCP1 ainda não é completamente compreendido (revisto em detalhe no item 1.3).

Sabe-se que o transporte de prótons mediado pela UCP1 é inibido por nucleotídeos purínicos (PN; do inglês *purine nucleotides*), uma característica que diferencia as UCPs dos outros carreadores da mesma família (Garlid *et al.*, 2000). O sítio de ligação da UCP1 aos PNs está voltado para o espaço intermembrana contendo “solução citosólica”, logo, a concentração dos PNs contidos nessa solução é que irá permitir o desacoplamento (Dlasková *et al.*, 2006).

Os relatos recentes da expressão da UCP1 em camadas de músculo liso longitudinal do útero (Nibbelink *et al.*, 2001) e em células do timo geraram uma indagação sobre as suas funções fisiológicas nesses tecidos. Evidências de que a UCP1 era funcional em mitocôndrias do timo foram obtidas por uma análise comparativa entre a cinética de ligação ao GDP em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de timo (Caroll *et al.*, 2005).

Em experimentos com ratos submetidos à restrição calórica, estresse conhecido por diminuir a função do timo (Kendall *et al.*, 1991) e também reduzir a expressão da UCP1 em tecido adiposo marrom (Boss *et al.*, 1998), não foi possível

observar uma variação significativa na abundância da UCP1 em mitocôndrias isoladas do timo (Carroll *et al.*, 2005), sugerindo uma nova função para a UCP1 nesse órgão. Os autores sugerem que a UCP1 de timo esteja envolvida na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Porter *et al.*, 2006), hipótese apresentada em função das evidências encontradas na literatura relatando a ativação da UCP1 por EROs e por produtos de peroxidação lipídica (Echtay *et al.*, 2002; Echtay *et al.*, 2003) (ver item 1.3).

Em adição a UCP1, quatro outros membros da subfamília foram identificados em diferentes tecidos de mamíferos: UCP2 com distribuição ubíqua; UCP3 presente em tecido adiposo marrom de roedores, tecidos cardíacos e músculo esquelético e UCP 4 e 5 presentes em cérebro (revisado em Krauss *et al.*, 2005). As funções fisiológicas das UCP2-5 ainda não são claras, entretanto, sabe-se que estas estão presentes nas mitocôndrias em menor quantidade do que a UCP1 presente em mitocôndrias de tecido adiposo marrom (no caso da UCP2 e 3, representam respectivamente, 0,1% e 1% do total das proteínas presentes na membrana mitocondrial interna) (Esteves e Brand, 2005). Dentre as UCPs 2-5, as mais estudadas são a UCP2 e a UCP3. Essas proteínas quando expressas em bactérias e reconstituídas em lipossomos apresentam um comportamento similar ao da UCP1, ou seja, dissipam o gradiente eletroquímico de prótons através do transporte de ácidos graxos e outros ânions como *undecanesulfonate*, (com exceção de Cl⁻, o qual só é transportado pela UCP1) (Echtay *et al.*, 1999; Jabůrek *et al.*, 1999). Essas proteínas apresentam uma menor afinidade por PNs (K_{iATP} para UCP1 = 125 μ M, para a UCP2 = 0,76 mM e UCP3 = 0,65 mM de acordo com Jabůrek *et al.*, 1999). O envolvimento das UCP2 e UCP3 no metabolismo de ácidos graxos foi demonstrado por Nedergaard e Cannon (2003), sendo estes compostos responsáveis pela indução da expressão destes genes.

Devido à similaridade de suas seqüências com a UCP1 e semelhanças na atividade bioquímica, as UCPs 2 e 3 foram inicialmente relacionadas com a termogênese (Boss *et al.*, 1997). Ao longo dos anos, entretanto, evidências experimentais contra tal função foram surgindo. Dentre elas, observou-se que ratos submetidos à restrição calórica, o que promove uma queda na termogênese, apresentaram um maior acúmulo de mRNA e proteínas das UCP2 e UCP3 (Boss *et al.*, 1997; Samec *et al.*, 1998). A função termogênica foi descartada quando se demonstrou que camundongos nocautes para os genes *UCP2* e *UCP3*, quando expostos ao frio, apresentaram as mesmas respostas que camundongos selvagens (Arsenijevic *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2000; Vidal-Puig *et al.*, 2000). Adicionalmente, UCPs homólogas foram encontradas em outros tecidos/órgãos bem como em diversos organismos, sugerindo uma diversidade funcional. A ampla distribuição das UCPs no reino dos eucariontes foi evidenciada pela sua presença em plantas (Vercesi *et al.*, 1995; Maia *et al.*, 1998; Brandalise *et al.*, 2003a), pássaros (Raimbault *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2003), vertebrados exotérmicos, como *Xenopus* (Keller *et al.*, 2005) e peixes (Stuart *et al.*, 1999), *Drosophila* (Fridell *et al.*, 2004), e em eucariontes primitivos como *Caenorhabditis elegans* (Vercesi *et al.*, 2006), *Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999), *Dictyostelium discoideum* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2002), fungos (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000; Cavalheiro *et al.*, 2004), e no parasita *Plasmodium berghei* (Uyemura *et al.*, 2000).

Uma das funções fisiológicas da UCP2 foi demonstrada pela sua indução em dieta rica em gordura, sugerindo a importância desta na determinação da taxa do metabolismo basal e possivelmente resistência à obesidade. Estas conclusões foram baseadas no fato de que a expressão do *UCP2* foi induzida em camundongos A/J (resistentes à obesidade) submetidos a uma dieta rica em gorduras, enquanto que a sua

expressão não foi alterada em camundongos B6 (propensos à obesidade) (Fleury *et al.*, 1997; Surwit *et al.*, 1998). A função da UCP2 parece ser órgão/tecido-específica, sendo que dietas ricas em gorduras têm promovido à indução de sua expressão em tecido adiposo branco e marrom e em músculo esquelético (Fleury *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 1997; Surwit *et al.*, 1998), mas inibido a sua expressão em estômago e intestino (Rippe *et al.*, 2000).

Outra função alternativa para a UCP2 está relacionada com a regulação da secreção de insulina (Chan *et al.*, 1999; Polonsky e Semenkovich, 2001; Zhang *et al.*, 2001). A superexpressão da UCP2 em células produtoras de insulina (INS-1) reduz a secreção de insulina induzida por glicose (Chan *et al.*, 1999). Camundongos nocautes para o gene *UCP2* secretam mais insulina em resposta à glicose do que camundongos tipo-selvagem (Zhang *et al.*, 2001). Esses dados sugerem que a habilidade da UCP2 em dissipar o gradiente de prótons e conseqüentemente diminuir a síntese de ATP, é de alguma maneira capaz de inibir a capacidade das células beta em secretar insulina (Erlanson-Albertsson, 2003).

A mais recente função proposta para a UCP2 está relacionada com a regulação da produção de EROs na mitocôndria. A produção de EROs está diretamente associada ao potencial de membrana mitocondrial, o qual é controlado pelo acoplamento da respiração com a fosforilação. Assim, quando o nível de desacoplamento mediado pela UCP aumenta, ocorre uma diminuição do potencial de membrana, o que gera um aumento no fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Nessa condição, um aumento do consumo de oxigênio molecular (diminui a tensão do oxigênio) e uma conseqüentemente diminuição na produção de EROs são observados. Corroborando tal observação, constatou-se que a interrupção do gene *UCP2* conduz a um aumento da produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos

de rato (Arsenijevic *et al.*, 2000). Em contrapartida, resultados recentes obtidos pelo mesmo grupo falharam em constatar um aumento significativo na produção de EROs em fibroblastos de camundongos nocautes para o gene *UCP2* (Pecqueur *et al.*, 2008). Nesse caso, uma maior proliferação celular associada a uma redução da oxidação de ácidos graxos e um aumento da glicólise foi observada.

O gene *UCP3* foi inicialmente identificado em músculo esquelético de roedores (Vidal-Puig *et al.*, 1997; Boss *et al.*, 1998) e humanos (Bao *et al.*, 1998). A expressão desse gene em músculo esquelético gera uma indagação sobre a sua importância na regulação da energia gasta neste órgão. Experimentos com camundongos nocautes para o gene *UCP3* não demonstraram alterações na taxa metabólica quando comparados com o tipo-selvagem (Vidal-Puig *et al.*, 2000). Exemplares dessa linhagem nocaute também não apresentaram um quadro de obesidade quando alimentados com uma dieta rica em gorduras (Gong *et al.*, 2000) e, quando submetidos a baixas temperaturas, não apresentaram alterações na termoregulação (Cline *et al.*, 2001). Adicionalmente, esses animais nocaute não demonstraram mudanças no peso corporal e nem aumentaram a sua tolerância aos exercícios (Vidal-Puig *et al.*, 2000). Entretanto, o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de animais dessa linhagem foi significativamente reduzido quando comparado com o tipo-selvagem, evidenciando a atividade desacopladora da *UCP3* nesse tecido (Gong *et al.*, 2000; Cline *et al.*, 2001). Segundo Cline e colaboradores (2001), camundongos sem *UCP3* apresentam uma taxa de síntese de ATP quatro vezes maior do que animais tipo selvagem. Estas evidências comprovam que o fluxo de prótons mediado pela *UCP3* não afeta o metabolismo energético e que a função dessa proteína deve ser mais específica no metabolismo do músculo. Sua possível função pode estar relacionada à regulação do

fluxo de prótons e da produção de ATP no músculo esquelético durante o repouso e durante o exercício (Erlanson-Albertsson, 2003).

Recentemente, como na maioria dos casos de UCPs com função desconhecida, a atividade da UCP3 foi relacionada com a proteção dos tecidos contra o dano oxidativo (Echtay *et al.*, 2002). A evidência para tal possibilidade adveio de experimentos que demonstraram que o desacoplamento promovido pela UCP3 na presença de ácidos graxos era ativado por radicais superóxido. Em experimentos com mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de camundongos nocaute para o gene *UCP3*, o superóxido não gerou desacoplamento na presença de ácidos graxos quando comparado com o tipo selvagem (Echtay *et al.*, 2002). A função da UCP3 no transporte de ácidos graxos encontra suporte no fato dessa proteína ser induzida durante situações em que os ácidos graxos são importantes como substratos energéticos, como em processos de restrição calórica (Cadenas *et al.*, 1999) e dietas ricas em gorduras (Samec *et al.*, 1999).

As UCP4 e UCP5 (Sanchis *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2000) são as proteínas de mamíferos menos estudadas. A função dessas proteínas no metabolismo energético é ainda desconhecida, mas os autores têm sugerido sua influência em centros de regulação no cérebro bem como a proteção contra radicais de oxigênio livres durante o envelhecimento (Erlanson-Albertsson, 2003).

Estudos recentes de assinaturas e motivos típicos presentes nas seqüências deduzidas de aminoácidos de UCPs identificadas em vários organismos, demonstraram similaridades significativas entre a UCP4 de mamíferos e as outras UCPs descritas. Com base em tais resultados foi sugerida a hipótese de que a UCP4 seria a proteína ancestral a partir da qual teriam evoluído as demais UCPs (Hanák e Ježek, 2001).

1.3. MODELOS DO MECANISMO DE TRANSPORTE DE PRÓTONS

O mecanismo de regulação da atividade bioquímica das UCPs ainda não está claro, mas, de maneira geral, a ativação por ácidos graxos e a inibição por PNs é bem aceita. Tem aumentado na literatura, entretanto, o número de publicações que relatam à existência de ativadores fisiológicos alternativos ou co-fatores que seriam necessários para a ativação destas proteínas. A necessidade de co-fatores como o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) para a ativação destas proteínas parece dar suporte ao seu papel na regulação da produção de EROs mitocondrial.

Dois modelos foram propostos para explicar o mecanismo através dos quais os ácidos graxos ativam o transporte de prótons via UCP: o modelo tamponante (Winkler e Klingenberg, 1994) e o modelo protonoforético (Garlid *et al.*, 1996; 1998; 2000). O modelo tamponante (Figura 2A) propõe que os ácidos graxos se ligam a sítios localizados junto ao canal de prótons da UCP, formado por dois resíduos de histidina, criando grupos aceptores/doadores de elétrons que facilitariam o transporte de H⁺. Nesse contexto, mutações introduzidas nos resíduos His145 e His147 (correspondentes ao citado canal de prótons) são capazes de abolir o transporte de prótons pela UCP1 de mamíferos (Bienengraeber *et al.*, 1998). Existem, entretanto, controvérsias em relação ao modelo tamponante, uma vez que as UCPs de plantas não apresentam resíduos de histidina nessas posições e continuam capazes de realizar o desacoplamento e o transporte de prótons dependente de ácidos graxos livres (Ježek *et al.*, 1996; 1997). O mesmo é verdadeiro para a UCP2 de mamíferos.

No modelo protonoforético (Figura 2B), as proteínas desacopladoras mitocondriais funcionam como um carreador de ânions, exportando ácidos graxos livres desprotonados para monocamada externa da membrana mitocondrial interna, os quais posteriormente penetram na monocamada interna na forma protonada por um

mecanismo de *flip-flop*, deixando um próton na matriz mitocondrial para cada ciclo de transporte (Garlid *et al.*, 1996, 1998; 2000; Ježek *et al.*, 1997). Uma forte evidência para este modelo de *flip-flop* foi observada em experimentos de reconstituição da UCP1 nativa, nos quais o *undecanesulfonate* (pK~2, um ânion em pH neutro) foi transportado pela UCP1 (Garlid *et al.*, 1996; Ježek *et al.*, 1999). A ativação da UCP1 por *undecanesulfonate* também foi demonstrada em mitocôndrias isoladas, sendo que o fluxo foi inibido por GDP (Rial *et al.*, 2004).

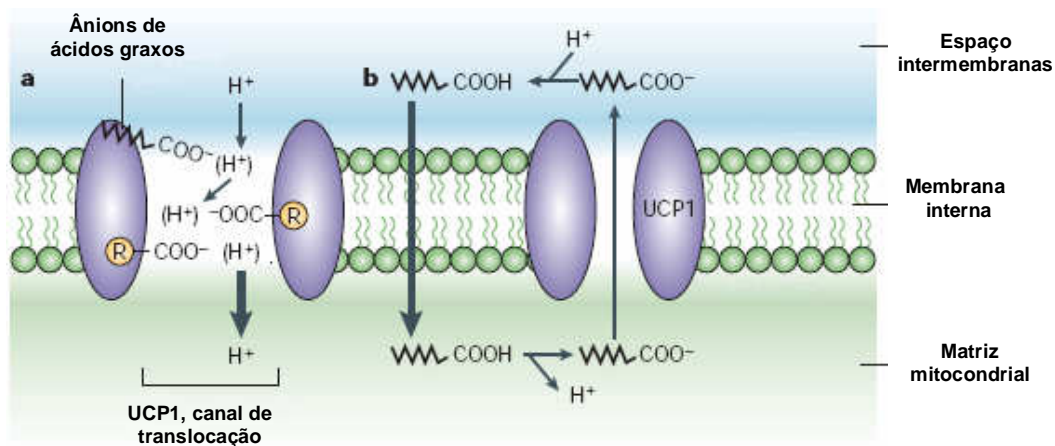


Figura 2. Modelos propostos para o transporte de prótons pelas UCPs. A) O modelo Tamponante propõe que os prótons são transportados pelas UCPs e os ácidos graxos seriam co-fatores nesse processo. B) O modelo Protonofórico propõe o transporte de ácidos graxos na forma aniônica pelas UCPs. Adaptado de Krauss e colaboradores (2005).

Recentes pesquisas demonstram que o fluxo de prótons mediado pelas UCP1, UCP2 e UCP3 pode ser ativado por EROs (ou produtos de EROs) (Echtay *et al.*, 2002; Echtay *et al.*, 2003). A primeira evidência de que EROs influenciam o desacoplamento mitocondrial mediado pelas UCPs foi fornecida quando se observou que a condutância de prótons, em presença de Coenzima-Q (Co-Q) no estado reduzido e de ácidos graxos, era inibida pela adição da enzima superóxido dismutase (Echtay *et al.*, 2002). A Co-Q foi identificada como um co-fator que regula o transporte de

prótons pelas UCPs (1, 2 e 3) em sistemas reconstituídos (Echtay *et al.*, 2000). A inibição desse transporte pela superóxido dismutase indica que a Co-Q deve mediar o desacoplamento através da produção de superóxido. A importância de EROs no desacoplamento mitocondrial ficou ainda mais evidente quando se constatou o aumento da condutância de prótons em mitocôndrias isoladas de rim na presença de xantina *plus* xantina-oxidase (um sistema exógeno que gera superóxido) (Echtay *et al.*, 2002). Essa ativação das UCPs na presença de superóxido demonstrou ser dependente de ácidos graxos, sendo abolida pela superóxido dismutase ou por GDP (50 μ M) (Echtay *et al.*, 2002).

As mitocôndrias representam a principal fonte de geração de EROs intracelular. A superprodução de EROs culmina na peroxidação de membranas fosfolipídicas e na produção de aldeídos reativos, como HNE. O HNE pode quimicamente modificar diversos resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas, como, o grupo sulfídrico da cisteína, o anel imidazol da histidina e o grupo ϵ -amino das lisinas. Além disso, tem ampla toxicidade biológica provocando a inibição da síntese de DNA e proteínas, a inativação de enzimas, a modificação de lipoproteínas de baixa densidade e a modulação da expressão de genes (Esterbauer *et al.*, 1991). Adicionalmente, Echtay e colaboradores (2003) demonstraram que concentrações fisiológicas de HNE induzem o desacoplamento mitocondrial mediado pelas UCPs (UCP1, 2 e 3) e pelo translocador de nucleotídeos adenina (ANT; do inglês *adenine nucleotide translocase*). As modificações covalentes geradas por HNE nas UCPs foram propostas como um mecanismo molecular de ativação das UCPs (Echtay *et al.*, 2003).

No modelo proposto por Murphy e colaboradores (2003), o superóxido presente na matriz mitocondrial estimularia as UCPs pela inativação de enzimas que

contém centros ferro-enxofre (FeS) como a aconitase, promovendo a liberação de Fe^{2+} . Na presença de peróxido de hidrogênio, os íons de ferro reagem formando radicais hidroxilas (OH), os quais geram radicais no carbono central dos fosfolípídeos iniciando o processo de peroxidação lipídica. Foi demonstrado que produtos da peroxidação lipídica, como o HNE, podem ativar as UCPs de mamíferos e plantas (Considine *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004), por um mecanismo de “*feedback* negativo”, diminuindo a produção de EROs. Como o HNE pode ativar diferentes UCPs, Smith e colaboradores (2004) sugeriram que o mecanismo básico de ativação destas proteínas é conservado.

Apesar de tais evidências, a relação entre o HNE e as proteínas desacopladoras mitocondriais ainda permanece controversa. Evidências experimentais obtidas por Shabalina e colaboradores (2006) demonstraram que o HNE pode induzir um desacoplamento mitocondrial não inibido por nucleotídeos purínicos, logo, independente da atividade da UCP1. Neste caso, os autores sugerem que a condutância de prótons observada é na realidade estimulada pelo ácido hidroxinonenóico gerado durante a oxidação do HNE pela aldeído-desidrogenase. Esses resultados indicam que a UCP1 parece não estar fisiologicamente envolvida na defesa contra o estresse oxidativo (Shabalina *et al.*, 2006). Em concordância com os dados de Shabalina e colaboradores (2006), a proteína desacopladora mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* quando reconstituída em lipossomos promove um fluxo de prótons induzido por ácidos graxos, o qual não é aumentado na presença de HNE (Fávaro *et al.*, 2007) (Ver Capítulo I).

Em um estudo recente, Cannon e colaboradores (2006) procuraram investigar *in vivo* a regulação da UCP1 por EROs usando como modelo camundongos capazes de superexpressar a superóxido dismutase. Para comprovar a hipótese de que as UCPs

são reguladas por superóxido *in vivo* como observado em sistemas isolados, esses autores basearam-se na evidência de que a atividade da UCP1 em animais é repercutida na forma de uma resposta metabólica específica em resposta a injeções de norepinefrina (aumento do consumo de oxigênio). Por lógica, se a diminuição dos níveis de superóxido provocada pela superexpressão da superóxido dismutase deve conduzir a uma redução da atividade da UCP1 *in situ*, uma menor resposta à injeção de norepinefrina nos camundongos capazes de superexpressar a superóxido dismutase seria esperada. Entretanto, a resposta obtida foi exatamente a mesma quando comparada com camundongos selvagens, indicando que a atividade da UCP1 não é regulada por EROs ou por produtos de EROs. Quanto aos outros membros da família das proteínas desacopladoras, os autores sugerem que novos estudos têm que ser realizados para confirmar tal possibilidade.

Como mencionado anteriormente, o controle da inibição do fluxo de prótons por PNs é normalmente adotado como um diagnóstico da atividade das UCPs. A perda da inibição por PNs pode estar relacionada com a presença de $MgCl_2$, já que o Mg^{2+} pode formar um complexo com ATP (Ježek *et al.*, 1988). Essa inibição parece ser dependente do pH (Borecký *et al.*, 2001b). Um terceiro fator regulatório refere-se ao estado redox da ubiquinona (Co-Q), já que nenhuma inibição por PNs foi observada quando Co-Q estava predominantemente no estado reduzido (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2004).

1.4. ATIVIDADE BIOQUÍMICA DE UCPs MUTANTES

Nos últimos anos, experimentos funcionais empregando proteínas mutantes geraram dados que foram imprescindíveis para esclarecer os mecanismos de transporte de H^+ pelas UCPs (revisado em Klingenberg e Echtay, 2001). Utilizando a

UCP1 de mamíferos como modelo, importantes aminoácidos envolvidos nesse transporte foram identificados, como por exemplo, uma cisteína C-terminal (Cys304) capaz de modular tal atividade (González-Barroso *et al.*, 1996).

Um ponto polêmico normalmente abordado nos ensaios de mutação sítio-dirigida refere-se à importância de um par de histidinas no transporte de H⁺ pelas UCPs. Como mencionado anteriormente, segundo o modelo tamponante, esse par de histidinas (H145 e H147), localizado no segundo segmento matricial da UCP1, é postulado essencial para o transporte de H⁺ (Bienengraeber *et al.*, 1998). Entretanto, em estudo empregando proteínas quiméricas entre a UCP1 e a UCP3, realizado por Hagen e Lowell (2000), foi demonstrado que a ativação da UCP1 por ácidos graxos é mediada pelo segundo domínio repetido, mesmo quando neutralizadas as cargas de tais histidinas (H145Q e H147N). Jiménez-Jiménez e colaboradores (2006a) identificaram que a região essencial para a alta afinidade por ácidos graxos na UCP1 é o *loop* matricial contido no segundo domínio repetido. Recentemente, um trecho de oito aminoácidos da UCP1 (incluindo o referido par de histidinas) foi substituído pelo trecho homólogo da UCP2 (que não apresenta o par de histidinas), e nenhuma alteração no transporte de prótons foi observada (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2006b). Mostrou-se ainda que a substituição de Glu134 e Met140 aboliu a permeabilidade basal de prótons da UCP1 enquanto que a ativação por ácidos graxos foi conservada e sua inibição por PNs também.

Um resíduo amplamente conservado que também tem influência no transporte de prótons é a arginina 152, com exceção da UCP3. Quando Arg152 foi neutralizado em UCP1, uma redução de 50% na afinidade por ácidos graxos bem como na atividade da proteína foi observada (Urbankóvá *et al.*, 2003). No mesmo estudo foram realizadas mutações de neutralização de alguns resíduos presentes na

primeira α -hélice da UCP1 (Asp27, Thr30 e Asp27), demonstrando que os mesmos estão envolvidos na atividade de transporte dos ácidos graxos pela UCP1.

Análises de proteínas mutantes também foram fundamentais para identificar resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação aos PNs ou atuando como sensores de pH durante a ligação. Três argininas conservadas (Arg83, Arg182 e Arg276; Modrianský *et al.*, 1997; Echaty *et al.*, 2001) e três resíduos adicionais (Phe267, Lys268 e Gly269; Bouillaud *et al.*, 1994) foram identificados como essenciais para a ligação com PN. Por outro lado, um ácido glutâmico em posição 190 da sequência de aminoácidos da UCP1 atua como sensor de pH no processo de ligação com os PNs (Echtay *et al.*, 1997).

Em contraste com os numerosos estudos objetivando elucidar a relação estrutura-função das UCPs de mamíferos, em plantas, somente dois trabalhos podem ser encontrados na literatura (ZmUCP - Fávoro *et al.*, 2006 e AtUCP1 - Fávoro *et al.*, 2007) (Ver Capítulo I).

1.5. PROTEÍNAS DESACOPLADORAS MITOCONDRIAIS DE PLANTAS

A existência de uma proteína desacopladora em plantas só foi evidenciada em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) por Vercesi e colaboradores em 1995, sendo a mesma denominada PUMP (do inglês *plant uncoupling mitochondrial protein*). Entretanto, nos dias atuais, a comunidade científica adotou a sigla pUCP (do inglês *plant uncoupling protein*). Dois anos depois, Ježek e colaboradores (1997) realizaram os primeiros experimentos de reconstituição em lipossomos com frações mitocondriais extraídas de tubérculos de batata e enriquecidas com uma possível proteína desacopladora. Demonstrou-se nesse trabalho que tal proteína era capaz de transportar H^+ por um mecanismo cíclico de ácidos

graxos com características bioquímicas muito semelhantes a da UCP1 de tecido adiposo marrom de mamíferos, exceto na capacidade de transporte de íons Cl^- .

Nos anos subsequentes foram clonados os primeiros cDNAs que codificavam pUCPs em batata (*StUCP*; Laloi *et al.*, 1997) e em *A. thaliana* (*AtUCP1*; Maia *et al.*, 1998). Após esses dois relatos, diversos cDNAs que codificam para pUCPs foram identificados e isolados em diferentes espécies vegetais (revisado em Vercesi *et al.*, 2006), incluindo dicotiledôneas [*StUCP* em batata (Laloi *et al.*, 1997); *AtPUMPI* e 2 em *A. thaliana* (Maia *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 1999); *SfUCP* em repolho (Ito *et al.*, 1999) e *HmUCPa* em *Helicodiceros muscivorus* (Ito *et al.*, 2003)], e monocotiledôneas [*WhUCP* em trigo (Murayama e Handa, 2000), *OsUCP* em arroz (Watanabe *et al.*, 2002), *ZmPUMP* em milho (Brandalise *et al.*, 2003a)].

Borecký e colaboradores (2001b) realizaram a mais completa caracterização bioquímica de uma pUCP. Nesse trabalho, a *AtUCP1* foi expressa em *Escherichia coli* e uma fração enriquecida foi reconstituída em lipossomos. O fluxo de prótons observado foi induzido por ácidos graxos livres e inibido por PNs de maneira dependente do pH. O mesmo sistema de reconstituição também foi utilizado para caracterizar bioquimicamente a primeira pUCP de uma monocotiledônea (Fávaro *et al.*, 2006). Nesse caso, verificou-se que o fluxo de prótons induzido por ácido linoléico mediado pela *ZmUCP* apresentou valores de K_m e V_{max} próximos àqueles descritos para outras UCPs isoladas de plantas dicotiledôneas (Borecký *et al.*, 2001b). A cinética de inibição para essa proteína demonstrou uma inibição mista tipo não competitiva para PNs. Em 2007, um estudo abrangente de relação estrutura-função da pUCP de *A. thaliana* foi publicado (Fávaro *et al.*, 2007) (Ver Capítulo I).

Análises recentes *in silico* identificaram famílias multigênicas codificando pUCPs em *A. thaliana* (seis genes denominados *AtUCP1-6*) e cana-de-açúcar (cinco

genes denominados *SsUCP1-5*) (Borecký *et al.*, 2006). No estudo conduzido por Borecký e colaboradores, o perfil de expressão desses genes em diferentes órgãos/tecidos foi investigado. Em *Arabidopsis*, dos seis genes descritos, três (*AtUCP1*, *AtUCP4* e *AtUCP5*) apresentaram expressão ubíqua, um (*AtUCP2*) foi expresso exclusivamente em sílica verde e raiz, e outro (*AtUCP3*) detectado exclusivamente em raiz. Por outro lado, não foi possível detectar os transcritos do gene *AtUCP6*, sugerindo tratar-se de um pseudogene ou de um gene com níveis muito baixos de expressão. Os genes *AtUCP2* e *AtUCP6* se encontram nos segmentos terminais opostos do cromossomo 5. Em função de tais genes estarem localizados próximos às regiões duplicadas do genoma de *Arabidopsis*, foi sugerido que os mesmos tenham surgido por eventos de duplicação. Os transcritos correspondentes aos genes *AtUCP4* e *AtUCP5* foram os mais abundantes.

Em cana-de-açúcar, uma análise *in silico* no banco de dados do SUCEST (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br>) mostrou um maior acúmulo de transcritos das *SsUCPs* em bibliotecas de cDNA geradas a partir de tecidos proliferativos ou altamente fotossintetizantes (gemas laterais ou flores imaturas), sugerindo uma importância funcional das pUCPs nesses tecidos (Borecký *et al.*, 2006).

Estudos de expressão gênica têm demonstrado que as pUCPs têm sua expressão modulada em diversas situações ambientais. A resposta à exposição à baixa temperatura demonstra a existência de dois grupos distintos de genes: os induzidos *i.e.* *StUCP* em batata (Laloi *et al.*, 1997), *AtUCP1*, *AtUCP4* e *AtUCP5* em *A. thaliana* (Borecký *et al.*, 2006), *SsUCP4* e *SsUCP5* em cana-de-açúcar (Borecký *et al.*, 2006) e *SfUCP* em repolho (Ito *et al.*, 1999); e os que não respondem a este tipo de indução *i.e.* *WhUCP* em trigo (Murayama e Handa, 2000), *AtUCP2* em *A. thaliana* (Watanabe *et al.*, 1999; Borecký *et al.*, 2006), arroz (Watanabe e Hirai, 2002), *SsUCP1*, *SsUCP2*

e *SsUCP3* em cana-de-açúcar (Borecký *et al.*, 2006) e *ZmUCP* em milho (Brandalise *et al.*, 2003a). A indução da expressão das pUCPs em resposta a baixas temperaturas gera evidências de um possível envolvimento dessas proteínas com a geração de calor. Embora a função termogênica nunca tenha sido evidenciada como no caso da UCP1 de mamíferos, um estudo recente relata que a co-expressão das proteínas dissipadoras de energia (oxidase alternativa e UCP) nos espádices da planta termogênica *Symplocarpus* seria responsável pela geração de calor nesse órgão especializado (Onda *et al.*, 2008).

Além da indução por baixas temperaturas, algumas pUCPs são induzidas em diferentes situações de estresse como fermento (Cheong *et al.*, 2002), ataque de patógenos (Van Wees *et al.*, 2003; Whitham *et al.*, 2003), estresse salino e osmótico (Trono *et al.*, 2006), programa de morte celular induzido por calor (Swidzinski *et al.*, 2002) bem como em resposta a determinados fitohormônios como por exemplo o ácido abscísico (ABA) (Seki *et al.*, 2002). Situações ambientais adversas como as descritas estimulam a produção celular de EROs pelos aparatos fotossintéticos e pela respiração mitocondrial, sendo bastante provável que os genes que codificam pUCPs sejam induzidos em tais situações.

Corroborando tal hipótese, diversas linhas têm evidenciado que a principal função do desacoplamento da respiração mitocondrial mediado pelas pUCPs é relacionada à produção de EROs (Kowaltowski *et al.*, 1998; Pastore *et al.*, 2000). A geração de EROs pela mitocôndria é um processo contínuo e fisiológico em condições aeróbicas. Uma pequena fração (até 2%) do oxigênio sofre redução monoeletrônica, gerando anions de superóxido (O_2^-) (Liu *et al.*, 1997). Apesar de sua moderada reatividade em solução aquosa, o O_2^- pode gerar EROs altamente citotóxicas como H_2O_2 e radicais hidroxilas (OH). Em condições fisiológicas, as mitocôndrias possuem

um eficiente sistema de defesa antioxidante, representado pelas enzimas superóxido dismutase, peroxidase glutadiona, redutase glutadiona, NAD(P) transhidrogenase e outros compostos como glutationa (GSH), NADPH, vitaminas E e C (Vercesi e Hoffmann, 1993). Sob condições desfavoráveis, entretanto, ocorre uma maior exigência quanto à capacidade do sistema antioxidante celular (Vercesi *et al.*, 1997), e na maioria das vezes, a célula é incapaz de suprir tal demanda tendo como resposta a intolerância/impotência funcional do sistema, o que pode causar uma disfunção mitocondrial (Vercesi e Hoffmann, 1993).

No trabalho de Dlasková e colaboradores (2006) observou-se, em sementes de milho germinadas e submetidas a estresse salino, um aumento na transcrição do gene *ZmUCPI*, cujos níveis de proteína estariam neutralizando o aumento da produção de EROs sob condições de estresse. Em mitocôndrias isoladas de trigo a atividade da pUCP em resposta a estresse osmótico em trigo demonstrou ser modulada por EROs através de um mecanismo de retroalimentação, sugerindo que a pUCP deve atuar, de forma indireta, como um sistema antioxidante de defesa (Pastore *et al.*, 2007). Nesse contexto, alguns genes que codificam pUCP apresentam um maior acúmulo de transcritos em plantas expostas a agentes que geram estresse oxidativo, como menadiona e H₂O₂ (Brandalise *et al.*, 2003a; Desikan *et al.*, 2001). No trabalho de Brandalise e colaboradores (2003a) foi observada a indução do gene *ZmUCP* (ou *ZmPUMP*) em resposta a estresse oxidativo gerado pela aplicação exógena de menadiona ou peróxido de hidrogênio. Em sintonia com tais observações foi verificada que a superexpressão da *AtUCPI* em plantas transgênicas de tabaco conduziram ao aumento da tolerância ao estresse oxidativo (Brandalise *et al.*, 2003b). Já em um estudo com abordagem proteômica em que se avaliou o impacto de estresses ambientais no mitoproteoma da ervilha, um aumento no conteúdo da pUCP

em resposta a seca, mas não a baixa temperatura e ao estresse oxidativo, foi observado (Taylor *et al.*, 2005).

Por outro lado, segundo Trono e colaboradores (2006), plântulas jovens de trigo quando submetidas a estresse salino e osmótico não demonstraram um relevante aumento no nível de expressão gênica das duas isoformas de pUCPs presentes nessa espécie. Entretanto, um aumento na atividade desacopladora dos produtos gênicos correspondentes foi observado, indicando que o estresse em questão deve modular a atividade e não a expressão dos genes relacionados.

Alguns relatos da literatura demonstram também que alguns genes que codificam pUCPs são regulados temporalmente, especialmente durante o processo de maturação de frutos. Uma expressão fortemente aumentada desses genes foi observada em frutos de manga em estágio de senescência (Considine *et al.*, 2001) e nos estágios tardios da maturação de frutos de tomate mantidos na própria planta (Holtzapffel *et al.*, 2002). Estes dados corroboram com o maior acoplamento encontrado em mitocôndrias isoladas de tomates verdes quando comparado com mitocôndrias de tomates vermelhos (Costa *et al.*, 1999) e sugerem uma participação dessa proteína em determinados estágios da maturação de frutos climatéricos.

Diante do exposto é possível concluir que a função fisiológica das pUCPs ainda não está totalmente estabelecida, havendo indícios de sua participação em diferentes processos fisiológicos que vão desde a geração de calor ao controle indireto da produção de EROs. Recentemente uma evidência da participação da AtUCP1 na regulação da energia metabólica *in planta* foi fornecida (Sweetlove *et al.*, 2006). Plantas de *Arabidopsis* onde o gene *AtUCP1* foi nocauteado apresentaram restrições fotossintéticas que resultaram em uma reduzida taxa de assimilação do carbono. A ausência do gene *AtUCP1* resultou ainda em estresse oxidativo localizado, mas não

afetou a capacidade da planta em tolerar determinados estresses abióticos (Sweetlove *et al.*, 2006).

1.6. DESACOPLAMENTO MITOCONDRIAL EM PLANTAS

A taxa de respiração e da síntese de ATP pode ser regulada pela disponibilidade de substrato (equivalentes reduzidos, ADP e O₂) e pela diminuição do acoplamento entre a respiração e a fosforilação. A regulação por substratos é complexa, desde que suas concentrações são raramente ideais, porque o metabolismo dos eucariontes tem uma variação na demanda de energia (Borecký e Vercesi, 2005). Em plantas, o acoplamento entre respiração e fosforilação pode ser regulado por dois processos: pelo sistema de dissipação do potencial redox (mecanismo intrínseco) representado pela Oxidase Alternativa (AOx) e pela NAD(P)H desidrogenase (revisado em Rasmusson *et al.*, 2004) ou pelo sistema de dissipação do potencial eletroquímico (sistema extrínseco) representado pela UCP. O mecanismo de regulação intrínseca previne a formação do gradiente eletroquímico de prótons durante a respiração, enquanto que a regulação extrínseca é mediada pela dissipação do gradiente eletroquímico de prótons sem a participação da ATP-sintase (Borecký e Vercesi, 2005). Ambos os mecanismos conduzem para o mesmo efeito final, ou seja, dissipação da energia e diminuição na eficiência de fosforilação. De maneira geral, o desacoplamento deve ser benéfico na redução da produção de EROs pela cadeia respiratória e prevenindo desta forma o estresse oxidativo (Maxwell *et al.*, 1999).

As AOxs são proteínas mitocondriais de ampla distribuição nos organismos eucariontes, como plantas (Elthon *et al.*, 1989; Siedow e Umbach, 1995), fungos (Lambowitz *et al.*, 1989; Sakajo *et al.*, 1991) e outros (Clarkson *et al.*, 1989; Jarmuszkiewicz *et al.*, 1997), exceto dos animais. A AOx funciona na forma dimérica

e catalisa a ubiquinol-oxigênio oxidação/redução que não é ligada ao bombeamento de prótons, logo não contribui para a formação do gradiente eletroquímico de prótons (Milani *et al.*, 2001). A atividade dessa proteína depende da disponibilidade da concentração total de ubiquinona (Co-Q) na membrana bem como da concentração atual de O₂ na célula. A AOX torna-se ativa somente quando a concentração de Co-Q reduzida está entre 40-50%, e então sua atividade aumenta com o aumento do nível de Co-Q reduzida (Dry *et al.*, 1989). Além disso, a afinidade da AOX a O₂ depende da espécie, do tecido e da idade da planta (revisado em Borecký e Vercesi, 2005). Os dímeros da AOX podem ser covalentemente ligados por uma ponte dissulfeto e são sensíveis às propriedades do estado redox. Quando os dímeros da AOX encontram-se no estado reduzido, a sua atividade é de quatro a cinco vezes maior do que quando os mesmos estão no estado oxidado (Umbach *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995). A atividade da AOX pode ser induzida por ácido salicílico (Maxwell *et al.*, 2002), cianeto e antimicina A (Vanlerberghe *et al.*, 1994), e inibida pelos primários ácidos hidroxâmicos (Schonbaum *et al.*, 1971) como o benzohidroxâmico (BHAM), e por ácidos graxos (Minagawa *et al.*, 1992; Sluse e Jarmuszkiewicz, 2000). Uma das funções fisiológicas bem caracterizada da AOX trata do seu papel termogênico, descrito em espádices de *Arum maculatum* (Moore e Siedow, 1991), *Symplocarpus foetidus* (Berthold e Siedow, 1993), e *Sauromatum guttatum* (Rhoads e McIntosh, 1991). A energia para a termogênese é fornecida pelo aumento da respiração mitocondrial mediada pela AOX. Em plantas não termogênicas, como ressaltado anteriormente, uma das supostas funções da AOX é a prevenção da formação de EROs e a tolerância a estresses (revisado em Borecký e Vercesi, 2005; Arnholdt-Schmitt *et al.*, 2006).

A AOx e a UCP são reguladas em direções opostas por ácidos graxos livres (Sluse *et al.*, 1998), sendo esses indutores do sistema extrínseco e inibidores do sistema intrínseco. Onda e colaboradores (2008) observaram que na planta termogênica *Symplocarpus renifolius* a AOx encontra-se ativa em baixas concentrações de ácido linoléico (menores que 5 μM). Nesse caso, como as UCPs e a AOx não devem trabalhar simultaneamente com suas atividades máximas, uma diferença fisiológica funcional entre elas fica evidente. Entretanto, em outra planta termogênica do mesmo gênero, *S. foetidus*, uma pUCP naturalmente desprovida de sua quinta região transmembrana e insensível à regulação por nucleotídeos foi descrita (Ito, 1999; Ito *et al.*, 2006). Recentemente, Onda e colaboradores (2008) observaram que nos espádices de *S. renifolius*, a referida isoforma é co-expressa com a AOx e que a ação cooperativa de ambas é determinante para a produção de calor nesse órgão. Da mesma forma, na ameba de vida livre *Acanthamoeba castellanii*, ambas as proteínas podem atuar simultaneamente com suas atividades máximas já que a AOx não é inibida por ácidos graxos e a UCP é minimamente inibida por PNs (Czarna e Jarmuszkiewicz, 2005). Nesse caso um efeito cooperativo é observado.

Diante das lacunas ainda existentes sobre as funções e propriedades bioquímicas das pUCPs, o presente trabalho procurou investigar alguns desses aspectos visando proporcionar um maior entendimento sobre tais proteínas.

2. OBJETIVOS

A presente tese teve por objetivos:

- ✓ Realizar a caracterização bioquímica da proteína desacopladora mitocondrial de milho (ZmUCP);
- ✓ Empreender estudos de relação estrutura-função em pUCPs;
- ✓ Verificar a influência de HNE na atividade desacopladora de pUCPs;
- ✓ Analisar a expressão dos diferentes genes que codificam pUCPs em *Arabidopsis thaliana* em resposta aos estresses salino e osmótico e a fitohormônios;
- ✓ Proceder à caracterização funcional das regiões promotoras dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2*.

Capítulo I. Caracterização Bioquímica das pUCPs e Estudos de Estrutura-função

Na presente tese foram gerados dois artigos científicos contendo resultados referentes à caracterização bioquímica de uma UCP de milho e estudos de estrutura-função de uma UCP de *Arabidopsis*.

O primeiro artigo (item I.1) intitulado *ZmPUMP encodes a fully functional monocot plant uncoupling mitochondrial protein whose affinity to fatty acid is increased with the introduction of a His pair at the second matrix loop* foi publicado na revista *Biochemical and Biophysical Research Communications* em março de 2006. Nesse estudo, foi empreendida a caracterização bioquímica da proteína mitocondrial desacopladora de milho (ZmPUMP). Neste estudo, a ZmPUMP foi expressa em *Escherichia coli* e solubilizada com detergentes, e então reconstituída em lipossomos visando estudos cinéticos. O fluxo de prótons induzido por ácido linoléico (LA) apresentou valores de K_m e V_{max} próximos aos descritos para pUCPs isoladas de plantas dicotiledôneas (Borecký *et al.*, 2001b). A cinética de inibição para essa proteína demonstrou uma inibição mista para nucleotídeos purínicos. Adicionalmente, a fim de investigar o papel de resíduos importantes para o transporte de H^+ , um duplo mutante de reversão (Lys147His e Ala157His) foi produzido levando-se em consideração os estudos prévios de mutações sítio-dirigidas em UCP1 (Bienengraeber *et al.*, 1998). Tais estudos descrevem um importante papel de um par de histidinas presente na UCP1 de mamíferos, mas ausentes em proteínas desacopladoras de plantas, no transporte de prótons. Nos ensaios de reconstituição, o duplo mutante obtido apresentou um aumento de 1,55 vezes da afinidade ao LA.

O segundo artigo (item I.2) intitulado *Mutational analysis of Arabidopsis*

thaliana plant uncoupling mitochondrial protein foi publicado na revista *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* em dezembro de 2007. Nesse trabalho foi realizada a caracterização bioquímica de cinco mutantes da proteína desacopladora mitocondrial de *A. thaliana* (AtUCP1). Para tal, mutações pontuais foram introduzidas na região codificadora da proteína AtUCP1, um membro típico da família de proteínas desacopladoras. Nesse caso, foram selecionados três resíduos, Lys147, Arg155 e Tyr269, localizados nas chamadas assinaturas das UCPs (Ježek e Urbánková, 2000) e dois resíduos, Cys28 e His83, encontrados especificamente em UCPs de plantas. As mudanças na atividade bioquímica, provocadas pelas mutações pontuais, foram avaliadas após reconstituição em lipossomos. O resíduo Arg155 parece ser crucial para a afinidade ao LA, enquanto que o resíduo His83 tem uma importante função na atividade de transporte da AtUCP1. Os resíduos Cys28, Lys147 e também Tyr269 demonstraram ser essenciais para a correta função da proteína, sendo que suas substituições afetaram respectivamente, a afinidade ao LA e sua atividade de transporte, ou a sensibilidade aos inibidores (nucleotídeos purínicos - ATP e GDP). Uma observação interessante é que a substituição do resíduo Cys28 levou a uma redução de 4,0 vezes dos efeitos inibitórios do ATP, enquanto que a proteína contendo a mutação Tyr269Phe exibiu um aumento de 2,8 vezes para a sensibilidade a ATP, corroborando os resultados obtidos com o mutante de reversão Phe267Tyr da UCP1 de mamíferos (Bouillaud *et al.*, 1994). Além de avaliar os efeitos de tais mutações na atividade bioquímica da proteína, nós decidimos investigar os efeitos do HNE como um indutor das proteínas descopladoras mitocondriais de plantas. Em concordância com os dados de Shabalina e colaboradores (2006), foi possível observar que o HNE não é capaz de alterar o transporte de prótons via proteína desacopladora mitocondrial de *A. thaliana* em sistema reconstituído.

I.1. Artigo 1: *ZmPUMP* encodes a fully functional monocot plant uncoupling mitochondrial protein whose affinity to fatty acid is increased with the introduction of a His pair at the second matrix loop

***ZmPUMP* encodes a fully functional monocot plant uncoupling mitochondrial protein whose affinity to fatty acid is increased with the introduction of a His pair at the second matrix loop**

Regiane Degan Fávaro ^a, Jiri Borecký ^b, Débora Colombi ^a, Ivan G. Maia ^{a,*}

^a Instituto de Biociências, Departamento de Genética, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^b Laboratório de Bioenergética, Faculdade de Ciências Médicas (NMCE), UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Received 14 March 2006

Abstract

Uncoupling proteins (UCPs) are specialized mitochondrial transporter proteins that uncouple respiration from ATP synthesis. In this study, cDNA encoding maize uncoupling protein (*ZmPUMP*) was expressed in *Escherichia coli* and recombinant *ZmPUMP* reconstituted in liposomes. *ZmPUMP* activity was associated with a linoleic acid (LA)-mediated H⁺ efflux with K_m of $56.36 \pm 0.27 \mu\text{M}$ and V_{\max} of $66.9 \mu\text{mol H}^+ \text{min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$. LA-mediated H⁺ fluxes were sensitive to ATP inhibition with K_i of $2.61 \pm 0.36 \text{mM}$ (at pH 7.2), a value similar to those for dicot UCPs. *ZmPUMP* was also used to investigate the importance of a histidine pair present in the second matrix loop of mammalian UCP1 and absent in plant UCPs. *ZmPUMP* with introduced His pair (Lys155His and Ala157His) displayed a 1.55-fold increase in LA-affinity while its activity remained unchanged. Our data indicate conserved properties of plant UCPs and suggest an enhancing but not essential role of the histidine pair in proton transport mechanism.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Uncoupling mitochondrial protein; UCP; Proton transport; Functional reconstitution; Mitochondrial carriers; Plant mitochondria; Maize

Mitochondrial inner membrane uncoupling proteins (UCP) are specialized free fatty acid (FFA)-linked H⁺ recycling proteins, returning protons that have been expelled from matrix by the respiratory chain, thus promoting a non-phosphorylating bypass [1,2]. The first characterized uncoupling protein from brown adipose tissues, UCP1, promotes heat production through regulated mitochondrial uncoupling [3,4].

The finding of a UCP-like protein in potato [5] denoted that all UCPs probably evolved from a common ancestral protein preceding the divergence of animals and plants [6]. Despite several years of biochemical and physiological experimentation, the precise role of the uncoupling proteins in plants still remains unclear. It has been proposed that UCP-mediated mild uncoupling of mitochondrial respiration could regulate reactive oxygen species production

[7,8]. Indeed, over-expression of an uncoupling protein from *Arabidopsis thaliana* (*AtPUMP1*) in transgenic plants led to a higher tolerance to oxidative stress [9]. Further support to this antioxidant role was recently provided in mammals and plants [10,11]. Energy-dissipating systems such as the one related to uncoupling proteins could also have important implications in general energy metabolism [1,6].

Several cDNAs encoding UCP-like proteins have been identified in a variety of plant species, in both dicots (*AtPUMP1* and 2 in *Arabidopsis* [12,13], *StUCP* in potato [14], *SfUCP* in skunk cabbage [15]) and monocots (*WhUCP* in wheat [16], *OsUCP* in rice [17], and *ZmPUMP* in maize [18]). Although the genes are widely present in various plant species, only dicot proteins have been biochemically and functionally characterized as uncoupling proteins at present [14,19–22]. In fact, a survey of the literature reveals only one report demonstrating an activity reminiscent of UCP in a monocot species [23]. Preliminary biochemical data were derived from reconstitution

* Corresponding author. Fax: +55 14 3815 3744.

E-mail address: igmaia@ibb.unesp.br (I.G. Maia).

experiments using UCP-enriched fractions purified from potato and tomato [19,20]. Subsequently, the uncoupling activity was investigated using isolated cDNAs and heterologous expression systems. The uncoupling protein from potato (StUCP), for example, was expressed in yeast and shown to promote proton transport [14]. A more precise biochemical characterization was achieved using recombinant AtPUMP1 expressed in *Escherichia coli* and reconstituted into liposomes [21]. In this regard, the major properties of the uncoupling activity of plant UCPs matched those described for their mammalian counterpart, i.e., stimulation by FFA and specific inhibition by purine nucleotides. However, more recent data suggest that superoxide is involved in the activation of StUCP [11].

Whereas the dicot proteins are functionally well characterized, for instance there is no experimental evidence showing whether UCPs from monocots keep the same regulatory properties. A common feature of all known plant UCPs is the absence of a histidine pair in the matrix loop of the second repeat domain of the protein. These residues have been shown, by mutagenesis studies, to be crucial for the FFA-activated proton transport of mammalian UCPI [24,25]. A Lys at position 155 and an Ala at position 157 replace both histidines in the primary amino acid sequence of ZmPUMP.

We have recently isolated a cDNA (termed *ZmPUMP*) encoding an uncoupling protein from maize (ZmPUMP) [18]. *ZmPUMP* expression is induced by oxidative stress and is cold insensitive [18]. This representative monocot uncoupling protein was expressed in *E. coli* inclusion bodies in order to evaluate its biochemical activity and functional relationships with proteins from dicot plants. Furthermore, we sought to investigate whether the introduction of a histidine pair in the second matrix loop segment of ZmPUMP, as originally found in UCPI, would affect the kinetic properties of the protein. For that, a ZmPUMP substitution mutant carrying a His pair at the corresponding segment was biochemically characterized.

Materials and methods

Materials. Linoleic acid (LA), nucleotides, and other chemicals were from Sigma, undecanesulfonate from Lancaster (UK), and Bio-Beads SM2 from Bio-Rad. Fluorescent probe 6-methoxy-*N*-(3-sulfopropyl)quinolinium (SPQ) was from Molecular Probes. Hybond N membranes and Hyperfilms MP were from Amersham and the CPSD (disodium 3-(4-methoxy)spiro[1.2-dioethane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decane]-4-yl)phenyl phosphate) was from Applied Biosystems (Tropix).

Construction of the *ZmPUMP* expression vector. A plasmid carrying the *ZmPUMP* cDNA [18] was used as template for polymerase chain reaction (PCR) amplification. The *ZmPUMP* coding region was amplified in a standard PCR using the gene-specific primers ZmNde (5'-GGAA TTCCATATGCCAGGGGACCACGGC-3') and ZmBam (5'-CGGGA TCCTCAGCTTGTCGCTTCC-3'). The forward and reverse primers contained *Nde*I and *Bam*HI restriction sites (underlined), respectively, for direct cloning of the PCR product. The amplified DNA fragment was digested with *Nde*I/*Bam*HI, gel purified, and cloned into identically digested pET-28b (Novagen) for protein expression. The resulting construct (pET:ZmPUMP) was sequenced in an ABI-PRISM 3100 automatic sequencer (Perkin-Elmer).

Expression of *ZmPUMP*, isolation of inclusion bodies, and analysis of the recombinant protein. *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS cells were transformed with the vector pET:ZmPUMP. Transformed cells were grown in Circle Grow medium containing kanamycin (20 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml) at 37 °C and induced by 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h. The cells were harvested by low-speed centrifugation, resuspended in lysis buffer [100 mM Tris-HCl, pH 7, 0.5 mM EDTA, and 5 mM dithiothreitol (DTT)], and submitted to six freezer-thaw cycles (liquid nitrogen/37 °C). Further lysis of the cells and break of genomic DNA were achieved by sonication (6 × 30 s). The suspension was centrifuged (20,000g for 30 min), the pellets of inclusion bodies were collected and washed three times with 1 M urea containing 1% Triton X-100. The denaturants were washed out in final wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, and 2 mM DTT).

The expressed protein was analyzed by SDS-PAGE (0.1% SDS, 12% polyacrylamide) stained with Coomassie blue. Immunoblot assays were performed according to standard protocols using anti-AtPUMP1 polyclonal antibodies [21] diluted 1:1000. The bands were detected by autoradiography using CSPD (1:2000).

Reconstitution of *ZmPUMP* and fluorescent monitoring of H^+ fluxes. Reconstitution of the recombinant protein was performed essentially as described by Borecký et al. [21] with minor modifications. Four milligrams of inclusion bodies was washed twice in 1 ml of internal medium [IM; 28.8 mM tetraethylammonium *N*-tris [hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulfonate (TEA- TES ; $[TES^-]_{free} = 9.2$ mM), pH 7.2, 84.4 mM TEA_2SO_4 , and 0.6 mM TEA-EGTA]. The pellet was solubilized in 1 ml of IM containing 1.67% sodium lauroylsarcosinate and 1% decylpolyoxyethylene (decylPOE) at 4 °C for 2.5 h. The insoluble fraction was removed by centrifugation. This procedure yielded a crude preparation (with a negligible contamination by inclusion body proteins) used for reconstitutions.

Lipid film was prepared from ethyl ether solution of 39 mg egg yolk lecithin, 1.66 mg cardiolipin, and 0.66 mg phosphatidic acid by stream of nitrogen. The film was hydrated in 875 µl of IM by vortexing at 50 °C under nitrogen and solubilized by adding 56 mg of decylPOE. The micelles were cooled down on ice, mixed with 2 mM SPQ probe plus solubilized ZmPUMP (lipid/protein ratio of 410:1), and then incubated in a column of Bio-Beads SM2 at 4 °C for 2.5 h. Proteoliposomes were recovered by centrifugation. Traces of detergent were removed by reincubation of proteoliposomes with fresh Bio-Beads for 10 min and recentrifugation. External SPQ was removed by gel-filtration through Sephadex G25-300 spin column. All columns were pre-washed with IM. The resulting proteoliposomes contained ~100 µg of incorporated protein.

H^+ flux assays were based on the quenching of SPQ fluorescence by TES^- [26]. Vesicles (30 µl) were added to 1.5 ml of external medium (EM; 28.8 mM TEA- TES [9.2 mM TES^-], pH 7.2, 84.4 mM K_2SO_4 , and 0.6 mM TEA-EGTA). Linoleic acid was added after 20 s and, 20 s later, an H^+ efflux was initiated by 1.3 µM valinomycin. The fluorescence was calibrated to $[H^+]$ by the addition of 10 aliquots of 6 µmol of KOH in the presence of 1.5 µM nigericin to proteoliposomes suspended in IM. Fluorescent data were converted into " H^+ traces" by fitting with modified Stern-Volmer equation

$$[H^+] = (1/K_q) \cdot (F_0 - F)/(F - L), \quad (1)$$

where F is the experimental and F_0 , the unquenched fluorescence. Parameters K_q (quenching constant) and L (background, mostly light scattering) were obtained by linear regression of F vs. $(F_0 - F)/[KOH]$ plot.

Rates of H^+ efflux were derived from " H^+ traces", multiplied by the internal proteoliposome volume (V , estimated from volume distribution of the SPQ [2]), and corrected for protein content to yield final rates in µmol H^+ min⁻¹ (mg prot)⁻¹. When expressed per µmol of PUMP dimer, rates represented the minimum values for the turnover number, since not all of the protein was inserted into the vesicles. The inhibition kinetic of ATP was determined by Lineweaver-Burk analysis varying both the LA (13.31, 19.95, 33.23, and 39.87 µM) and ATP (1.0, 1.33, 2.00, and 4.00 mM) concentrations.

Mutagenesis, bacterial expression, and reconstitution of mutant *ZmPUMP*. A ZmPUMP double substitution mutant (K155H/A157H)

was prepared using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with pET:ZmPUMP as a template. A specific primer (5'CAGG CCGAGGGCCACCTTACCCTGGTGTGCCA3') was designed to mutate the ZmPUMP codons Lys155 and Ala157 to a His codon. The presence of the mutations was confirmed by DNA sequencing. Expression in *E. coli* and reconstitution of the mutant protein were accomplished as described for wild type ZmPUMP.

Results

Expression of wild type ZmPUMP in *E. coli*

The entire reading frame of ZmPUMP was cloned into the expression vector pET-28b under the control of an IPTG-inducible promoter and *E. coli* BL21(DE3) cells were transformed with this construct in order to generate a recombinant protein. The induction of the cells at 37 °C for 3 h produced a polypeptide bearing a His tag with an apparent molecular mass of 36 kDa (Fig. 1A, compare lanes 1 and 2) that was present in the inclusion body fraction (Fig. 1A, compare lanes 3 and 4). Inclusion bodies were solubilized to obtain an enriched fraction of the recombinant ZmPUMP (Fig. 1A, lane 5). The identity of the recombinant protein was confirmed by immunoblot analysis employing anti-AtPUMP1 polyclonal antibodies [21]. A reactive band with the expected mobility (36 kDa) was observed (Fig. 1B, compare lanes 3 and 4). The small amounts of protein detected in the non-induced bacterial extract were attributed to the basal level of expression normally observed.

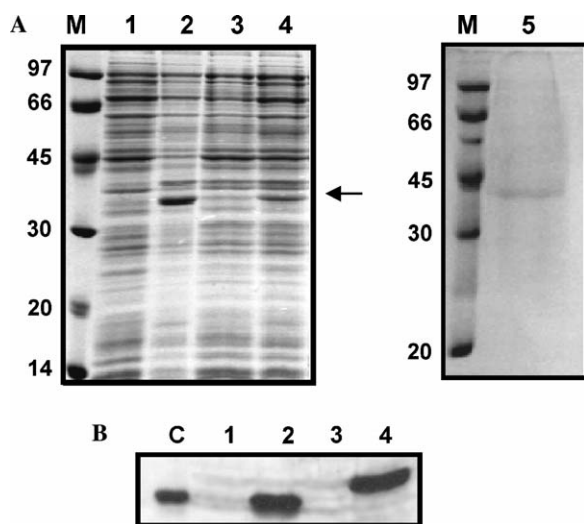


Fig. 1. Analysis of the expression of ZmPUMP by SDS-PAGE. (A) Coomassie blue staining. Lane M, protein markers (sizes in kDa); lanes 1 and 2, total proteins of non-induced and IPTG-induced *E. coli* cells, respectively; lanes 3 and 4, total proteins of soluble and inclusion body fractions, respectively; lane 5, ZmPUMP solubilized from inclusion bodies. The position of ZmPUMP is indicated (arrow). (B) Immunoblot analysis using anti-AtPUMP1 polyclonal antibodies. C, solubilized AtPUMP1 [21] used as positive control; lanes 1 and 2, total proteins of non-induced and IPTG-induced *E. coli* cells expressing AtPUMP1; lanes 3 and 4, total proteins of non-induced and IPTG-induced *E. coli* cells expressing ZmPUMP as shown in (A).

Kinetics of linoleic acid-induced ZmPUMP-mediated H^+ efflux in proteoliposomes

Fig. 2 illustrates the H^+ fluxes in proteoliposomes containing reconstituted wild type ZmPUMP. The addition of 33.23 μM LA caused vesicle acidification, indicating the redistribution of LA molecules in both leaflets of the lipid bilayer leading to internal H^+ release. H^+ efflux that represented FA cycling [2,22,27–30] was initiated by addition of 1.3 μM valinomycin.

The kinetics of LA cycling mediated by ZmPUMP was evaluated by varying the total LA concentration. Protein-independent basal H^+ fluxes were simulated in protein-free liposomes, under identical LA and valinomycin concentrations and membrane potential. Data, corrected for the different (lower) volume of proteoliposomes, were used for a theoretical estimation of the basal H^+ flux in proteoliposomes. Evaluation of the kinetics of LA cycling mediated by ZmPUMP produced a typical dose response (Fig. 3). The corresponding Eadie–Hofstee plot yielded a K_m of $56.36 \pm 0.27 \mu\text{M}$ when using an iterative procedure for evaluating the proteoliposomal basal H^+ flux (Fig. 3; inset) giving a V_{max} of $66.9 \mu\text{mol } H^+ \text{ min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$ that corresponded to minimum turnover numbers of 12.6 s^{-1} for dimeric ZmPUMP.

Inhibition of fatty acid-induced ZmPUMP-mediated H^+ efflux by ATP

The inhibition kinetics for ATP in proteoliposomes containing wild type ZmPUMP were determined in the presence of various concentrations of LA and ATP. Lineweaver–Burk analysis revealed a special mixed

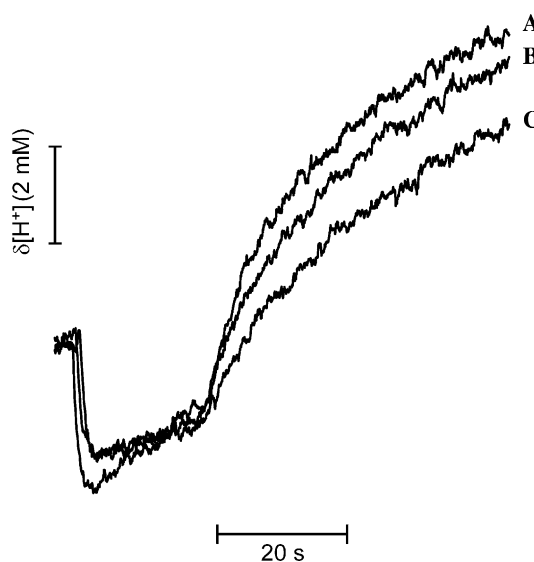


Fig. 2. Typical H^+ fluxes in proteoliposomes reconstituted with wild type ZmPUMP. The H^+ traces are depicted for a H^+ efflux in proteoliposomes containing ZmPUMP induced by 53.12 μM linoleic acid (A), 33.23 μM linoleic acid (B), and 33.23 μM linoleic acid plus 4 mM ATP (C), in the presence of 1.3 μM valinomycin at approximately 179.5 mV.

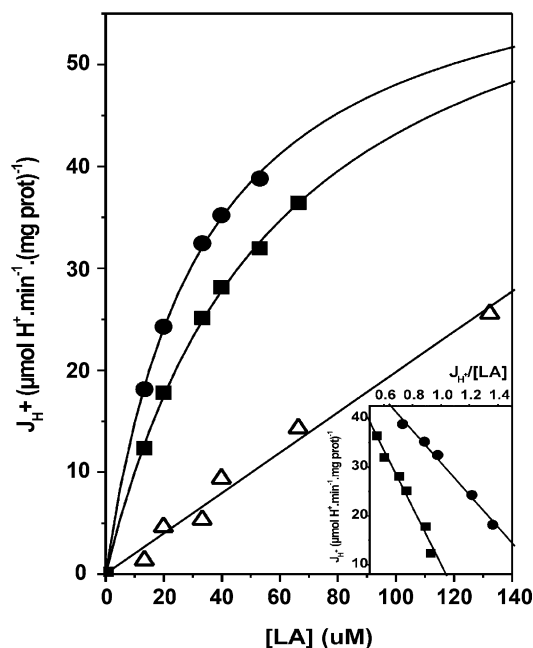


Fig. 3. Kinetics of LA-induced H^+ fluxes in protein-free liposomes (Δ) and proteoliposomes with reconstituted wild type (\blacksquare) and mutant ZmPUMP (\bullet). Measurements were conducted in the presence of $1.3 \mu\text{M}$ valinomycin. The fluxes were calculated per μg of protein to yield final rates in $\mu\text{mol } H^+ \text{ min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$. Inset shows Eadie–Hofstee plot for the kinetics of LA cycling with the kinetic data for H^+ fluxes induced by LA in proteoliposomes with wild type (\blacksquare) and mutant (\bullet) ZmPUMP.

inhibition known as noncompetitive inhibition where α is equal to α' , since the K_i values were virtually unchanged in the range of LA concentrations used. Therefore, the inhibitory effect of ATP yielded a dynamic K_i of $2.61 \pm 0.36 \text{ mM}$ at pH 7.2 (Fig. 4), when considered the even or random orientation of ZmPUMP molecules [2,19,27,30].

Effect of the K155H/A157H mutation on ZmPUMP activity

The K155H/A157H double mutant was over-expressed in inclusion bodies in *E. coli*, purified and reconstituted in proteoliposomes as described for wild type ZmPUMP. Kinetic analyses (Fig. 3) showing that the doubly mutated protein exhibited 1.55-fold higher LA-affinity ($K_m = 36.32 \pm 0.51 \mu\text{M}$) than wild type ZmPUMP ($K_m = 56.36 \pm 0.27 \mu\text{M}$) while its corresponding V_{max} value was not altered (Table 1). Thus, a clear increase in the relative efficiency of H^+ transport of the mutant protein as compared to wild type ZmPUMP was observed (Table 1). The K155H/A157H mutant also displayed a modest increase in sensitivity to ATP inhibition (about 1.3-fold; Table 1).

Discussion

In a previous study, we identified a gene coding for a maize uncoupling protein [18]. In contrast to genes

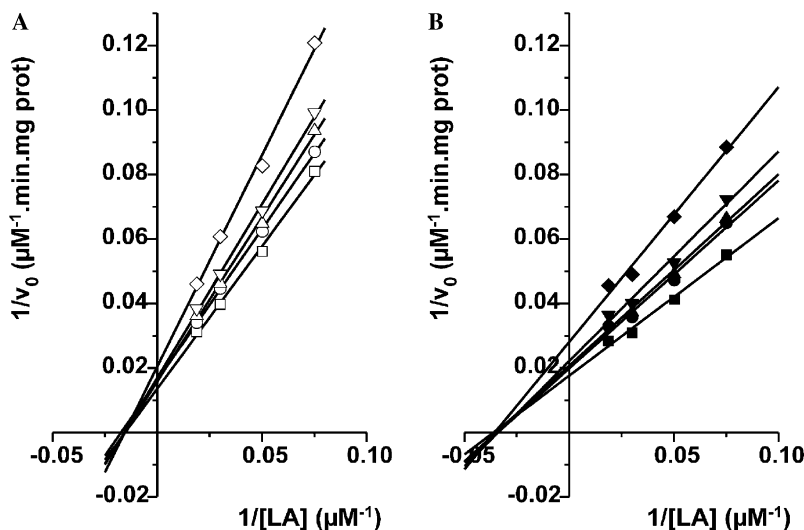


Fig. 4. Lineweaver–Burk plots for the mixed ATP inhibition of FA-induced H^+ fluxes mediated by wild type ZmPUMP (A) or the K155H/A157H mutant (B) at pH 7.2. The employed ATP concentrations were: 0 (\square, \blacksquare), 1.0 (\circ, \bullet), 1.33 ($\triangle, \blacktriangle$), 1.99 ($\nabla, \blacktriangledown$), and 3.99 mM (\diamond, \blacklozenge). Inhibition kinetic analysis of wild type ZmPUMP yielded a derived K_i of $2.61 \pm 0.36 \text{ mM}$. Inhibition kinetic analysis of the K155H/A157H double mutant yielded a derived K_i of $2.03 \pm 0.19 \text{ mM}$.

Table 1
Kinetic parameters for H^+ flux in proteoliposomes containing wild type and mutant ZmPUMP

Protein	K_m (μM)	V_{max} $\mu\text{mol } H^+ \text{ min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$	K_i (mM)	Relative efficiency $\mu\text{mol } H^+ \text{ min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
Wild type	56.36 ± 0.27	66.9	2.61 ± 0.36	1.19
K155H/A157H	36.32 ± 0.51	66.83	2.03 ± 0.19	1.84

encoding two isoforms of PUMP in rice [17], *ZmPUMP* expression resulted in full-length protein product, *ZmPUMP*, as detected immunogenetically [18]. In the present study, we biochemically characterized *ZmPUMP* as a recombinant protein expressed in *E. coli*. *ZmPUMP* was solubilized from inclusion bodies and the authenticity of the recombinant protein confirmed using polyclonal antibodies directed against *AtPUMP1* [21]. Solubilized *ZmPUMP* was reconstituted into liposomes and shown to be fully active; it induced a saturable FFA-dependent proton flux across the liposomal membrane that exceeded the non-specific and unsaturable H^+ flux observed in protein-free liposomes under the same conditions (Fig. 3). Kinetic analysis of LA-dependent H^+ fluxes yielded a $K_m = 56.36 \pm 0.27 \mu M$, a value that is close to those found for dicot PUMP from *Arabidopsis* and potato [20,21]. Moreover, the proton transport capacity of *ZmPUMP* was estimated as $66.9 \mu mol H^+ min^{-1} (mg prot)^{-1}$, which is similar to those reported for mammalian and plant UCPs [20,21,28,31].

The LA-dependent *ZmPUMP*-mediated H^+ flux was sensitive to inhibition by purine nucleotides. Kinetic analysis revealed inhibition constant $K_i = 2.61 \pm 0.36 mM$ for ATP, a value that falls into the physiological range of concentrations of intracellular ATP (2–15 mM) [32]. The inhibition constant observed is slightly higher than those estimated for recombinant *AtPUMP1* (0.85 mM) [21] and native potato UCP (0.78 mM) [20] reconstituted in liposomes. Furthermore, the kinetic analysis of *ZmPUMP* inhibition by ATP revealed a special type mixed inhibition (noncompetitive, where $\alpha = \alpha'$ hence inhibitor binds either to free or substrate-occupied *ZmPUMP* with the same rate) that contrasts the competitive inhibition of the LA-dependent potato PUMP-mediated H^+ flux by undecanesulfonate [20]. Altogether, these data confirmed that *ZmPUMP* behaves as a typical uncoupling protein.

A close analysis of the deduced amino acid sequences of the maize and *Arabidopsis* [12] uncoupling proteins revealed only 83 non-identical residues (over 310), including a monocot-specific alanine motif [18]. Nonetheless, the dicot and monocot uncoupling proteins exhibit almost the same biochemical properties. In this regard, our data suggest that the uncoupling activity catalyzed by PUMPs from monocot and dicot plants shares common regulatory mechanisms.

Contradictory results have been published concerning the role of a His pair located in the second matrix loop in modulating UCP activity. Replacement of these histidines with neutral groups (H145Q/H147N) in UCP1 reconstituted in proteoliposomes had a knockout effect on FA-dependent H^+ transport, whereas the single mutants H145Q and H147N still retained some activity (about 10%), indicating a key role of these residues in proton transport by UCP1 [24]. The results from Urbánková et al. [25] corroborated this observation demonstrating halved FA-affinity and a 70% reduction of V_{max} for an equivalent double mutant (H145L plus H147L). Discordant results were obtained when the mentioned

H145Q/H147N mutant of UCP1 was expressed in yeast mitochondria. Under these conditions, replacement of this His pair had no effect on uncoupling activity [33]. Moreover, introduction of the His pair and adjacent amino acids found in UCP1 into UCP3 (that lacks the second His) was not sufficient to promote FA activation [34], indicating that these residues are not required for FA stimulation.

The existing differences prompted us to investigate the effect of these residues on the catalytic activity of a plant uncoupling mitochondrial protein. It is worth to note that all plant UCPs lack both histidines, having lysine and apolar or serine residues at positions of the first and second histidine, respectively. The presence of a strong base (Lys) in PUMPs that substitutes two weak bases (histidines) in UCP1 could be a reason why plant UCPs are able to mediate FA-induced uncoupling. We assumed that if the His pair is functionally important, it would improve proton transport when placed in a plant UCP context. The characterization of the K155H/A157H double mutant of *ZmPUMP* has shown a 1.55-fold increase in the affinity of the mutant to LA, while its activity remained unchanged. From a mechanistic standpoint, the observed increase in LA-affinity could be a consequence of the better positive charge distribution provided by two weak histidine bases than by one strong lysine base and supports the hypothesis that the His pair is important but not essential for UCP activity. Increased affinity to LA could also be a result of a local conformational change in the second matrix loop caused by the introduced histidines.

To our knowledge, this is the first study reporting the direct functional characterization of a PUMP from a monocot species describing the kinetic of its activation by one of FAs, i.e., linoleic acid, and the kinetic of its sensitivity to inhibition by a classic UCP inhibitor, ATP. Furthermore, this study reports a first mutational analysis of plant uncoupling proteins, describing biochemical kinetic analysis of a protein with introduced His pair. Up to now, the only occurrence of PUMP activity was reported indirectly in isolated durum wheat mitochondria [23]. The authors attributed the LA-induced purine nucleotide-sensitive $\Delta\Psi$ decrease to PUMP, although they did not exclude a possible involvement of ADP/ATP antiporter in this process. Our study prevents such fact, using recombinant PUMP isolated from bacteria and characterized in liposomes, therefore the experimental set-up free of any mitochondrial protein contamination. Hence, our results suggest that the uncoupling activity in monocots can be attributed to PUMP.

More-in-depth molecular and biochemical analyses of uncoupling proteins from different plant species will not only improve our knowledge of their functional properties but also give new insights of their physiological role in the plant kingdom.

Acknowledgments

We are extremely grateful to Dr. P. Arruda and Aníbal E. Vercesi for the laboratory facilities and encouragement.

Phosphatidylcholine was a generous gift from Dr. I.M. Cuccovia (IQ/USP/Brazil). This work was funded by FAPESP (Processo 01/08726-3). R.D.F. and D.C. are supported by FAPESP. J.B. was a recipient of a postdoctoral fellowship from FAPESP. I.G.M. is a recipient of a research fellowship from CNPq.

References

- [1] D. Ricquier, F. Bouillaud, The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP, *Biochem. J.* 345 (2000) 161–179.
- [2] K.D. Garlid, D.E. Orosz, M. Modrianský, S. Vassanelli, P. Ježek, On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2615–2620.
- [3] P. Ježek, H. Engstová, M. Záčková, A.E. Vercesi, A.D.T. Costa, P. Arruda, K.D. Garlid, Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1365 (1998) 319–327.
- [4] I. Arechaga, A. Ledesma, E. Rial, The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore, *IUBMB Life* 52 (2001) 165–173.
- [5] A.E. Vercesi, I.S. Martins, M.A.P. Silva, H.M.F. Leite, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, PUMPing plants, *Nature* 375 (1995) 24.
- [6] F.E. Sluse, W. Jarmuszkiewicz, Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects, *FEBS Lett.* 510 (2002) 117–120.
- [7] A.J. Kowaltowski, A.D.T. Costa, A.E. Vercesi, Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain, *FEBS Lett.* 425 (1998) 213–216.
- [8] A.M. Smith, R.G. Ratcliffe, L.J. Sweetlove, Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51944–51952.
- [9] M. Brandalise, I.G. Maia, J. Borecký, A.E. Vercesi, P. Arruda, Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress, *J. Bioenerg. Biomembr.* 35 (2003) 203–209.
- [10] D. Arsenijevic, H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B.S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M.C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins, D. Ricquier, Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production, *Nat. Genet.* 26 (2000) 435–439.
- [11] M.J. Considine, M. Goodman, K.S. Echtay, M. Laloi, J. Whelan, M.D. Brand, L.J. Sweetlove, Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22298–22302.
- [12] I.G. Maia, C.E. Benedetti, A. Leite, S.R. Turcinelli, A.E. Vercesi, P. Arruda, AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein, *FEBS Lett.* 429 (1998) 403–406.
- [13] A. Watanabe, M. Nakazono, N. Tsutsumi, A. Hirai, AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell. Physiol.* 40 (1999) 1160–1166.
- [14] M. Laloi, M. Klein, J.W. Reismeier, B. Müller-Röber, C. Fleury, F. Bouillaud, D. Ricquier, A plant cold-induced uncoupling protein, *Nature* 389 (1997) 135–136.
- [15] K. Ito, Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*), *Plant Sci.* 149 (1999) 167–173.
- [16] S. Murayama, H. Handa, Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondria uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature, *Mol. Gen. Genet.* 264 (2000) 112–118.
- [17] A. Watanabe, A. Hirai, Two uncoupling protein genes of rice (*Oryza sativa* L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the heat-generating proteins of the subtropical cereal, *Planta* 215 (2002) 90–100.
- [18] M. Brandalise, I.G. Maia, J. Borecký, A.E. Vercesi, P. Arruda, ZmPUMP encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress, *Plant Sci.* 165 (2003) 329–335.
- [19] P. Ježek, A.D.T. Costa, A.E. Vercesi, Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 32743–32748.
- [20] P. Ježek, A.D.T. Costa, A.E. Vercesi, Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24272–24278.
- [21] J. Borecký, I.G. Maia, A.D.T. Costa, P. Ježek, H. Chaimovich, P.M.B. Andrade, A.E. Vercesi, P. Arruda, Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 505 (2001) 240–244.
- [22] W. Jarmuszkiewicz, A.M. Almeida, C. Sluse-Goffart, F.E. Sluse, A.E. Vercesi, Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 34882–34886.
- [23] D. Pastore, A. Fratiani, S.D. Pede, S. Passarella, Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria, *FEBS Lett.* 470 (2000) 88–92.
- [24] M. Bienengraeber, K.S. Echtay, M. Lingenberg, H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a Histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3, *Biochemistry* 37 (1998) 3–8.
- [25] E. Urbánková, P. Hanák, E. Škobisová, M. Růžička, P. Ježek, Substitutional mutations in the uncoupling protein-specific sequences of mitochondrial uncoupling protein UCP1 lead to the reduction of fatty acid-induced H⁺ uniport, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 212–220.
- [26] D.E. Orosz, K.D. Garlid, A sensitive new fluorescence assay for measuring proton transport across liposomal membranes, *Anal. Biochem.* 210 (1993) 7–15.
- [27] A.D.T. Costa, I.L. Nantes, P. Ježek, A. Leite, P. Arruda, A.E. Vercesi, Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening, *J. Bioenerg. Biomembr.* 31 (1999) 527–533.
- [28] M. Jabůrek, M. Vařecha, R.E. Gimeno, M. Dembski, P. Ježek, M. Zhang, P. Burn, L.A. Tartaglia, K.D. Garlid, Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26003–26007.
- [29] P. Ježek, M. Modrianský, K.D. Garlid, Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer, *FEBS Lett.* 408 (1997) 161–165.
- [30] P. Ježek, M. Modrianský, K.D. Garlid, A structure-activity study of fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling protein, *FEBS Lett.* 408 (1997) 166–170.
- [31] M. Záčková, P. Ježek, Reconstitution of novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3, *Biosci. Rep.* 22 (2002) 33–46.
- [32] W. Jarmuszkiewicz, R. Navet, L.C. Alberici, P. Douette, C.M. Sluse-Goffart, F.E. Sluse, A.E. Vercesi, Redox state of endogenous coenzyme Q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanosine triphosphate in isolated skeletal muscle mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.* 36 (2004) 493–502.
- [33] C.Y. Zhang, T. Hagen, V.K. Mootha, L.J. Sliker, B.B. Lowell, Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system, *FEBS Lett.* 449 (1999) 129–134.
- [34] T. Hagen, B.B. Lowell, Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 642–648.

I.2. Artigo 2: *Mutational analysis of Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein*

Mutational analysis of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein

Regiane Degan Fávoro^a, Jiri Borecký^b, Débora Colombi^a, Aníbal E. Vercesi^b, Ivan G. Maia^{a,*}

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^b Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina Experimental, FCM, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

Received 28 June 2007; received in revised form 5 September 2007; accepted 20 September 2007

Available online 29 September 2007

Abstract

In this study, point mutations were introduced in plant uncoupling mitochondrial protein AtUCP1, a typical member of the plant uncoupling protein (UCP) gene subfamily, in amino acid residues Lys147, Arg155 and Tyr269, located inside the so-called UCP-signatures, and in two more residues, Cys28 and His83, specific for plant UCPS. The effects of amino acid replacements on AtUCP1 biochemical properties were examined using reconstituted proteoliposomes. Residue Arg155 appears to be crucial for AtUCP1 affinity to linoleic acid (LA) whereas His83 plays an important role in AtUCP1 transport activity. Residues Cys28, Lys147, and also Tyr269 are probably essential for correct protein function, as their substitutions affected either the AtUCP1 affinity to LA and its transport activity, or sensitivity to inhibitors (purine nucleotides). Interestingly, Cys28 substitution reduced ATP inhibitory effect on AtUCP1, while Tyr269Phe mutant exhibited 2.8-fold increase in sensitivity to ATP, in accordance with the reverse mutation Phe267Tyr of mammalian UCP1.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Uncoupling protein; *Arabidopsis thaliana*; Site-direct mutagenesis; Proteoliposome; Structure–function relationship

1. Introduction

The uncoupling protein (UCP) is an integral protein of the mitochondrial inner membrane that uncouples oxidative phosphorylation. UCP mediates a fatty acid (FA)-dependent, purine nucleotide (PN)-inhibitable proton leak across the inner membrane [1] that was reported to be activated by superoxide and/or products of lipid peroxidation, such as 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) [2,3]. This effect, however, is still controversial since a more recent study provided experimental evidence that HNE can only induce mitochondrial uncoupling via its oxidative product, a hydroxynonenic acid, in a UCP-independent pathway [4].

The first uncoupling protein (UCP1) was discovered in mice brown adipocytes mitochondria [5] and was shown to be highly tissue specific. UCP1 has a specialized physiological role in

generation of metabolic (non-shivering) thermogenesis in hibernating mammals [6], in cold-adaptation of newborn mammals [7,8], and in diet-induced thermogenesis in small rodents [9]. Homologues of UCP1 were subsequently identified in different tissues and the actual known mammalian UCP genes constitute a multigene family composed by five members (UCP1–5) (reviewed in [10]). The physiological roles of UCP2–5 are still under debate; however, given that they are present in mitochondria in much lower amounts than UCP1, their participation in thermogenesis is practically discarded [7,8].

The existence of UCP-like proteins in plants (pUCP), initially referred to as PUMPs (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein), was firstly demonstrated in potato tuber mitochondria [11]. Thereafter, several genes encoding pUCP have been identified in different plant species (reviewed in [12]). Similar to UCP2–5, pUCPs are present in plant mitochondria in low amounts and are probably not able to promote thermogenesis [13,14]. The physiological roles of pUCPs are most likely related to the control of reactive oxygen species overproduction or to the regulation of mitochondrial energy flow at some stages of plant tissue/organ development (reviewed in [12]).

* Corresponding author. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, 18.618-000, Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 14 3811 6229; fax: +55 14 3815 3744.

E-mail address: igmaia@ibb.unesp.br (I.G. Maia).

In the last years, useful information concerning the mechanism of H^+ transport by mammalian UCP1 has been provided by site-directed mutagenesis experiments (reviewed in [15]). Important amino acid (aa) residues involved in this process have been identified, in particular a C-terminal cysteine (Cys304) that modulates UCP1 proton-translocating activity [16]. Moreover, a critical role for a histidine pair, present in the second matrix loop, in the FFA-activated proton transport of UCP1 was demonstrated [17]. Although not presented in PUMPs, the introduction of such a pair at equivalent positions of a UCP from maize (ZmPUMP; Lys155His/Ala157His) increased 1.55-fold its affinity to linoleic acid (LA) [18]. In contrast, when a patch of 8 amino acid residues (including the His pair) of UCP1 was replaced by the homologous region of UCP2, no alteration in UCP1 proton transport was observed [19].

Mutations compromising PN binding have been also described, namely those affecting three conserved intrahelical arginines (Arg83, Arg182, Arg276) [20,21] (Fig. 1A). In this context, a UCP1 mutant carrying a deletion of residues Phe267, Lys268, and Gly269 was described as being insensitive to nucleotide inhibition [22]. In addition, the intrahelical Glu190 was pointed out as important for the pH regulation of PN binding in UCP1 [23].

In contrast to numerous studies elucidating the structure–function relationships of mammalian UCP1, only one report regarding these aspects within pUCPs has been provided to date [18]. In this respect, UCP1 appears to be the last evolutionary event within uncoupling protein gene family with highly specialized function and therefore cannot be considered as the representative member of this family. For this reason, studies employing other UCPs/pUCPs are important to advance our understanding of the mechanistic and structural properties of uncoupling proteins in general.

In this study, five different aa residues (Cys28, His83, Lys147, Arg155, and Tyr269; Fig. 1) of AtUCP1 (originally called AtPUMP1) potentially important for protein activity were selected

and mutagenized. Among them, Cys28 and His83 are exclusively found in pUCPs and were chosen to study possible pUCP-specific structure–function relationships. Lys147 occupies the position of the first residue (His147) of an essential His pair present in mammalian UCP1 [17] and was mutated to determine the significance of a positive charge at this location on LA-mediated uncoupling protein activity. The mutation Tyr269Phe was selected as reversal to a Phe267Tyr mutation studied in UCP1 and associated with a decrease of PN inhibition efficiency [22]. Arg155 corresponds to Arg152 in UCP1, a residue known to be crucial for its activation by FA [24], and was investigated to probe common structure–activity relationships among members of the UCP/pUCP family. The biochemical activities and kinetic parameters of these pUCP mutants were examined using recombinant proteins reconstituted in proteoliposomes to avoid possible interferences of other mitochondrial carriers.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bio-Beads SM2 were from Bio-Rad. The fluorescence probe SPQ [6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quimolinium] was from Molecular Probes. Lecithin was a special gift of Dr. Iolanda Cuccovia (Department of Biochemistry, University of São Paulo, Brazil). Nucleotides, LA and other chemicals were from Sigma. HNE was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

2.2. Mutagenesis and expression of AtUCP1 mutants

A plasmid pET3d with an inserted *AtUCP1* cDNA under the control of the T7 promoter [25] was used to introduce the site-directed mutations. Mutagenesis was conducted using a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Oligonucleotides were designed to alter *AtUCP1* codons for Cys28 (TGC) to Ala (GCC), His83 (CAT) to Leu (CTT), Lys147 (AAA) to His (CAC), Arg155 (CGG) to Leu (CTG) and Tyr269 (TAC) to Phe (TTC). All recovered mutants were verified by DNA sequencing in an ABI-PRISM 3100 automatic sequencer (Perkin-Elmer).

Escherichia coli BL21(DE3) pLysS cells were transformed with the plasmids containing the wt *AtUCP1* or corresponding mutants. Expression of the

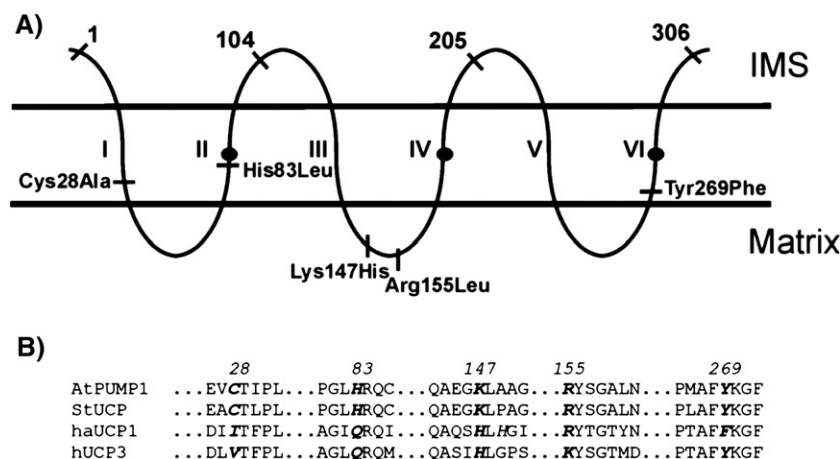


Fig. 1. (A) Schematic transmembrane folding of AtUCP1 showing the positions of the amino acid (aa) residues mutated in this study (Cys28Ala, His83Leu, Lys147His, Arg155Leu and Tyr269Phe). Numbers (1 to 306) represent the positions of the aa residues starting from the initial methionine. The transmembrane domains are labeled by Roman numerals (I–VI). Solid circles represent three conserved intrahelical arginines. IMS — intermembrane space. (B) Selected aligned segments of the aa sequences of AtUCP1 (AtPUMP1; At3g54110), StUCP (CAA72107), hamster UCP1 (P04575) and human UCP3 (P55916) encompassing the mutated residues in AtUCP1 (in bold). Accession numbers were taken from GenBank or Tair database.

genes was induced with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) as described previously [25]. The presence of recombinant proteins was analyzed by SDS-PAGE (0.1% SDS, 12% polyacrylamide) stained with Coomassie Blue.

2.3. Reconstitution

Wild type (wt) and mutant AtUCP1 proteins were isolated as described previously [25] and reconstituted (100 μ g each) in proteoliposomes consisting of 39 mg lecithin, 1.66 mg cardiolipin, and 0.66 mg phosphatidic acid at lipid/protein molar ratio of 410:1. The proteoliposomes internal medium (IM) contained 28.8 mM tetraethylammonium N-tris [hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulfonate (TEA-TES; [TES]_{free} = 9.2 mM), pH 7.2, 84.4 mM TEA₂SO₄ and 0.6 mM TEA-EGTA, 2 mM SPQ probe and 84.4 μ M K₂SO₄ to set the potassium diffusion potential across the liposomal membrane to \sim 180 mV [25].

H⁺ flux assays were based on the quenching of SPQ fluorescence by TES⁻ [26]. Vesicles (30 μ l; 0.24 mg lipids, \sim 25 μ g protein) were added to 1.5 ml of external medium (EM; 28.8 mM TEA-TES [9.2 mM TES⁻], pH 7.2, 84.4 mM K₂SO₄, and 0.6 mM TEA-EGTA). Fatty acids were added after 20 s and the H⁺ efflux was initiated by 1.3 μ M valinomycin 20 s later. In selected experiments, 10, 30, 60 or 100 μ M HNE was added before vesicle addition. The fluorescence was calibrated to [H⁺] by the addition of 6 μ mol of KOH aliquots in the presence of 1.5 μ M nigericin to proteoliposomes suspended in IM. Fluorescent data were converted into "H⁺ traces", that correspond to H⁺ efflux, by fitting with modified Stern–Volmer equation, [H⁺] = (1/K_q) · (F₀ - F)/(F - L), where F is the experimental and F₀ the unquenched fluorescence. Parameters K_q (quenching constant) and L (background, mostly light scattering) were obtained by linear regression of F vs. (F₀ - F)/[KOH] plot. Rates of H⁺ efflux were derived from "H⁺ traces", multiplied by the internal proteoliposome volume (V, estimated from volume distribution of the SPQ; [1]), and corrected for protein content (9.9 mg lipids corresponding to 1 mg of protein in case of protein-free liposomes) to yield final rates in μ mol H⁺ min⁻¹ (mg prot)⁻¹. When expressed per μ mol of AtUCP1 dimer, rates represented the minimum values for the turnover number, since not all of the protein was inserted into the vesicles. The kinetic constants were calculated as the mean \pm SD of the values determined by Lineweaver–Burk and/or Hill plot analyses from three independent experiments.

3. Results

Sequencing confirmed the correctness of clones with introduced point mutations. All mutant proteins were successfully produced in *E. coli* BL21(DE3) and originated polypeptides with an apparent molecular mass of 32 kDa that were present in the inclusion body fraction (data not shown).

3.1. H⁺ efflux in proteoliposomes containing AtUCP1 mutants

The proton fluxes mediated by AtUCP1 mutants in reconstituted system were assayed by K⁺ diffusion potential (created by [K⁺] gradient plus valinomycin) in the presence of LA and the internal [H⁺] changes were monitored as SPQ fluorescence [25]. The measurements were performed with initial membrane potential set to \sim 180 mV. An important property of the system, the basal H⁺ permeability of lipid bilayer, was assayed in protein-free vesicles (liposomes). After the addition of LA, an internal acidification of the liposomes was observed, indicating the redistribution of the LA molecules in both leaflets of the lipid bilayer. The addition of 1.3 μ M valinomycin caused no significant H⁺ movement (data not shown), demonstrating a low H⁺ permeability of lipid membrane itself. In contrast, proteoliposomes containing wt and AtUCP1 mutants exhibited a significant H⁺ efflux in the presence of valinomycin. Fig. 2A illustrates H⁺ fluxes in proteoliposomes containing Cys28Ala

mutant in the absence and at three different concentrations of LA. The LA-concentration dependence of H⁺ efflux represents protein-mediated H⁺ transfer. Interestingly, when LA was replaced by HNE, no significant H⁺ efflux was observed in the presence of valinomycin in proteoliposomes containing wt AtUCP1 (data not shown).

3.2. Kinetic of LA transport by AtUCP1 mutants

The kinetic of H⁺ efflux mediated by the AtUCP1 mutants was evaluated by varying the total LA concentration. Low protein-independent basal H⁺ fluxes simulated in protein-free liposomes, under identical LA and valinomycin concentrations and membrane potential showed linear, non-saturable profile (Fig. 3). Data, corrected for the different (lower) volume of proteoliposomes and different protein concentrations were used for estimation of the basal H⁺ flux in proteoliposomes. Evaluation of the kinetics of LA-induced H⁺ efflux mediated by the mutants under study produced a concentration-dependent, saturable response that exceeded the H⁺ fluxes in liposomes (Fig. 3A). The corresponding Eadie–Hofstee plot (Fig. 3B) yielded an apparent K_m for these mutants 1.3- to 2.6-fold higher than for the wt (Table 1). In comparison to wt AtUCP1, the apparent LA-affinity was strongly reduced for mutants Cys 28Ala (2.6-fold), Lys147His (1.8-fold), and Tyr269Phe (2.4-fold) while the affinity of His83Leu and Arg155Leu mutants to

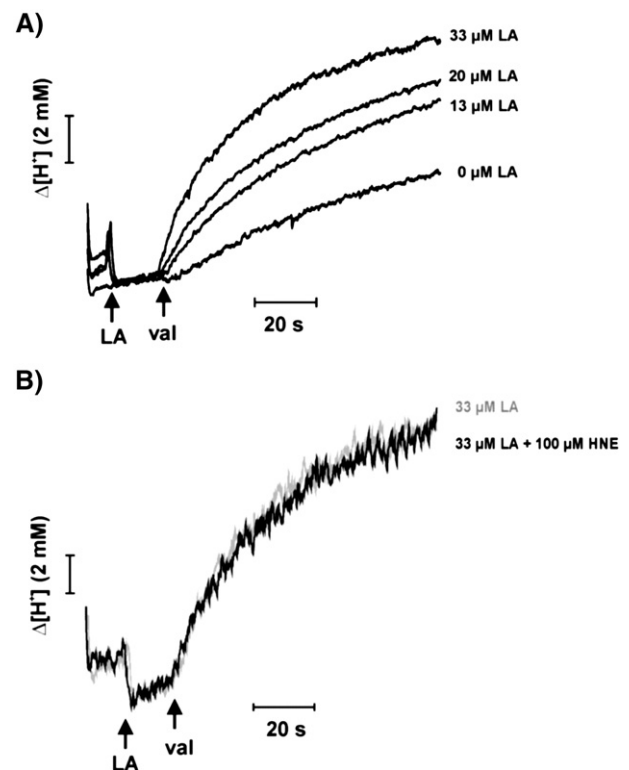


Fig. 2. Representative protein-mediated H⁺ efflux in reconstituted proteoliposomes. The measurements were conducted in the presence of 1.3 μ M valinomycin (Val) at pH 7.2 at room temperature. (A) Traces show H⁺ efflux mediated by the Cys28Ala mutant in the absence or induced by LA at indicated concentrations. (B) Traces show H⁺ efflux mediated by wt AtUCP1 in the presence of LA and in the absence (gray trace) or presence (black trace) of HNE.

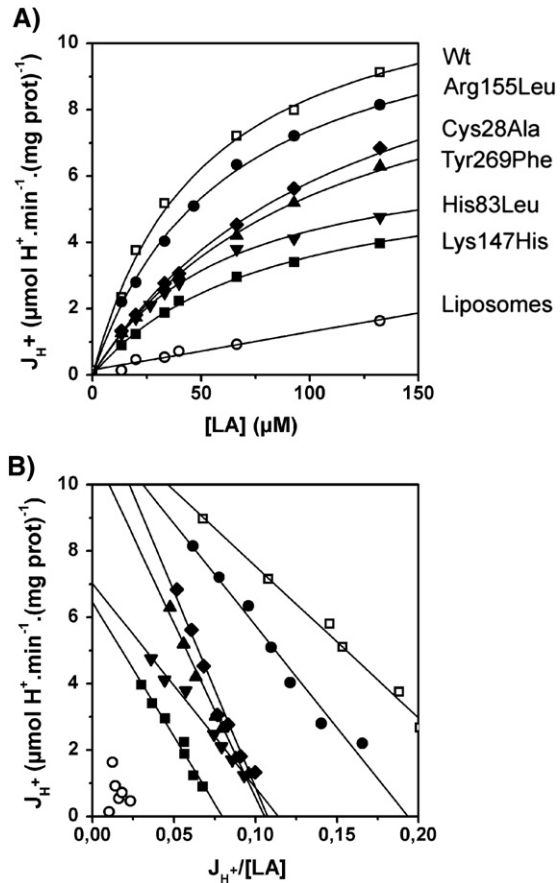


Fig. 3. (A) Kinetics of LA-induced H⁺ fluxes in protein-free liposomes (○) and proteoliposomes reconstituted with wt AtUCP1 (□) and mutants Cys28Ala (◆); His83Leu (▼); Lys147His (■); Arg155Leu (●) and Tyr269Phe (▲). Measurements were conducted in the presence of 1.3 μM valinomycin at pH 7.2 at room temperature. The fluxes were calculated per mg of protein (or mg lipids corresponding to 1 mg of protein in case of protein-free liposomes) to yield final rates in μmol H⁺ min⁻¹ (mg prot)⁻¹. Rates of H⁺ transport (*J*) were measured using different concentrations of LA. (B) Eadie–Hofstee plot for kinetics of LA-induced H⁺ fluxes in protein-free liposomes and proteoliposomes reconstituted with wt AtUCP1 and mutants (the symbols are according to Panel A). The derived kinetic parameters are listed in Table 1, where the basal flux *J_B* was subtracted.

LA decreased 1.3-fold and 1.4-fold, respectively. The derived *V*_{max} values were lower for mutants His83Leu and Lys147His (~50% reduction) with respect to the wt protein (Table 1) while no or a slight change in *V*_{max} was observed with Cys28Ala, Arg155Leu, and Tyr269Phe mutants. The maximum relative efficiency (*V*_{max}/*K*_m ratio) of AtUCP1 mutants reached 0.18 μmol H⁺ min⁻¹ (mg prot)⁻¹ μM⁻¹ (Arg155Leu) that represents only 62% of the value found for wt AtUCP1 [0.29 μmol H⁺ min⁻¹ (mg prot)⁻¹ μM⁻¹].

In order to investigate the responses of the studied mutants to HNE, we first determined the kinetics of LA-induced H⁺ efflux mediated by wt AtUCP1 in the presence of 10, 30, 60, and 100 μM of HNE. Interestingly, the values of *K*_m and *V*_{max} did not alter within the whole range of tested HNE concentrations (Fig. 2B), yielding the single values of 43.8 ± 2.3 μM and 14.5 ± 2.0 μmol H⁺ min⁻¹ (mg prot)⁻¹, respectively.

Table 1

Kinetic parameters for H⁺ efflux and ATP inhibition for wild type (WT) and AtUCP1 mutants^a

	<i>V</i> _{max} (μmol H ⁺ min ⁻¹ (mg prot) ⁻¹)	<i>K</i> _m (μM)	Relative efficiency (μmol H ⁺ min ⁻¹ (mg prot) ⁻¹ μM ⁻¹)	<i>K</i> _{i,ATP} (mM)
WT	13.2 ± 1.7	46.1 ± 3.5	0.29	0.83 ± 0.04
Cys28Ala	13.0 ± 0.4	118.0 ± 7.9	0.11	3.31 ± 0.18
His83Leu	6.9 ± 0.2	58.4 ± 4.4	0.12	0.93 ± 0.05
Lys147His	6.6 ± 0.2	85.0 ± 5.9	0.08	1.35 ± 0.09
Arg155Leu	11.3 ± 0.9	64.4 ± 4.0	0.18	0.91 ± 0.04
Tyr269Phe	11.4 ± 0.4	109.5 ± 6.5	0.10	0.30 ± 0.02

^a The values represent the mean ± SD from three independent experiments.

3.3. Inhibition of H⁺ efflux by PN in proteoliposomes containing AtUCP1 mutants

The inhibitory effects of PN on LA-mediated H⁺ efflux in proteoliposomes containing the AtUCP1 mutants were evaluated in the presence of ATP or GDP. The protein-independent, non-specific inhibitory effects of ATP on basal H⁺ fluxes were simulated in protein-free liposomes. Under identical LA and valinomycin concentrations and membrane potential, 3 mM ATP had no effect on basal H⁺ fluxes (data not shown). The concentration dependence curve for externally added ATP (Fig. 4) at pH 7.2 yielded an apparent *K*_i of 0.83 mM for wt AtUCP1 as found previously [25]. The dynamic *K*_i values for ATP obtained for the studied mutants by Lineweaver–Burk analysis are listed in Table 1 and the corresponding concentration dependence curves represented in Fig. 4. The His83Leu and Arg155Leu mutants exhibited ATP inhibition characteristics similar to wt AtUCP1. In contrast, the sensitivity to inhibition by ATP of Tyr269Phe mutant was increased 2.8-fold, whereas Cys28Ala and Lys147His mutants were 4.0-fold and 1.6-fold less sensitive, respectively. The *K*_i values obtained with GDP were practically the same as found for ATP (data not shown).

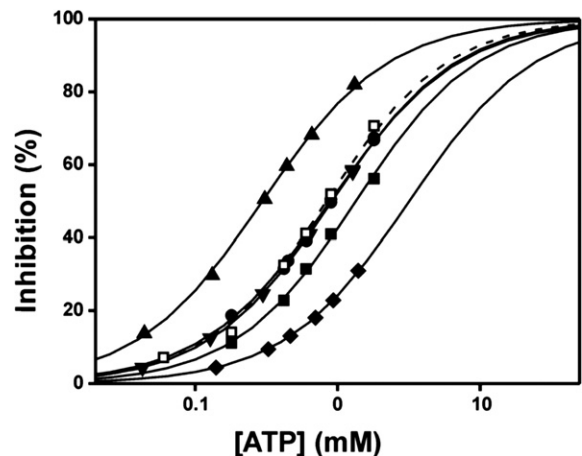


Fig. 4. Inhibition of LA-induced H⁺ efflux in proteoliposomes containing AtUCP1 mutants. The Hill plots (solid and dashed lines) represent the concentration dependence of the inhibition of AtUCP1 (only the molecules with the outwardly oriented ATP binding sites were considered [25]). *K*_i measurements for ATP were performed at pH 7.2 at room temperature with Hill coefficients in the range of 0.95–1.05. Wild type AtUCP1 (□) and mutants Cys28Ala (◆); His83Leu (▼); Lys147His (■); Arg155Leu (●) and Tyr269Phe (▲).

4. Discussion

In this study, point mutations were introduced in AtUCP1 aa residues Lys147, Arg155 and Tyr269, located in the so-called UCP-signatures [27], and in two more residues (Cys28 and His83) found exclusively in pUCP sequences (Fig. 1A and B) [28]. Similar to wt AtUCP1, its mutants mediated H⁺ transport across the liposomal membrane that was activated by LA and sensitive to inhibition by PN. Interestingly, AtUCP1 and its mutants were insensitive to activation by up to 100 μM HNE that corroborate the recent findings obtained with mammalian UCP1 [4].

4.1. Arg155Leu mutant

The Arg152 residue is widely conserved in UCPs unless UCP3 (Fig. 1B). The charge neutralization of this residue in mammalian UCP1 led to a ~50% reduction of FA-affinity as well as of its activity [24]. The replacement of the analogous residue in AtUCP1 (Arg155) led to a similar reduction of LA-affinity (by approximately 40%), however, with a slight alteration of V_{\max} value, suggesting that a positive charge at this position is crucial for LA-affinity but not for activity of AtUCP1. In line with a mutagenesis study in UCP1 [24], the Arg155Leu mutation did not affect the K_i value for ATP and GDP.

4.2. Lys147His mutant

Previous site-directed mutagenesis experiments in UCP1 revealed that the His pair, His145 and His147, is essential for UCP1-mediated H⁺ transport [17,24]. Contrasting with the postulated essentiality of these residues for proton transport, all other UCPs contain only one (UCP3) or no His residues of this pair in its primary aa sequence, although being able to mediate FA-induced uncoupling [29]. Typically, pUCPs have a strong base (Lys) and hydrophobic (Ala or Pro) amino acid residues in the positions corresponding to His pair in UCP1. The presence of Lys residue appears to be crucial for pUCP transport activity, since when a His residue replaced Lys147 present at an equivalent position in AtUCP1, a ~1.8 fold reduction in LA-affinity and ~50% reduction of V_{\max} value was observed with an alteration in ATP or GDP inhibition. Therefore, the attenuation of the strong positive charge of Lys147 to His was sufficient to lower 3.6-fold the mutant relative efficiency. On the other hand, a double ZmPUMP mutant containing a complete His pair presented only 1.55-fold higher affinity to LA than the wt protein and no change in its activity [18]. These results are consistent with a key role of Lys147 (a strong base) in pUCP-mediated FA-induced uncoupling being able to replace the two histidines (weak bases) present in mammalian UCP1. Despite these evidences, one cannot exclude the possibility that this residue is intolerant to any amino acid substitution as already suggested [19].

4.3. Tyr269Phe mutant

Residue Phe267 has been previously suggested as being fundamental for PN binding to heterologous UCP1 expressed in

yeast. Although its single mutation did not promote qualitative changes in activity of UCP1 in isolated mitochondria, corresponding flow cytometry analyses suggested that this mutation increased the uncoupling of yeast mitochondria *in situ* [22]. Contrary to UCP1, all other UCPs have Tyr residues in the homologous position. This fact led us to further investigate the suggested importance of this Tyr/Phe residue for PN inhibition. The quantitative kinetic characterization of the revertant Tyr 269Phe mutant revealed that its sensitivity to ATP increased almost 3-fold over wt AtUCP1 (Table 1). This finding indicates that the mutation effect is reversible and hence actually confirmed for the first time the very importance of this Tyr/Phe residue for inhibition mechanism of UCPs by PN. Furthermore, about 6-fold lower affinity of AtUCP1 ($K_{i,ATP}$ =0.82 mM; [25]), UCP2, and UCP3 ($K_{i,ATP}$ =0.76 and 0.65 mM, respectively; [30]) for PN in comparison to mammalian UCP1 ($K_{i,ATP}$ =125 μM; [30]) could be also related to this residue. In addition, the results from mutational analyses of this residue in UCP1 and AtUCP1 corroborate the hypothesis suggesting UCP1 as the evolutionary newest member of the UCP subfamily [29]. UCP1 seems to be the only member of uncoupling protein family involved in thermogenesis [31]. Thus the tight regulation of UCP1 activity should be critical for proper function of this tissue.

4.4. Cys28Ala and His83Leu mutants

The Cys28 and His83 residues, located in the first and second transmembrane domains (Fig. 1A), respectively, were identified as candidates due to their unique conservation in plant UCPs. Residue His83 is exclusively present in pUCPs and is placed in the vicinity of an invariant Arg residue (Arg83 in UCP1) important for PN binding [21] (Fig. 1A). The replacement of His83 (weak base) by a hydrophobic residue (Leu) in AtUCP1 decreased the LA-affinity (by approximately 27%) and the V_{\max} (by approximately 52%) but had no effect on ATP inhibition, indicating that the provided positive charge is of significance for optimal proton transport but not for its regulation by purine nucleotides.

The Cys28 residue was found to be probably one of the residues that are crucial for the proper function of pUCPs. The replacement of Cys28 residue for Ala promoted a large decrease of AtUCP1 affinity for both LA (by 61%) and ATP (by 75%). Thus, this residue should be involved in the proper folding of the pUCPs playing a structural rather than functional role. However, no intramolecular S–S bridge within any UCP monomer molecule has been reported. It is also known that the functional unit of uncoupling proteins is a dimer but no involvement of any S–S bridge in monomer interaction was proved so far.

This study brings the first deeper site-directed mutational analysis of a pUCP aimed to reveal the structure–function relationships that might be involved in the mechanism of its uncoupling activity. The AtUCP1 residues His83, Lys147, and Arg155 appear to be associated preferentially with LA-activated proton transport mediated by pUCP whereas Tyr269 residue is important for inhibition of its activity by PN. The plant UCP-specific residue Cys28 should be one of the residues that are essential for proper functioning of pUCPs at all.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. P. Arruda for the laboratory facilities. This work is funded by FAPESP (Processo 06/59912-5). R.D.F., J.B. and D.C. are recipients of fellowships from FAPESP.

References

- [1] K.D. Garlid, D.E. Orosz, M. Modrianský, S. Vassanelli, P. Ježek, On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2615–2620.
- [2] M.J. Considine, M. Goodman, K.S. Echtay, M. Laloi, J. Whelan, M.D. Brand, L.J. Sweetlove, Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondrial that is related to the activity of uncoupling protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22298–22302.
- [3] A.M.O. Smith, R. George Ratcliffe, L.J. Sweetlove, Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51944–51952.
- [4] I.G. Shabalina, N. Petrovic, T.V. Kramarova, J. Hoeks, B. Cannon, J. Nedergaard, UCP1 and defense against oxidative stress, 4-hydroxy-2-nonenal effects on brown fat mitochondrial are uncoupling protein 1-independent, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 13882–13893.
- [5] D. Ricquier, J.C. Kader, Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 (1976) 577–583.
- [6] D.G. Nicholls, E. Rial, A history of the first uncoupling protein, UCP1, *J. Bioenerg. Biomembranes* 31 (1999) 399–418.
- [7] G. Argyropoulos, M.-E. Harper, Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation, *J. Appl. Physiol.* 92 (2002) 2187–2198.
- [8] J. Mozo, Y. Emre, F. Bouillaud, D. Ricquier, F. Criscuolo, Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? *Biosci. Rep.* 25 (2005) 227–249.
- [9] C. Erlanson-Albertsson, The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism, *Acta Physiol. Scand.* 178 (2003) 405–412.
- [10] S. Krauss, C.Y. Zhang, B.B. Lowell, The mitochondrial uncoupling protein homologues, *Nat. Rev.* 6 (2005) 248–261.
- [11] A.E. Vercesi, I.S. Martins, M.A.P. Silva, H.M.F. Leite, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, PUMPing plants, *Nature* 375 (1995) 24.
- [12] A.E. Vercesi, J. Borecký, I.G. Maia, P. Arruda, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, Plant uncoupling mitochondrial proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 383–404.
- [13] F.F. Calegario, R.G. Cosso, M.M. Fagian, F.V. Almeida, W.F. Jardim, P. Ježek, P. Arruda, A.E. Vercesi, Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase, *J. Bioenerg. Biomembranes* 35 (2003) 211–220.
- [14] C. Hourton-Cabassa, A.R. Matos, A. Zachowski, F. Moreau, The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria, *Plant Physiol. Biochem.* 42 (2004) 283–290.
- [15] M. Klingenberg, K.S. Echtay, Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view, *Biochim. Biophys. Acta* 1504 (2001) 128–143.
- [16] M.M. Gonzalez-Barroso, C. Fleury, I. Arechaga, P. Zaragoza, C. Levi-Meyrueis, S. Raimbault, D. Ricquier, F. Bouillaud, E. Rial, Activation of the uncoupling protein by fatty acids is modulated by mutations in the C-terminal region of the protein, *Eur. J. Biochem.* 239 (1996) 445–450.
- [17] M. Bienengraeber, K.S. Echtay, M. Klingenberg, H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3, *Biochemistry* 37 (1998) 3–8.
- [18] R.D. Fávoro, J. Borecký, D. Colombi, I.G. Maia, ZmPUMP encodes a fully functional monocot plant uncoupling mitochondrial protein whose affinity to fatty acid is increased with the introduction of a His pair at the second matrix loop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 (2006) 194–199.
- [19] J. Jiménez-Jiménez, R. Zardoya, A. Ledesma, M.G. de Lacoba, P. Zaragoza, M.M. González-Barroso, E. Rial, Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 1010–1022.
- [20] K.S. Echtay, M. Bienengraeber, M. Klingenberg, Role of intrahelical arginine residues in functional properties of uncoupling protein (UCP1), *Biochemistry* 40 (2001) 5243–5248.
- [21] M. Modrianský, D.L. Murdza-Inglis, H.V. Patel, K.B. Freeman, K.D. Garlid, Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24759–24762.
- [22] F. Bouillaud, I. Arechaga, P.X. Petit, S. Raimbault, C. Levi-Meyrueis, L. Casteilla, M. Laurent, E. Rial, D. Ricquier, A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein, *EMBO J.* 13 (1994) 1990–1997.
- [23] K.S. Echtay, M. Bienengraeber, M. Klingenberg, Mutagenesis of the uncoupling protein of brown adipose tissue. Neutralization of E190 largely abolished pH control of nucleotide binding, *Biochemistry* 36 (1997) 8253–8260.
- [24] E. Urbánková, P. Hanák, E. Škobisová, M. Růžička, P. Ježek, Substitutional mutations in the uncoupling protein-specific sequence of mitochondrial uncoupling protein UCP1 lead to the reduction of fatty acid-induced H⁺ uniport, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 212–220.
- [25] J. Borecký, I.G. Maia, A.D.T. Costa, P. Ježek, H. Chaimovich, P.B.M. Andrade, A.E. Vercesi, P. Arruda, Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (*AtPUMP1*) expressed in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 505 (2001) 240–244.
- [26] D.E. Orosz, K.D. Garlid, A sensitive new fluorescence assay for measuring proton transport across liposomal membranes, *Anal. Biochem.* 210 (1993) 7–15.
- [27] P. Ježek, E. Urbánková, Specific sequence motifs of mitochondrial uncoupling proteins, *IUBMB Life* 49 (2000) 63–70.
- [28] P. Hanák, P. Ježek, Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis-UCP4 as the ancestral uncoupling, *FEBS Lett.* 495 (2001) 137–141.
- [29] J. Borecký, I.G. Maia, P. Arruda, Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants, *Biosci. Rep.* 21 (2001) 201–212.
- [30] M. Jabůrek, M. Vařecha, R.E. Gimeno, M. Dembski, P. Ježek, M. Zhang, P. Burn, L.A. Tartaglia, K.D. Garlid, Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26003–26007.
- [31] J. Borecký, A.E. Vercesi, Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress, *Biosci. Rep.* 25 (2005) 271–286.

Capítulo II. Estudos de Expressão Gênica em *Arabidopsis* e de Caracterização Funcional de Promotores

Em paralelo aos experimentos de reconstituição descritos anteriormente, estudos visando analisar de forma detalhada a expressão dos genes que codificam as seis isoformas de UCPs em *A. thaliana* em resposta a estresse salino (NaCl) e osmótico (manitol), e a fitohormônios (ácido abiscísico - ABA e ácido 1- carboxílico 1-aminociclopropano - ACC) foram iniciados. Concomitantemente, iniciou-se a caracterização funcional das regiões promotoras dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2*. Os dados obtidos com este trabalho serão apresentados a seguir.

II.1. Material e Métodos

II.1.1. Análises de expressão gênica em *Arabidopsis thaliana*

II.1.1.1. Cultivo das sementes de *A. thaliana*

Sementes de *A. thaliana* (ecótipo Columbia) foram embebidas em água Milli-Q por 1 hora. Em seguida, foram esterilizadas em etanol 70% por 1 minuto, água sanitária 50% por 20 minutos com posterior lavagem (5x) com água Milli-Q autoclavada. Após esterilização, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962) e 0,23% de Phytigel (Sigma). As placas foram mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial e temperatura entre 20-22°C. Três semanas após a germinação as plântulas foram transferidas para novas placas contendo meio MS adicionado dos diferentes tratamentos: NaCl 125 mM; manitol 250 mM; ABA 0,1 mM e ACC 0,1 mM. As

referidas concentrações foram definidas em testes preliminares empregando meios com diferentes concentrações desses agentes, sendo estas concentrações consideradas moderadas (Husseini, 2008). As plântulas tratadas foram amostradas em diferentes tempos (0, 12, 24 e 48 h) para posterior extração de RNA total. O ensaio biológico foi realizado em duplicata para confiabilidade dos dados.

II.1.1.2. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).

Para a extração de RNA total utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen) segundo protocolo descrito pelo fabricante, mas com pequenas modificações. Plântulas de *A. thaliana* submetidas aos diferentes tratamentos foram maceradas em nitrogênio líquido. Um mililitro de Trizol foi então adicionado à cerca de 100-200 mg do tecido macerado e procedeu-se a homogeneização em agitador. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 12000xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado seguido da adição de 200 µl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada em agitador e após incubação por mais 3 minutos a temperatura ambiente foi centrifugada a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 500 µl de isopropanol. Após incubação por 60 minutos a -20°C e centrifugação por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 70 %. Após uma nova centrifugação a 7500xg por 5 minutos a 4°C o sedimento foi seco e ressuspensão em 30 µl de H₂O tratada com DEPC.

A integridade do RNA total extraído foi determinada por eletroforese em gel desnaturante (1,85% de formaldeído) de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Amostras de RNA total (~2 µg) tratadas com DNaseI (Fermentas) foram

submetidas a transcrição reversa utilizando-se oligo dT17VN (2 μ M) e *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), segundo as informações do fabricante. O produto da transcrição reversa foi quantificado utilizando-se o *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies).

Para a quantificação da expressão gênica por qPCR, amostras de cDNA na concentração de 60 ng/ μ l foram diluídas 10x. Os oligonucleotídeos gene-específicos listados na Tabela 1 foram desenhados no programa *Primer Express* com base na seqüência depositada no banco de dados Tigr (<http://www.tigr.org>). Considerando a alta identidade existente entre as isoformas da *AtUCP* (1-6), os oligonucleotídeos gene-específicos foram posicionados na região 5'UTR (região não traduzida) para discriminar cada uma delas.

Os componentes da reação de amplificação estão listados na Tabela 2 sendo utilizado um ciclo prévio de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de um ciclo de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 62°C por 1 minuto, repetido por quarenta vezes. Após a reação foi adicionado um passo de dissociação através da elevação da temperatura de 60°C para 95°C, subindo 1°C por minuto. Este procedimento serviu para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados ou a formação de *primers-dimers*. A eficiência de reação (E) foi calculada para cada par de oligonucleotídeos utilizando-se o programa LingRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003), considerando um intervalo ótimo de eficiência entre 1,8-2,2. O modelo matemático (1) utilizado para a análise da expressão relativa foi baseado em Pfaffl (2001). Para a utilização deste modelo é necessária a determinação do *crossing point* (CP) para cada transcrito. O CP é definido como o ponto no qual a emissão da fluorescência é superior ao background.

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}}) \Delta\text{CPalvo (controle - amostra)}}{(E_{\text{referência}}) \Delta\text{CPreferência (controle - amostra)}} \quad (1)$$

Onde:

R= razão de expressão relativa

E_{alvo} = eficiência de reação de gene alvo

$E_{\text{referência}}$ = eficiência de reação de gene referência

ΔCPalvo = CP controle (tempo zero) – CP tratamento (12, 24 ou 48 horas)

$\Delta\text{CPreferência}$ = CP controle (tempo zero) – CP tratamento (12, 24 ou 48 horas)

Tabela 1. Oligonucleotídeos empregados para a análise da expressão gênica por qPCR.

GENE	NÚMERO DE ACESSO*	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5´-3´)	TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)
<i>AtUCP1</i>	TC271062	GATGGTGGCGGCTGGTA CGCCGACGCAAGCAG	77
<i>AtUCP2</i>	TC264719	CATAACAATGGCGGATTCAAAA CGCTGCAAATGAAGGTTTCA	65
<i>AtUCP3</i>	TC273718	GGAGCCGAGTGACCAGAGAA CGCAGAGAGTGAAGCAAGCA	62
<i>AtUCP4</i>	TC251734	TCGTTGAAGGTGGGATTGC CTTGATTAGATCGAGAGGGTGAGT	65
<i>AtUCP5</i>	TC270882	CGACCCACCCGCTTGAT GCTGGTCGGAGATTGGTTTG	82
<i>AtUCP6</i>	TC269710	AATCTTCCCCTGAAACCTTACC AAGGAAATGCTGCCGATGAG	65
<i>FDH</i>	AT5G43940	ATTGATCCTACTGCTCCTTTGG CCAAGGCCAGTGGGAACA	67
<i>40S</i>	AT2G09990	CGACTCTCTGCGTTAGGTTTCA GGGTTTCTCCTTGCTTTTGCT	62
<i>RD29A</i>	AT5G52310	TCACTTGGCTCCACTGTTGTTC TCCAAAGTGAACTTGAAAATCTC	79
<i>PDF1.2</i>	At5g44420	TCTTCGCTGCTCTTGTTCTCTTT TTCTGTGCTTCCACCATTGC	61
<i>AtbZip39</i>	AT2G36270	CAGCAACAGCTTTATGGTGTGTT GCTTGACCCGGGAATGAA	59

* O número de acesso é referente às seqüências de DNA depositadas nos bancos de dados Tair ou Tigr.

A fim de verificar a efetividade dos diferentes tratamentos aos quais as plântulas foram submetidas foi realizada uma busca por genes induzidos pelos tratamentos em estudo. Os genes *RD29A* (Charrier *et al.*, 2002) demonstrou-se induzido pelos tratamentos de NaCl e manitol, enquanto que os genes *PDF1.2*, que codifica uma proteína antifúngica (Arroyo *et al.*, 2003), e *AtbZip39*, que codifica um fator de transcrição do tipo bZip (Lorenzo *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004), são induzidos por ACC e ABA, respectivamente. Oligonucleotídeos para amplificação dos transcritos correspondentes foram usados como controle positivo de indução (Tabela 1), as seqüências de DNA utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos foram localizadas no banco de dados Tair (<http://www.arabidopsis.org>). As amostras de RNA foram submetidas a uma reação de amplificação para descartar a possibilidade de contaminação com DNA genômico.

Para as análises de expressão relativa foram selecionados genes de referência que não fossem influenciados pelos tratamentos. O gene *FDH* que codifica uma formaldeído desidrogenase (Dolferus *et al.*, 1997) foi utilizado como normalizador para os tratamentos ABA e ACC. Como o gene *FDH* apresentou alterações no perfil de expressão mediante os tratamentos com NaCl e Manitol, um novo gene endógeno, *40S ribosomal protein S16* (Kreps *et al.*, 2002), foi selecionado para estes tratamentos. As seqüências de DNA dos genes, *FDH* e *40S*, foram localizadas no banco de dados Tair.

A fim de verificar a correta amplificação de cada isoforma pelo qPCR, os respectivos produtos de amplificação foram clonados em vetor *pGEM-Teasy* (Promega) e posteriormente seqüenciados. Por se tratar de fragmentos pequenos (entre 62 e 82 pb) foram obtidos clones apenas para os genes *AtUCP3* e *AtUCP5*. As

seqüências de nucleotídeos dos referidos produtos apresentaram 100% de similaridade com as seqüências desses genes depositadas no banco de dados.

Tabela 2. Reação de qPCR utilizada nas análises de expressão gênica.

REAGENTES	QUANTIDADE/CONCENTRAÇÃO
cdNA	0,48 ng/ μ l
<i>SybrGreen Master Mix</i> *	50% da reação
Oligo <i>forward</i>	0,4 μ M
Oligo reverso	0,4 μ M
H ₂ O tratada com DEPC	q.s.p. 12,5 μ l

* Produto da Applied Biosystems.

II.1.2. Análise das regiões promotoras dos genes AtUCP1 e AtUCP2

II.1.2.1. Amplificação e clonagem das referidas regiões promotoras

As regiões promotoras dos genes *AtUCP1* (2085 pb) e *AtUCP2* (2016 pb) foram amplificadas via PCR a partir de DNA genômico de *A. thaliana* (extraído segundo protocolo de Ferreira e Grattapaglia, 1998), utilizando-se a enzima *Pfu* DNA polimerase (Fermentas), segundo instruções do fabricante, e um par de oligonucleotídeos específicos dotados de sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI na extremidade 5' e *Nco*I na extremidade 3'. A Tabela 3 mostra a seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados (os sítios de restrição inseridos estão sublinhados).

Tabela 3. Oligonucleotídeos empregados para amplificar as regiões promotoras.

REGIÃO PROMOTORA	NÚMERO DE ACESSO*	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5' - 3')	TAMANHO (pb)
<i>AtUCP1</i>	AT3G54100	CGCGGATCCAGTAAGTCAACTAAAATGGTAGG CATGCCATGGCTTCGATCCAGAAAACGC	2085
<i>AtUCP2</i>	AT5G58980	CGCGGATCCTACAATATGGTATTTAGAGAGTCAAG CATGCCATGGTGTATGCTATAGGAACAAGATAAG	2016

* O número de acesso é referente às seqüências depositadas no banco de dados Tair

A reação de PCR foi constituída de um ciclo prévio de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 4 minutos, repetido por trinta e cinco vezes, e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nco*I e purificados em gel de agarose 1% utilizando-se o kit *DNA and Gel Band Purification* (Amersham), sendo então inseridos no vetor de transformação de plantas pCAMBIA-1381z (Cambia) igualmente digerido. O vetor pCAMBIA-1381z contém o gene repórter *uidA* (que codifica a β -glucoronidase - GUS) e um sítio múltiplo de clonagem que permite a inserção de seqüências promotoras. As regiões promotoras em estudo foram, portanto inseridas em fusão transcricional com o gene repórter dando origem a dois cassetes de expressão distintos.

Células competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli* preparadas conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989) foram transformadas com os produtos da ligação empregando choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select*

Agar em água deionizada, com pH igual a 7,0) adicionado de 100 µg/ml de canamicina. Clones recombinantes foram então selecionados e os plasmídeos correspondentes isolados por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). A seqüência de nucleotídeos do fragmento clonado foi verificada usando *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) segundo protocolo do fabricante e um seqüenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

II.1.2.2. Transformação de *Nicotiana tabacum*

Plantas de *N. tabacum* SR1 transgênicas para as regiões promotoras dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* foram obtidas por experimentos de transformação empregando-se *Agrobacterium tumefaciens* linhagem LBA 4404.

Uma colônia de agrobactéria foi inoculada em de meio LB (3 ml) contendo os antibióticos de seleção estreptomicina 300 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml, e incubada sob agitação a 28°C por ~24 horas (absorbância de 600 nm entre 0,5-1,0). Após diluição da cultura (25x) no mesmo meio de crescimento (50 ml), a mesma foi incubada sob agitação a 28°C até atingir a absorbância de 600 nm entre 0,5-4,0. A cultura foi mantida em gelo por 15 minutos e as células foram centrifugadas a 1000xg por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em solução de CaCl₂ 0,4 mM gelada.

Para a transformação, alíquotas de 100 µl de células competentes acrescidas de 1 µg de DNA plasmidial recombinante foram incubadas em gelo por 30 minutos. Após um choque térmico, nitrogênio líquido/incubação a 37°C, foi acrescentado 1 ml de LB e a cultura foi mantida sob leve agitação por 2 horas a 28°C. Células transformadas foram selecionadas em placas contendo meio LB sólido adicionado dos antibióticos, estreptomicina 300 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml e canamicina 100

µg/ml. A presença do vetor de transformação contendo os respectivos insertos nas bactérias transformadas foi confirmada por PCR em condições estridentes. Os oligonucleotídeos utilizados em tais reações foram os citados na Tabela 3. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Uma colônia positiva para o fragmento clonado foi novamente inoculada em meio LB, com os devidos antibióticos de seleção, e incubada até atingir uma absorbância a 600 nm de ~1,5. Discos foliares estéreis de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) com 2 cm de diâmetro foram colocados em contato com a cultura de *A. tumefaciens* diluída 10x e mantidos sob leve agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. O excesso de bactéria nos discos foliares foi retirado pela absorção em papel de filtro estéril, e posteriormente os mesmos foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido (0,23% phytigel) suplementado de ácido naftalenoacético (ANA) 0,1 µg/ml e 6-benzilaminopurina (BAP) 2 µg/ml. As placas foram mantidas no escuro por 48 horas a 28°C para permitir o processo de infecção. Os discos foliares foram então transferidos para novas placas contendo meio de regeneração (MS sólido contendo ANA 0,1 µg/ml, BAP 2 µg/ml e cefotaxima 300 µg/ml) e o antibiótico de seleção, higromicina-B (50 µg/ml), para o tecido vegetal transformado. Após duas semanas os calos foram separados e transferidos para novo meio de regeneração com o antibiótico de seleção. Os brotos regenerados foram individualizados em frascos de vidro contendo meio de enraizamento (MS sólido contendo ANA 0,1 µg/ml e cefotaxima 300 µg/ml) além do agente de seleção higromicina-B (50 µg/ml). As plantas enraizadas foram transferidas para vasos com terra vegetal, aclimatadas em sala de cultura e posteriormente transferidas para casa de vegetação até a coleta das sementes.

As linhagens contendo os respectivos cassetes de expressão foram identificadas por PCR e RT-PCR utilizando-se DNA genômico (extraído segundo Konieczny e Ausubel, 1993) e RNA total (extraído como descrito no item 3.1.2), respectivamente, obtidos a partir de tecido foliar. Os oligonucleotídeos utilizados em tais reações foram: 5`GTAGAAACCCCAACCCGTGA3` e 5`GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC3`, desenhados com base na região codificadora do gene *uidA* (GUS).

II.1.2.3. Análise histoquímica da atividade β -Glucuronidase (GUS) nas linhagens transformadas

Para detectar a atividade GUS nas linhagens transformadas com os cassetes de expressão contendo os promotores em estudo foi realizado um ensaio histoquímico conforme protocolo padrão descrito por Jefferson e colaboradores (1987). Para tal, plântulas da geração R1 (com aproximadamente 15 dias após a germinação) e tecidos/órgãos da geração R1 (folha, flor, fruto e raiz com aproximadamente 120 dias), foram imersas em álcool etílico 70% por 1 minuto. Após remover o álcool foi realizada uma pré-infiltração a vácuo com tampão fosfato 1 M pH 7,0 para facilitar a penetração do substrato. As amostras foram infiltradas a vácuo em tampão de reação [NaH₂PO₄.H₂O 100 mM, K₄Fe(CN)₆.3 H₂O 0,5 mM, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, Triton X-100 0,1% e 5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-gluc) 1 mM] e incubadas a 37°C por 12 horas. Para visualizar o produto da reação, a clorofila foi removida com álcool etílico 70% e as amostras foram lavadas em H₂O destilada e transferidas para uma solução de glicerol 50%.

II.1.2.4. Quantificação da expressão relativa do gene repórter uidA nas plantas transgênicas transformadas com os cassetes de expressão

A expressão do gene *uidA* em diferentes órgãos/tecidos coletados de plantas das linhagens transformadas foi quantificada por qPCR. Os diferentes órgãos/tecidos (folha, flor, fruto e raiz) foram coletados de plantas R1 após aproximadamente 120 dias. Para tal foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene repórter (GUS F- 5'TTGCCAACGAACCGGATAC3' e GUS R- 5'GCCAGTGGCGCGAAATATT3') e para o gene normalizador 18S (18S F- 5'AGGAATTGACGGAAGGGCA3' e 18S R- 5'GTGCGGCCCAGAACATCTAAG3') (Levy *et al.*, 2004), todos desenhados no programa *Primer Express*. Os parâmetros utilizados na reação de qPCR foram os mesmo do item II.1.1.2, sendo a utilização do modelo matemático $2^{-\Delta CT}$ a única modificação introduzida (Livak *et al.*, 2001).

II.2. Resultados e Discussão

II.2.1. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR

A fim de obter informações relevantes sobre a expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de UCP em *A. thaliana* (AtUCP1-6), uma análise detalhada usando a técnica de qPCR foi empreendida. Para tal, amostras de RNA total de plântulas submetidas a diferentes tratamentos (ACC, ABA, NaCl e manitol) foram extraídas e a integridade do RNA total verificada em gel desnaturante de agarose corado com brometo de etídeo. Após a síntese de cDNA, as amostras foram quantificadas utilizando-se um aparelho Nanodrop visando as análises de expressão relativa. Cabe ressaltar que os dados foram coletados a partir de um único evento biológico, exceção feita aos tratamentos com NaCl e manitol que correspondem a duas repetições biológicas, respectivamente.

As análises iniciais de qPCR tiveram por objetivo verificar o perfil de expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de AtUCP em resposta ao tratamento com ACC, um precursor do fitohormônio etileno. O etileno é um hormônio vegetal que atua em concentrações muito baixas e participa da regulação de praticamente todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas. Ele é sintetizado em muitos órgãos dos vegetais superiores, sendo que tecidos senescentes e frutos em amadurecimento produzem mais etileno que tecidos jovens (Taiz e Zeiger, 2006). Os resultados obtidos revelaram uma variação significativa no perfil de expressão de somente uma, *AtUCP4*, das seis isoformas analisadas (inibição de até 4,1 x) (Figura 3.1), sendo que não foram observados produtos de amplificação correspondentes ao gene *AtUCP6*. A confirmação dos efeitos do tratamento com ACC

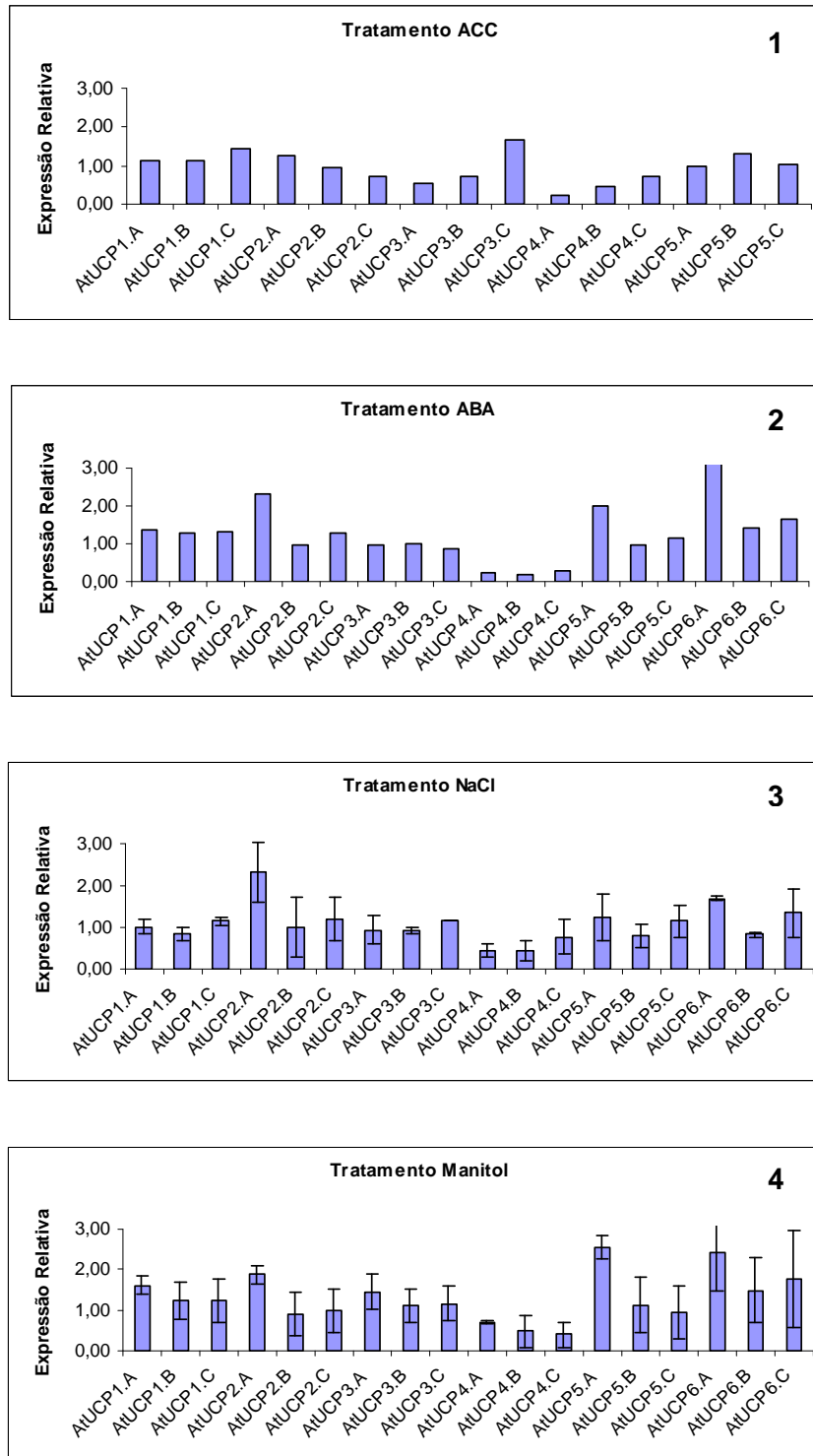


Figura 3. Análise da expressão relativa dos genes *AtUCP1-6* após 12 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de tratamento. As análises da expressão relativa foram feitas usando como normalizadores, o gene endógeno *FDHI* para os tratamentos com ACC e ABA, e o gene *40S* para os tratamentos com NaCl e manitol.

foi validada pela indução do gene *PDF1.2* que é responsivo ao etileno (após 24 h de tratamento observou-se um aumento da expressão de ~14,5x).

Embora os nossos resultados tenham demonstrado uma inibição no perfil de expressão de um gene em resposta ao ACC, a indução da expressão de algumas pUCPs durante a maturação de frutos climatéricos é relatada na literatura. Segundo Considine e colaboradores (2001), a expressão dos genes que codificam pUCPs é fortemente aumentada nos estágios finais da maturação (senescência) de frutos de manga. Resultados semelhantes foram observados em estágios tardios da maturação de frutos de tomate mantidos na própria planta (Holtzapffel *et al.*, 2002). Estes dados corroboram o maior acoplamento observado em mitocôndrias isoladas de tomates verdes quando comparado com o obtido com mitocôndrias de tomates vermelhos (Costa *et al.*, 1999).

Além do etileno, existem evidências na literatura de que a expressão dos genes que codificam pUCPs é induzida por um outro fitohormônio, o ácido abscísico (ABA). Análises empregando microarranjos demonstraram a indução dos genes *AtUCP4* e *AtUCP5* mediante tratamento com ABA (Seki *et al.*, 2002). O ABA desempenha um papel importante na dormência de sementes e gemas, bem como na resposta ao estresse hídrico (Taiz e Zeiger, 2006). Na Figura 3.2 encontram-se os perfis de expressão dos seis genes investigados em resposta ao tratamento com ABA. Um aumento significativo da expressão relativa, 12h após o tratamento, foi observado para três dos seis genes investigados: *AtUCP2* (2,33 x), *AtUCP5* (2,02 x) e *AtUCP6* (3,14 x). Dentre os genes cuja expressão foi induzida encontra-se o gene *AtUCP5* que já havia sido relacionado por Seki e colaboradores (2002) como induzido por ABA. O único gene que demonstrou uma inibição significativa da expressão (até 5,3 x) nos três tempos analisados foi o *AtUCP4*. A confirmação dos efeitos do tratamento com

ABA foi validada pela indução observada para o gene *AtbZip39* responsivo a este hormônio (após 12 h de tratamento observou-se um aumento da expressão de ~3,6x).

As mitocôndrias representam a maior fonte de geração de EROs em células submetidas a estresse. Evidências experimentais têm demonstrado que os dois sistemas dissipadores presentes em plantas, as UCPs e as AOxs, atuam na regulação da produção de EROs mitocondrial, e nos últimos anos, diversos estudos têm relacionado a função fisiológica das pUCPs com a proteção celular contra o estresse oxidativo (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 1999; Brandalise *et al.*, 2003b). A fim de investigar os efeitos do estresse oxidativo na transcrição dos genes em estudo, plântulas de *Arabidopsis* foram submetidas a tratamentos que promovem estresse salino e osmótico, os quais sabidamente afetam a função mitocondrial e acentuam o estresse oxidativo na organela.

Os dados da literatura a respeito dos efeitos potenciais de tais estresses na expressão das pUCPs são controversos já que alguns trabalhos sugerem uma modulação transcricional (Dlasková *et al.*, 2006) enquanto outros indicam para uma regulação bioquímica em nível protéico (Trono *et al.*, 2006; Pastore *et al.*, 2007). De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.3, as alterações no perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao estresse salino foram observadas pela inibição (até 2,3 x) da expressão do gene *AtUCP4* e pela indução do gene *AtUCP2*, cuja expressão foi induzida após 12 horas com subsequente queda. Em contrapartida, quando as plântulas foram tratadas com manitol, um aumento significativo na expressão relativa de dois genes, *AtUCP5* e *AtUCP6*, com um pico de expressão no tempo de 12 horas após o tratamento (2,55 x e 2,43 x, respectivamente), pode ser constatado (Figura 3.4). O gene *AtUCP4* apresentou uma inibição na expressão (até 2,5 x). Os efeitos dos tratamentos com NaCl e manitol foram validados pelas induções

observadas para o gene *RD29A*, com um aumento da expressão após 12 h de tratamento de ~9,4 x e ~27 x, respectivamente.

Baseado nos dados de expressão relativa podemos sugerir que os genes *AtUCP5* e *AtUCP6* podem estar envolvidos na resposta adaptativa ao estresse osmótico sendo os mesmos responsivos ao ABA, que é um importante mediador da resposta fisiológica da planta a determinados estresses, especialmente aqueles envolvidos com balanço hídrico. O gene *AtUCP2* foi induzido pelo estresse salino, o que sugere sua participação nessa resposta adaptativa também. Esses dados indicam que tais genes têm uma regulação transcricional já que foram induzidos pelos tratamentos empregados, muito provavelmente pela acumulação de EROs geradas durante a injúria provocada pelo estresse. As proteínas resultantes atuariam, nesse caso, como auxiliares do sistema detoxificante, reduzindo a geração de EROs através do desacoplamento.

Como não foram observadas mudanças na expressão relativa dos genes investigados *AtUCP1* e *AtUCP3*, é bastante provável que os mesmos não sejam regulados transcionalmente pelos fatores investigados, fato que sugere a existência de mecanismos de regulação que não envolva a indução da expressão gênica e conseqüente aumento no conteúdo de proteína. Nesse caso é possível que, como resultado da ativação por EROs, a atividade desacopladora dessas isoformas seja aumentada sem a necessidade de um aumento na quantidade de proteína total como sugerido por Pastore e colaboradores (2007). Essa perspectiva, entretanto, necessita de confirmação experimental.

O gene *AtUCP4* demonstrou em todos os tratamentos uma inibição na sua expressão, gerando uma indagação sobre a possível função desse gene.

II.2.2. Amplificação e clonagem das regiões promotoras

As regiões promotoras dos genes *AtUCP1* (seqüência no Apêndice 1) e *AtUCP2* (seqüência no Apêndice 2) foram amplificadas via PCR e inseridas no vetor pCAMBIA-1381z controlando a transcrição do gene repórter *uidA* (GUS; Figura 4), que codifica a enzima β -glucoronidase de *Escherichia coli*. A fim de eliminar uma possível expressão de GUS pela agrobactéria, o vetor 1381z apresenta um íntron no início da região codificadora de GUS (Figura 4). Cabe ressaltar que esses genes foram escolhidos para caracterização de suas regiões promotoras por serem aqueles melhor caracterizados dentre os identificados em *A. thaliana*.

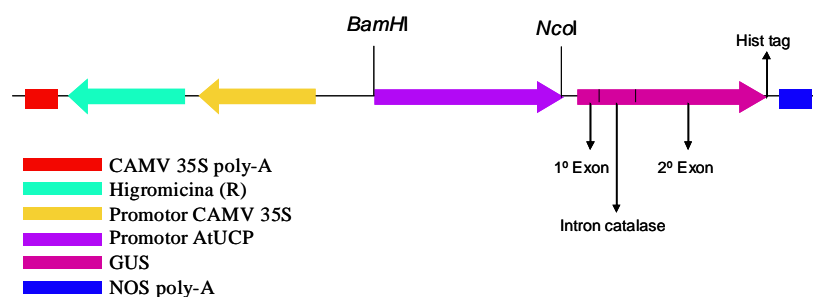


Figura 4. Desenho esquemático do cassete de expressão contendo os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* inseridos em pCAMBIA-1381z.

II.2.3. Análises moleculares das plantas transformadas

Colônias de agrobactéria contendo o vetor recombinante foram selecionadas por amplificação do fragmento de interesse via PCR. Colônias positivas foram então utilizadas para a transformação de discos foliares de *N. tabacum*. As linhagens de plantas regeneradas (RO) foram analisadas quanto à presença das seqüências promotoras via PCR de DNA genômico. A presença de transcritos do gene *uidA* nas linhagens positivas foi confirmada por RT-PCR empregando RNA total (Figura 5). As

linhagens positivas assim identificadas, originadas de diferentes eventos de transformação, foram então utilizadas para a análise histoquímica da atividade da proteína GUS.

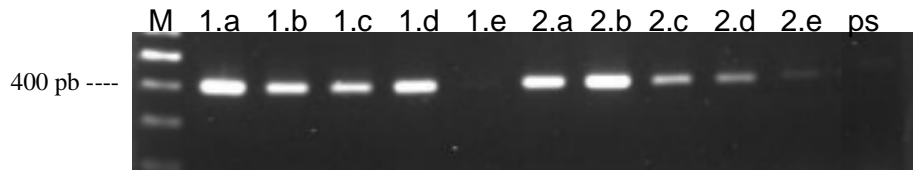


Figura 5. Análise por RT-PCR da expressão do gene *uidA* (GUS) nas linhagens transformadas (cada letra representa uma linhagem – a,b,c,d,e). Na figura, M representa o marcador de peso molecular; 1.(a-e) indicam os transcritos de GUS para as diferentes linhagens de plantas transgênicas para a região promotora do gene *AtUCP1*; 2.(a-e) indicam os transcritos de GUS para as diferentes linhagens de plantas transgênicas para a região promotora de gene *AtUCP2*; como controle negativo foi utilizada uma planta selvagem (ps). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

II.2.4. Análise histoquímica da atividade GUS nas linhagens transformadas

A atividade GUS foi analisada *in situ* nas linhagens transformadas com as construções contendo o gene repórter GUS sob o controle dos promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2*, denominadas respectivamente de *AtUCP1:GUS* e *AtUCP2:GUS*. Como controles positivo e negativo de tais ensaios foram utilizadas plantas transformadas com uma construção contendo o gene repórter GUS sob o controle do promotor 35S, denominada *35S:GUS* (Figura 6G-L), e plantas tipo selvagem, respectivamente (Figura 6A-F).

Os ensaios histoquímicos realizados em plântulas transgênicas da geração R1, 15 dias após a germinação, demonstraram que somente nas linhagens contendo o cassete *AtUCP1:GUS* ocorreu a expressão da proteína GUS em níveis detectáveis pelo ensaio (Figura 6M e S). O padrão de expressão observado nas plantas *AtUCP1:GUS* apresentou consistência em quatro linhagens transformadas (de oito

analisadas; Tabela 4). Nesse caso, a atividade enzimática de GUS foi detectada na região do meristema apical, nos feixes vasculares dos pecíolos e em parte dos feixes das folhas (Figura 6M).

Tabela 4. Número de linhagens transgênicas com padrão de expressão consistente para os promotores em estudo.

TRANSGENE	PLÂNTULAS R1	PLÂNTULAS R1	PLANTAS R1	PLANTAS R1
	Nº DE LINHAGENS ANALISADAS	Nº DE LINHAGENS COM O PADRÃO CONSISTENTE	Nº DE LINHAGENS ANALISADAS	Nº DE LINHAGENS COM O PADRÃO CONSISTENTE
Promotor <i>AtUCP1</i>	8	4	3	3
Promotor <i>AtUCP2</i>	10	-	4	1

As plântulas R1 foram mantidas em câmara de crescimento para que novos ensaios fossem realizados em plantas em estágio de desenvolvimento mais avançado (4 meses). Os órgãos/tecidos analisados em tais plantas foram: raiz, folha, flor e fruto. Os ensaios histoquímicos para GUS demonstraram um padrão de expressão ubíquo do repórter nas plantas *AtUCP1:GUS* (Figura 6M-R). Nesse caso, o padrão de expressão observado foi consistente para as três linhagens analisadas (Tabela 4). A fim de complementar tal informação, a expressão relativa do gene repórter em uma dessas linhagens foi determinada por qPCR. Nesse caso, a expressão observada nos diferentes órgãos/tecidos foi semelhante entre eles (Figura 7).

Nos ensaios histoquímicos das plantas *AtUCP2:GUS*, a atividade GUS foi detectada somente na raiz de uma planta madura (Figura 4Z), sendo que nenhuma atividade adicional pode ser observada nos demais órgãos/tecidos analisados (Figura

6T-X). No trabalho de Borecký e colaboradores (2006), a expressão do gene *AtUCP2* em *Arabidopsis* foi detectada somente em silca verde e raiz. Apesar do padrão de expressão observado nas análises histoquímicas em tabaco ser coerente com esse resultado, novos ensaios visando quantificar e expressão relativa de GUS nas plantas *AtUCP2:GUS* seriam necessários para confirmar os dados de histoquímica e estabelecer em definitivo o padrão de expressão do promotor *AtUCP2*.

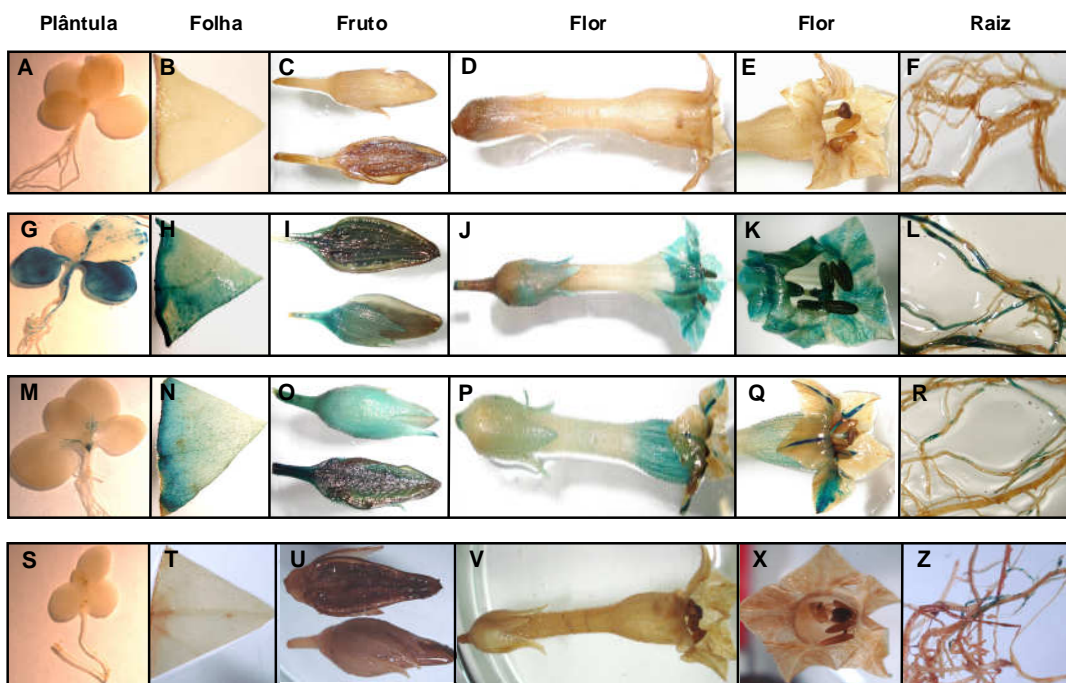


Figura 6. Ensaio histoquímico da atividade GUS em plântulas e plantas maduras R1 de *N. tabacum* transformadas com os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* e o promotor 35S. (A-F) plantas tipo selvagem, (G-L) plantas 35S:GUS, (M-R) plantas *AtUCP1:GUS* e (S-Z) plantas *AtUCP2:GUS*.

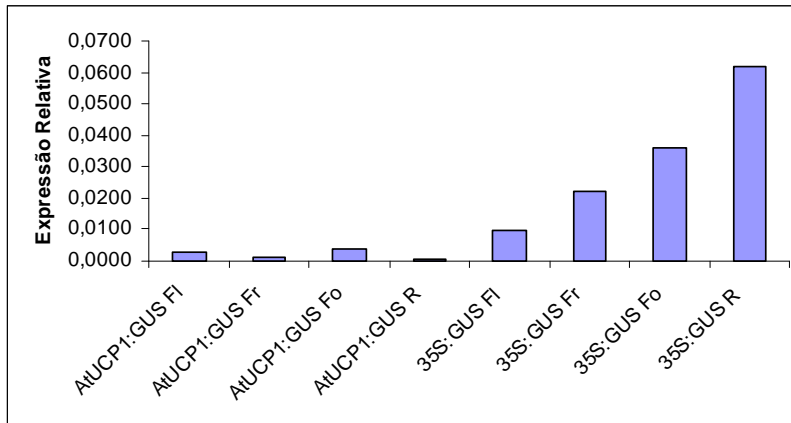


Figure 7. Expressão relativa de GUS em diferentes órgãos/tecidos de plantas transgênicas *AtUCP1:GUS* determinada por qPCR. Os órgãos analisados foram: Flor (Fl), Fruto (Fr), Folha (Fo) e Raiz (R). Amostras retiradas de uma planta transgênica contendo o gene repórter sobre controle do promotor 35S foram utilizadas como controle.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A ZmUCP tem propriedades bioquímicas similares às observadas para pUCPs de espécies dicotiledôneas;
- ✓ Através de estudos da relação-estrutura função em pUCPs foi possível localizar importantes resíduos que interferem na ligação por ativadores (FA) e inibidores (PN), além de resíduos que interferem na atividade geral destas proteínas;
- ✓ De acordo com os dados obtidos para AtUCP1 reconstituída em lipossomos, a observação de que o HNE interfere no fluxo de prótons das pUCPs não foi consistente;
- ✓ Alterações no perfil de expressão dos genes *AtUCP5* e *AtUCP6* mediante os tratamentos com ABA e manitol, e do gene *AtUCP2* mediante os tratamentos com NaCl e ABA, foram constatadas;
- ✓ Os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* quando fusionados ao gene repórter GUS promovem, respectivamente, um padrão de expressão ubíquo e preferencialmente em raízes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit, **Plant Physiol**, v.119, p.1323-1329, 1999.

ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R.; KAZAN, K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*, **Plant cell**, v.16, p.3460-3479, 2004.

ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M-E. Molecular Biology of Thermoregulation. Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation, **J Appl Physiol**, v.92, p.2187-2198, 2002.

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; COSTA, J.H.; MELO, D.F. AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress?, **Trends Plant Sci.**, v.11, p. 281-287, 2006.

ARROYO, A.; BOSSI, F.; FINKELSTEIN, R.R.; LEÓN, P. Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*, **Plant Physiol**, v.133, p.231-242, 2003.

ARSENIJEVIC, D.; ONUMA, H.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; MANNING, B.S.; MIROUX, B.; COUPLAN, E.; ALVES-GUERRA, M.C.; GOUBERN, M.; SURWIT, R.; BOUILLAUD, F.; RICHARD, D.; COLLINS, S.; RICQUIER, D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production, **Nat Genet**, v.26, p.435-439, 2000.

BAO, S.; KENNEDY, A.; WOJCIECHOWSKI, B.; WALLACE, P.; GANAWAY, E.; GARVEY, W.T. Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes, **Diabetes**, v.47, p.1935-1940, 1998.

BERTHOLD, D.A.; SIEDOW, J.N. Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) mitochondrial, **Plant Physiol**, v.101, p.113-119, 1993.

BIENENGRAEBER, M.; ECHTAY, K.S.; KLINGENBERG, M. H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a Histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3, **Biochemistry**, v.37, p.3-8, 1998.

BORECKÝ J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants, **Biosci Rep**, v.21, p.201-212, 2001a.

BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; COSTA, A.D.T.; JEŽEK, P.; CHAIMOVICH, H.; ANDRADE P.B.M.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. Functional reconstitution of

Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein (*AtPUMP1*) expressed in *Escherichia coli*, **FEBS Lett**, v.505, p.240-244, 2001b.

BORECKÝ, J.; NOGUEIRA, F.T.S.; DE OLIVEIRA, K.A.P.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots, **J Exp Bot**, v.57, p.849-864, 2006.

BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress, **Biosci Rep**, v.25, p.271-286, 2005.

BOSS, O.; SAMEC, S.; KUHNE, F.; BIJLENGA, P.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.; SEYDOUX, J.; GIACOBINO, J-P.; MUZZIN, P. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not changes in environmental temperature, **J Biol Chem**, v.273, p.5-8, 1998.

BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. Uncoupling protein-3: a new member of mitochondrial carrier family with tissue-specific expression, **FEBS Lett**, v.408, p.39-42, 1997.

BOUILLAUD, F.; ARECHAGA, I.; PETIT, P.X.; RAIMBAULT, S.; LEVI-MEYRUEIS, C.; CASTEILLA, L.; LAURENT, M.; RIAL, E.; RICQUIER, D. A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein, **EMBO J**, v.13, p.1990-1997, 1994.

BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. ZmPUMP encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress, **Plant Sci**, v.165, p.329-335, 2003a.

BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress, **J Bioenerg Biomembr**, v.35, p.203-209, 2003b.

CADENAS, S.; BUCKINGHAM, J.A.; SAMEC, S.; SEYDOUX, J.; DIN, N.; DULLOO, A.G.; BRAND, M.D. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged, **FEBS Lett**, v.462, p.257-260, 1999.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance, **Physiol Rev**, v.84, p.277-359, 2004.

CANNON, B.; SHABALINA, I.G.; KRAMAROVA, T.V.; PETROVIC, N.; NEDERGAARD, J. Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species—or not?, **Biochim Biophys Acta**, v.1757, p.449-458, 2006.

CARROLL, A.M.; HAINES, L.R.; PEARSON, T.W.; FALLON, P.; WALSH, C.; BRENNAN, C.M.; BREEN, E.P.; PORTER, R.K. Identification of a Functioning

Mitochondrial Uncoupling Protein 1 in Thymus, **J Biol Chem**, v.280, p.15534-15543, 2005.

CAVALHEIRO, R.A.; FORTES, F.; BORECKÝ, J.; FAUSTINONI, V.C.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*, **Br J Med Biol Res**, v.37, p.1455-1461, 2004.

CHAN, C.B.; MACDONALD, P.E.; SALEH, M.C.; JOHNS, D.C.; MARBÀN, E.; WHEELER, M.B. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets, **Diabetes**, v.48, p.1-5, 1999.

CHARRIER, B.; CHAMPION, A.; HENRY, Y.; KREIS, M. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, **Plant Physiol**, v.130, p.577-590, 2002.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H.S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*, **Plant Physiol**, v.129, p.661-677, 2002.

CLARKSON, A.B.; BIENEN, E.J.; POLLAKIS, G.; GRADY, R.J. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase, **J Biol Chem**, v.264, p.17770-17776, 1989.

CLINE, G.W.; VIDAL-PUIG, A.J.; DUFOUR, S.; CADMAN, K.S.; LOWELL, B.B.; SHULMAN, G.I. In vivo effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism, **J Biol Chem**, v.276, p.20240-20244, 2001.

CONSIDINE, M.J.; DALEY, D.O.; WHELAN, J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, **Plant Physiol**, v.126, p.1619-1629, 2001.

COSIDINE, M.J.; GOODMAN, M.; ECHTAY, K.S.; LALOI, M.; WHELAN, J.; BRAND M.D.; SWEETLOVE, L.J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein, **J Biol Chem**, v.278, p.22298-22302, 2003.

COSTA, A.D.T.; NANTES, I.L.; JEŽEK, P.; LEITE, A.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening, **J Bioenerg Biomembr**, v.31, p.527-533, 1999.

CZARNA, M.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria, **FEBS Lett**, v.579, p.3136-3140, 2005.

DESIKAN, R.; A-H-MACKERNESS, S.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress, **Plant Physiol**, v.127, p.159-172, 2001.

DLASKOVÁ, A.; ŠPAČEK, T.; ŠKOBISOVÁ, E.; ŠANTOROVÁ, J.; JEŽEK, P. Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo, **Biochim Biophys Acta**, v.1757, p.467-473, 2006.

DOLFERUS, R.; OSTERMAN, J.C.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Cloning of the *Arabidopsis* and rice formaldehyde dehydrogenase gene: Implications for the origin of plant ADH enzymes, **Genetics**, v.146, p.1131-1141, 1997.

DRY, J.; MOORE, A.L.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondrial: nonlinear relationship between electron flux and redox poise of the quinone pool, **Arch Biochem Biophys**, v.273, p.148-157, 1989.

ECHTAY, K.S.; BIENENGRABER, M.; KLINGENBERG, M. Mutagenesis of the uncoupling protein of brown adipose tissue. Neutralization of E190 largely abolished pH control of nucleotide binding, **Biochemistry**, v.36, p.8253-8260, 1997.

ECHTAY, K.S.; BIENENGRABER, M.; KLINGENBERG, M. Role of intrahelical arginine residues in functional properties of uncoupling protein (UCP1), **Biochemistry**, v.40, p.5243-5248, 2001.

ECHTAY, K.S.; ESTEVES, T.C.; PAKAY, J.L.; JEKABSONS, M.B.; LAMBERT, A.J.; PORTERO-OTÍN, M.; PAMPLONA, R.; VIDAL-PUIG, A.J.; WANG, S.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.D. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling, **EMBO J**, v.22, p.4103-4110, 2003.

ECHTAY, K.S.; LIU, Q.; CASKEY, T.; WINKLER, E.; FRISCHMUTH, K.; BIENENGRABER, M.; KLINGENBERG, M. Regulation of UCP3 by nucleotides is different from regulation of UCP1, **FEBS Lett.**, v.450, p.8-12, 1999.

ECHTAY, K.S.; ROUSSEL, D.; ST-PIERRE, J.; JEKABSONS, M.B.; CADENAS, S.; STUART, J.A.; HARPER, J.A.; ROEBUCK, S.J.; PICKERING, A.M.S.; CLAPHAM, J.C.; BRAND, M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins, **Nature**, v.415, p.96-99, 2002.

ECHTAY, K.S.; WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function, **Nature**, v.408, p. 609-613, 2000.

ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L.; MCINTOSH, L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria, **Plant Physiol**, v.89, p.1311-1317, 1989.

ERLANSON-ALBERTSSON, C.; The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism, **Acta Physiol Scand**, v.178, p.405-412, 2003.

ESTERBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; STRIEGL, G.; WAEG, G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein, **Am J Clin Nutr**, v.53, p. 314-321, 1991.

ESTEVES, T.C.; BRAND, M.D. The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3, **Biochim Biophys Acta**, v.1709, p.35-44, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a edição. Brasília: Embrapa, 1998. 220p.

FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M.F.; SURWIT, R.S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C.H. Uncoupling protein2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia, **Nat Genet**, v.15, p.269-272, 1997.

FRIDELL, Y-W.C.; SÁNCHEZ-BLANCO, A.; SILVIA, B.A.; HELFAND, S.L. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein, **J Bioenerg Biomembr**, v.36, p.219–228, 2004.

GARLID, K.D.; JABŮREK, M.; JEŽEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins, **FEBS Lett**, v.438, p.10-14, 1998.

GARLID, K.D.; JABŮREK, M.; JEŽEK, P.; VAŘECHA, M. How do uncoupling proteins uncouple?, **Biochim Biophys Acta**, v.1459, p.383-389, 2000.

GARLID, K.D.; OROSZ, D.E.; MODRIANSKÝ, M.; VASSANELLI, S.; JEŽEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein, **J Biol Chem**, v.271, p.2615-2620, 1996.

GONÇALVES, R.P.; BUZHYNKY N.; PRIMA V.; STURGIS, J.N.; SCHEURING, S. Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes, **J Mol Biol**, v.369, p.413–418, 2007.

GONG, D.W.; MONEMDJOU, S.; GAVRILOVA, O.; LEON, L.R.; MARCUS-SAMUELS, B.; CHOU, C.J.; EVERETT, C.; KOZAK, L.P.; LI, C.; DENG, C.; HARPER, M.E.; REITMAN, M.L. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3, **J Biol Chem**, v.275, p.16251-16257, 2000.

GONZÁLEZ-BARROSO, M.M.; FLEURY, C.; ARECHAGA, I.; ZARAGOZA, P.; LEVI-MEYRUEIS, C.; RAIMBAULT, S.; RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F.; RIAL, E. Activation of the uncoupling protein by fatty acids is modulated by mutations in the C-terminal region of the protein, **Eur J Biochem**, v.239, p.445-450, 1996.

HAFERKAMP, I. The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants, **FEBS Lett**, v.581, p. 2375–2379, 2007.

HAGEN, T.; LOWELL, B.B. Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids, **Biochem Biophys Res Commun**, v.276, p.642-648, 2000.

HANÁK, P.; JEŽEK, P. Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis- UCP4 as the ancestral uncoupling protein, **FEBS Lett**, v.495, p.137-141, 2001.

HOLTZAPFFEL, R.C.; FINNEGAN, P.M.; MILLAR, A.H.; BADGER, M.R.; DAY, D.A. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage, **Funct Plant Biol**, v.29, p.827–834, 2002.

HUSSEINI, N.M. Análise da expressão dos genes que codificam a proteína mitocondrial desacopladora em *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1-6*), estudos in vivo empregando plantas transgênicas e mapeamento do sinal de endereçamento da proteína AtUCP1. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ITO, K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*), **Plant Sci.** v.149, p.167-173, 1999.

ITO, K.; ABE, Y.; JOHNSTON, S.D.; & SEYMOUR, R.S. Ubiquitous expression of a gene encoding for uncoupling protein isolated from the thermogenic inflorescence of the dead horse arum *Helicodiceros muscivorus*, **J Exp Bot**, v.54, p.1113-1114, 2003.

ITO, K.; Matsukawa, K.; Kato, Y. Functional analysis of skunk cabbage SfUCPB, a unique uncoupling protein lacking the fifth transmembrane domain, in yeast cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.349, p.383-390, 2006.

JABŮREK, M.; VAŘECHA, M.; GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; JEŽEK, P.; ZHANG, M.; BURN, P.; TARTAGLIA, L.A.; GARLID, K.D. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3, **J Biol Chem**, v.274, p.26003-26007, 1999.

JARMUSZKIEWICZ, W.; ALMEIDA, A.M.; SLUSE-GOFFART, C.M.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration, **J Biol Chem**, v.273, p.34882-34886, 1998.

JARMUSZKIEWICZ, W.; BEHRENDT, M.; NAVET, R.; SLUSE, F.E. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development, **FEBS Lett**, v.532, p.459-464, 2002.

JARMUSZKIEWICZ, W.; MILANI, G.; FORTES, F.; SCHREIBER, A.Z.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*, **FEBS Lett**, v.467, p.145-149, 2000.

JARMUSZKIEWICZ, W.; NAVET, W.; ALBERICI, L.C.; DOUETTE, P.; SLUSE-GOFFART, C.M.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. Redox state of endogenous coenzyme Q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanoside triphosphate in isolated skeletal muscle mitochondrial, **J Bioenerg Biomembr**, v.36, p.493-502, 2004.

JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE, F.E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*, **J Biol Chem**, v.274, p.23198-23202, 1999.

JARMUSZKIEWICZ, W.; WAGNER, A.M.; WAGNER, M.J.; HRYNIEWIECKA, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria, **FEBS Lett**, v.411, p.110-114, 1997.

JEFFERSOM, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.V. GUS fusions β -glucuronidase as a sensitive and versatile marker in higher plants. **EMBO J**, v.6, p.3901-3907, 1987.

JEŽEK, P. Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins, **J Bioenerg Biomembr**, v.31, p.457-466, 1999.

JEŽEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria, **J Biol Chem**, p.271, v.32743-32748, 1996.

JEŽEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism, **J Biol Chem**, v.272, p.24272-24278, 1997.

JEŽEK, P.; HOUSTĚK, J.; DRAHOTA, Z. Alkaline pH, membrane potential, and magnesium cations are negative modulators of purine nucleotide inhibition of H⁺ and Cl⁻ transport through the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. **J Bioenerg. Biomembr.** v.20, p.603-622, 1988.

JEŽEK, P.; URBÁNKOVÁ, E. Specific sequence motifs of mitochondrial uncoupling proteins, **IUBMB Life**, v.49, p.63-70, 2000.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, J.; LEDESMA, A.; ZARAGOZA, P.; GONZÁLEZ-BARROSO, M.M.; RIAL, E. Fatty acid activation of the uncoupling proteins requires the presence of the central matrix loop from UCP1, **Biochim Biophys Acta**, v.1757, p.1292-1296, 2006a.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, J.; ZARDOYA, R.; LEDESMA, A.; DE LACOBIA, M.G.; ZARAGOZA, P.; GONZÁLEZ-BARROSO, M.M.; RIAL, E. Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance, **J Mol Biol**, v.359, p.1010-1022, 2006b.

KELLER, P.A.; LEHR, L.; GIACOBINO, J.P.; CHARNAY, Y.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.; GIOVANNINI, N. Cloning, ontogenesis, and localization of an atypical uncoupling protein 4 in *Xenopus laevis*. **Physiol. Genomics**, v.22, p.339-345, 2005.

KENDALL, M.D.; AL-SHAWAF, A.A. Innervation of the rat thymus gland, **Brain Behav Immunol**, v.5, p.9-28, 1991.

KLINGENBERG, M.; ECHTAY, K.S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view, **Biochim Biophys Acta**, v.1504, p.128-143, 2001.

- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, **Plant J**, v.4, p.403-410, 1993.
- KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain, **FEBS Lett**, v.425, p.213-216, 1998.
- KRAUSS, S.; ZHANG, C.Y.; LOWELL, B.B. The mitochondrial uncoupling protein homologues, **Nature Reviews**, v.6, p.248-261, 2005.
- KREPS, J.A.; WU, Y.; CHANG, H-S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J.F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress, **Plant Physiol**, v.130, p.2129-2141, 2002.
- KUCEJ, M.; BUTOW, R.A. Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids, **Trends Cell Biol**, v.17, p.586-592, 2007.
- LALOI, M.; KLEIN, M.; REISMEIER, J.W.; MÜLLER-RÖBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein, **Nature**, v.389, p.135-136, 1997.
- LAMBOWITZ, A.M.; SABOURIN, J.; BERTRAND, H.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria, **Mol Cell Biol**, v.9, p.1362-1364, 1989.
- LEVY, M.; EDELBAUM, O.; SELA, I. Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene N. **Plant Physiology**, v.135, p.2392-2397, 2004.
- LIU, S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria, **Biosci Rep**, v.17, p.259-272, 1997.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta \Delta CT}$ method, **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LOGAN, D.C. The mitochondrial compartment. **J Exp Botany**, v.57, p.1225-1243, 2006.
- LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense, **Plant cell**, v.15, p.165-178, 2003.
- MAIA, I.G.; BENEDETTI, C.E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S.R.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. *AtPUMP*: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein, **FEBS Lett**, v.429, p.403-406, 1998.
- MANNELLA, C.A. Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications, **J Struct Biol**, v.121, p.207-218, 1998.
- MATSUDA, J.; HOSODA, K.; ITOH, H.; SON, C.; DOI, K.; TANAKA, T.; FUKUNAGA, Y.; INOUE, G.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; YAMORI, Y.;

- NAKAO, K. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet, **FEBS Lett**, v.418, p.200-204, 1997.
- MAXWELL, D.P.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence, **Plant J**, v.29, p.269-279, 2002.
- MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; AND MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen species production in plant cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.8271-8276, 1999.
- MILANI, G.; JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Respiratory chain network in mitochondrial of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways, **FEBS Lett**, v.508, p.231-235, 2001.
- MILLAR, A.H.; HEAZLEWOOD, J.L. Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*, **Plant Physiol**, v.131, p.443-453, 2003.
- MINAGAWA, N.; SAKAJO, S.; YOSHIMOTO, A. Effects of unsaturated fatty acids on cyanide-resistant respiration of mitochondrial isolated from *Hansenula anomala*, **FEBS Lett**, v.302, p.217-219, 1992.
- MIZUNO, T.; MIURA-SUZUKI, T.; YAMASHITA, H.; MORI, N. Distinct regulation of brain mitochondrial carrier protein-1 and uncoupling protein-2 gene in rat brain during cold exposure and aging, **Biochem Biophys Res Commun**, v.278, p.691-697, 2000.
- MODRIANSKÝ, M.; MURDZA-INGLIS, D.L.; PATEL, H.V.; FREEMAN, K.B.; GARLID, K.D. Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition, **J Biol Chem**, v.272, p.24759-24762, 1997.
- MOORE, A.L.; SIEDOW, J.N. The regulation and nature of the cyanide resistant alternative oxidase of plant mitochondrial, **Biochem Biophys Acta**, v.1059, p.121-140, 1991.
- MOORE, A.L.; UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondrial: a model of the active site, **J Bioenerg Biomembr**, v.27, p.367-377, 1995.
- MOZO, J.; EMRE, Y.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; CRISCUOLO, F. Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds?, **Biosci Rep**, v.25, p.227-249, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiol Plant**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURAYAMA, S.; HANDA, H. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondria uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature, **Mol Gen Genet**, v.264, p.112-118, 2000.

MURPHY, M.P.; ECHTAY, K.S.; BLAIKIE, F.H.; ASIN-CAYUELA, J.; COCHEMÉ, H.M.; GREEN, K.; BUCKINGHAM, J.A.; TAYLOR, E.R.; HURRELL, F.; HUGHES, G.; MIWA, S.; COOPER, C.E.; SVISTUNENKO, D.A.; SMITH, R.A.J.; BRAND, M.D. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation, **J Biol Chem**, v.278, p.48534-48545, 2003.

NEDERGAARD, J. AND CANNON, B. The novel uncoupling proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions, **Exp Physiol**, v.88, p.65-84, 2003.

NIBBELINK, M.; MOULIN, K.; ARNAUD, E.; DUVAL, C.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells, **J Biol Chem**, v.276, p.47291-47295, 2001.

NICHOLLS, D.G. A history of UCP1, **Biochem Soc Trans**, v.29, p.751-755, 2001.

NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1, **J Bioenerg Biomembr**, v.31, p.399-406, 1999.

ONDA, Y.; KATO, Y.; ABE, Y.; ITO, T.; MOROHASHI, M.; ITO, Y.; ICHIKAWA, M.; MATSUKAWA, K.; KAKIZAKI, Y.; KOIWA, H.; ITO, K. Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage, *Plant Physiol*, v.146, p.636-645, 2008.

PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria, **FEBS Lett**, v.470, p.88-92, 2000.

PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; FLAGELLA, Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria, **J. Exp. Bot.**, v.58, p.195-210, 2007.

PEBAY-PEYROULA, E.; DAHOUT-GONZALEZ, C.; KAHN, R.; TRÉZÉGUET, V.; LAUQUIN, G.J-M.; BRANDOLIN, G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside, **Nature**, v.426, p.39-44, 2003.

PECQUEUR, C.; BUI, T.; GELLY, C.; HAUCHARD, J.; BARBOT, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; MIROUX, B.; THOMPSON, C.B. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization, **FASEB J.**, v.22, p.9-18, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, **Nucleic acids res**, v.29, p.2003-2007, 2001.

PICAULT, N., HODGES, M., PALMIERI, L., PALMIERI, F. The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, v.9, p.138-146, 2004.

POLONSKY, K.S.; SEMENKOVICH, C.F. The pancreatic beta cell heats up: UCP2 and insulin secretion in diabetes, **Cell**, v.105, p.705-707, 2001.

- PORTER, R.K. A new look at UCP1, **Biochim Biophys Acta**, v.1757, p.446-448, 2006.
- RAIMBAULT, S.; DRIDI, S.; DENJEAN, F.; LACHUER, J.; COUPLAN, E.; BOUILLAUD, F.; BORDAS, A.; DUCHAMP, C.; TAOUIS, M.; RICQUIER, D. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds, **Biochem J**, v.353, p.441-44, 2001.
- RAMARKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, **Neurosci Lett**, v.339, p.62-66, 2003.
- RASMUSSEN, A.G.; SOOLE, K.L.; ELTHON, T.E. Alternative NAD(P)H dehydrogenase of plant mitochondria, **Annu Rev Plant Biol**, v.55, p.23-39, 2004.
- RHOADS, D.M.; MCINTOSH, L. Isolation and characterization of cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott), **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.2122-2126, 1991.
- RIAL, E.; AGUIRREGOITIA, E.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, J.; LEDESMA, A.; Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism, **Biochim Biophys Acta**, 1608, 122-130, 2004.
- RICQUIER, D.; KADER, J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study, **Biochem Biophys Res Commun**, v.73, p.577-583, 1976.
- RIPPE, C.; BERGER, K.; BOIERS, C.; RICQUIER, D.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression, **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.279, p.293-300, 2000.
- SAKAJO, S.; MINAGAWA, N.; KOMIYAMA, T.; YOSHIMOTO, A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*, **Biochim Biophys Acta**, v.1090, p.102-108, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. E. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd e., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SAMEC, S.; SEYDOUX, J.; DULLOO, A.G. Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance, **Diabetes**, v.48, p.436-441, 1999.
- SAMEC, S.; SEYDOUX, J.; DULLOO, A.G. Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis of regulators of lipids as fuel substrate?, **FASEB J**, v.12, p.715-724, 1998.
- SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M.; GRÉGOIRE, F.; EASLICK, J.; RAIMBAULT, S.; LÉVI-MEYRUEIS, C.; MIROUX, B.; COLLINS, S.; SELDIN, M.; RICHARD, D.; WARDEN, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. 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**, v.273, p.34611-34615, 1998.

SCHONBAUM, G.R.; BONNER, W.D.; STOREY, B.T.; BAHR, J.T. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondrial by hydroxamic acids, **Plant Physiol**, v.47, p.124-128, 1971.

SEKI, M.; ISHIDA, J.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T.; UMEZAWA, T.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray, **Funct. Integr Genomics**, v.2, p.282-291, 2002.

SHABALINA, I.G.; PETROVIC, N.; KRAMAROVA, T.V.; HOEKS, J.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. UCP1 and defense against Oxidative Stress, 4-hydroxy-2-nonenal effects on brown fat mitochondria are uncoupling protein 1-independent, **J Biol Chem**, v.281, p.13882-13893, 2006.

SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology, **Plant Cell**, v.7, p.821-831, 1995.

SLUSE, F.E.; ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.W.; VERCESI, A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria, **FEBS Lett**, v.433, p.237-240, 1998.

SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondrial from tomato fruit, **Braz J Med Biol Res**, v.33, p.259-268, 2000.

SMITH, A.M.; RATCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants, **J Biol Chem**, v.279, p.51944-51952, 2004.

STUART, J.A.; HARPER, J.A.; BRINDLE, K.M.; BRAND, M.D. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates, **Biochim Biophys Acta**, v.1413, p.50-54, 1999.

SURWIT, R.S.; WANG, S.; PETRO, A.E.; SANCHIS, D.; RAIMBAULT, S.; RICQUIER, D.; COLLINS, S. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.4061-4065, 1998.

SWEETLOVE, L.J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M.; NUNES-NESE, A.; TAYLOR, N.L.; BAXTER, C.J.; EICKMEIER, I.; FERNIE, A.R. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, p.19587-19592, 2006.

SWIDZINSKI, J.A.; SWEETLOVE, L.J.; LEAVER, C.J. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*, **Plant J**, v.30, p.431-446, 2002.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3^a edição. Artmed, 2006. 720p.
- TALBOT, D.A.; HANUISE, N.; REY, B.; ROUANET, J-L.; DUCHAMP, C.; BRAND, M.D. Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*), **Biochem Biophys Res Commun**, v.312, p.983–988, 2003.
- TAYLOR, N.L.; HEAZLEWOOD, J.L.; DAY, D.A.; MILLAR, A.H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome, **Mol Cell Proteomics**, v.4, p.1122–1132, 2005.
- TRONO, D.; SOCCIO, M.; MASTRANGELO, A.M.; DE SIMONE, V.; DI FONZO, N.; PASTORE, D. The transcript levels of two plant mitochondrial uncoupling protein (pUCP) – related genes are not affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings showing an increased level of pUCP activity, **Biosci Rep**, v.26, p.251-261, 2006.
- UMBACH, A.L.; WISKICH, J.T.; SIEDOW, J.N. Regulation of alternative kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria, **FEBS Lett**, v.348, p.181-184, 1994.
- URBÁNKOVÁ, E.; HANÁK, P.; ŠKOBISOVÁ, E.; RŮŽIČKA, M.; JEŽEK, P. Substitutional mutations in the uncoupling protein-specific sequence of mitochondrial uncoupling protein UCP1 lead to the reduction of fatty acid-induced H⁺ uniport, **Int J Biochem Cell Biol**, v.35, p.212-220, 2003.
- UYEMURA, S.A.; LUO, S.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria, **J Biol Chem**, v.275, p.9709–9715, 2000.
- VAN WEES, S.C.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; GLAZEBROOK, J. Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling, **Plant Physiol**, v.132, p.606–617, 2003.
- VANLERBERGHE, G.C.; VANLERBERGHE, A.E.; MCINTOSH, L. Molecular genetic alteration of plant respiration (silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco), **Plant Physiol**, v.106, p.1503-1510, 1994.
- VERCESI, A.E.; BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. Plant uncoupling mitochondrial proteins, **Annu Rev Plant Biol**, v. 57, p.385-404, 2006.
- VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In JONES, D. P.; LASH, L. H. (Eds). *Methods in toxicology* “Mitochondrial Dysfunction”. New York: Academic Press, 1993. Chapter 21.
- VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEININKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Reports*, v.17, p.43-52, 1997.

VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants, **Nature**, v.375, p.24, 1995.

VIANNA, C.R.; HAGEN, T.; ZHANG, C-Y.; BACHMAN, E.; BOSS, O.; GEREBEN, B.; MORISCOT, A.S.; LOWELL, B.B.; BICUDO, J.E.; BIANCO, A.C. Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds, **Physiol Genomics**, v.5, p.137–45, 2001.

VIDAL-PUIG, A.J.; GRUJIC, D.; ZHANG, C.Y.; HAGEN, T.; BOSS, O.; IDO, Y.; SZCZEPANIK, A.; WADE, J.; MOOTHA, V.; CORTRIGHT, R.; MUOIO, D.M.; LOWELL, B.B. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice, **J Biol Chem**, v.275, p.16258-16266, 2000.

VIDAL-PUIG, A.J.; SOLANES, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J.S.; LOWELL, B.B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue, **Biochem Biophys Res Commun**, v.235, p.79-82, 1997.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. Fundamentos de Bioquímica. 1ª edição. Editora Artmed, 2002. 931p.

WATANABE, A.; HIRAI, A. Two uncoupling protein genes of rice (*Oryza sativa* L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the heat-generating proteins of the subtropical cereal, **Planta**, v.215, p.90-100, 2002.

WATANABE, A.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*, **Plant Cell Physiol**, v.40, p.1160-1166, 1999.

WHITHAM, S.A.; QUAN, S.; CHANG, H.S.; COOPER, B.; ESTES, B.; ZHU, T.; WANG, X.; HOU, Y-M. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants, **Plant J**, v.33, p.271–283, 2003.

WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein, **J Biol Chem**, v.269, p.2508-2515, 1994.

YU, X.X.; MAO, W.; ZHONG, A.; SCHOW, P.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation, **FASEB J**, v.14, p.1611-1618, 2000.

ZHANG, C.Y.; BAFFY, G.; PERRET, P.; KRAUSS, S.; PERONI, O.; GRUJIC, D.; HAGEN, T.; VIDAL-PUIG, A.J.; BOSS, O.; KIM, Y.B.; ZHENG, X.X.; WHEELER, M.B.; SHULMAN, G.I.; CHAN, C.B.; LOWELL, B.B. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes, **Cell**, v.105, p.745-755, 2001.

APÊNDICE 1

Seqüência do promotor do gene *AtUCPI*

Oligonucleotídeo Forward

AGTA AGTCAACTAA AATGGTAGGA AGGTATTATC CACACATCGA AGCCGCCTAT AATTCATTG
ACTATATATT GTCGTCAA GTCTCAATCC AATAGCAAAA AAGTAAACCT CTCATAAAAA TCGCCACCGA
GATATTGATT GTTAGAAAAG CTATTATAAT TGCACAATGA TAATTCAGTT TTGCAATCAT TAAAGTTGTT
GCCAGAATTC ATCTTATTAC CTACCCCACT AGGCCACTAC TTCTTCTTCT TCGTCCCAA AGGAGACACT
AATCCAAACA TTGCAATCTG TTTACTACTAA CTTGCGAATC TTAGGATCAT TTCTAATGAA CTGTTCAACA
AAACCCTCAA ACAATTCAGC AGGAACAAAC ACATAATTAG GATTGATCCC AAGTAGTATC TAACTAACTA
AAAAAATGC TGAATTTGAT CACAAAGATT GAATTTTAA ATCCCTAAAT GTTAAAGTA AAGAAGATGA
ACAAACTCAC GGAAGCTTT TCGAGAACAC GCATTGGCTG AGAAGAAGCT TGGTTCTCTG CAACTCACG
TTGAGCCATT GACCAATCAT CACGAAGCGT TCTAACAAACA ACAAACCTCT TCAAACGAGC GTGATCCACC
ACGCGGACAC CACCCATAAG GTAGACTCTA AGGAACACAG ACGCAACCAC AAGCAACATT AGAAGACCCA
AGATCCGACG ACCCACGTTT CTCCCCGATC TAAACCCTTG ACCAATCACA ACCGTCGATG CACCACCATA
AAACGGAATC CAGAATTTTC GGAGGAGAAG GTAACGAATC ACCGGATGAC TGTAAAATCG GTGGTAGTGA
TCGTGATGGT AATGAGATCC AGTAGATGAA GCAGAGCTTT CCGAAGATGG TGACGAGTCT TGACCAGTCG
CATCTCTCC GTCTAAATCT GTTGATCCAA CGATGGGTTG GTTAATTGTA TTGCAGTAAT CAGATGAATT
CGAGGTCGT TCGGAGATAA CGTCTAGAGA ATCGCCAACA CGGCGGCGAG TGGTGGGTGC AATTGGTACG
GGGTTAATCG CTCGACGAC TGACATATCG TCGCCGGTGA AATAGGGAAT TGAAGATTAG ACAAAGGAA
AGAGATAGAG AAAGAAGAGA GAGGGTTGAT TTTTAGGTTT TGGAGGAAGT AGTTGACCAT GTATGTATCT
TCTGGTATAG TCACCGTCAC CGTGAAATTC GCCGAAGCTG AGTTTTTGT TTCAGAATTT TTTATATTCG
CCAGTGTGTC TAATTATATA TTTATGTGAC TGTTCTAATC ATTTTTTTTG TTTAGGTTTT ACATTTTTTA
TGTATGATGT GAATGGATAA TTTCAAGAG TTTGTACGT TTGTAGCACA TCTTTTTATA TGAATAGTTT
TTTGGATGTT AGTGTATAAA TATAATTTGT CATATCGTTT AGATTAAACA AATATAGGCA AAAGAGTGAT
TAACGTGTTT TTTGAAATA GCTAAGAGAT ACTAACCTAT GATGATTAAG TTTATGATAC TTAAACTTTT
TATCATCGAG GGCACCTCTGC ATTGTGACGA AGATGTGAAG TAGACCTAGA AGATGACGCA CTGACTTTAT
TGCCACTGCT ACAAAGCTAA TCAACTTTGT ACCAAATATA CAAAACCTCG ACCTCTCAG ATGTTAAACT
AATGGAATTA TTAGAATTA AAAAAATCGG ATTAGAGATT AAAAAGAAAT GAAATTATTT AGAGAGGTAG
TTAGTAAAAG TAAATTCGAT CCAGCGTGGT GCTGTGTCAT TTATTTGACT GGAATTTTC TTCAGACAGT
GAAAGCAACA TAATCGATGG ATGATACTAT TTAACAAAAC AGGTCGTCAC ACACGTGTGT ATAAATAAGT
AAAGCGCCA CTCCTTCTC ATTTCTGAGC GCGCAGAGAG AGAGAGAGAG GGACGATCTT TTCTATAACT
GAAACTACT TCGAGGCCAA GTTGCTTTAG CCGTAATCGT CGTCGTCCTT CTCCCGATA TTATCTCTTC
TCTGTTCTTC GATTCGAAA CCCTAACCTC CTCTCTTAA TTCGCGTTTT CTGGATCGAA G ATG

Oligonucleotídeo Reverse

APÊNDICE 2

Seqüência do promotor do gene *AtUCP2*

Oligonucleotídeo Forward

TACAATATGG TATTTAGAGA GTCAAGCTTG

TTAGATGTAT AACTTGGCAT GACTAAATGT TTCAGCTACC CTGATGAATT TGAGAGTACC CGCATTATTG
GAGAGAGGCA GTTCAAGAAG GCTGCGGATC TTTTCACTAA AGCCTCTGAG GAGATACAAG GAAAAGTTGA
CTATCGTCAT GCATATGTTG ATTTCTCTCA GCTTGAAGTG ACGATTAATG GACAAAATGG AGGTTCCGAA
GTGGTGAAAA CATGTCCAGC TGCAATGGGT TTTGGTTTCG CTGCAGGAAC AACTGATGGA CCTGGAGCAT
TTGACTTTAA ACAAGGAGAT GATCAGGTAA AACCCAAAT CTCTTCTAA CTTGGTAATG AAAGATGTTT
AGTACTATAC TTTATGTTGT GACTTTGTGT AAGGGAAATC CTTTCTGGAG GCTTGTAAGG AACCTTCTCA
AGAATCCAAC TGAGGAACAA GTACGATGCC AACGACCTAA ACCCATATTG CTTGATACCG GTGAAATGAA
ACAACCATA GACTGGGCGG TGAGAGCATA ATCTTGTACT GTGATGGATA AAAATTGAAT CCCACTTAGC
TATTTGTGAT GAAAAAATG TTTCTTAATC CATTTCAGC CGTCGATATT ACCAGTTCAG ATCCTCCGCA
TTGGCCAGCT AGTGATTCTC TCGTCCCCG GAGGTATTCC GGTCTCCCC AGAACAAAA AAATCATTTT
TAAACTGATG TAGAACATTA GTAATTTCTT TTTCTTATTG TTCTGCTTGC AAGAATTCAC AACATGGCA
GGGAGGCGAC TACGTGATGC CGTGAAAACA GTGCTTAAAG AAGGCAGCAA TGGAAGAGAA TTCAGCGTGG
TAATAGCCGG GCTAACCAAT TCGTATTCGC AGTATATTGC CACATTTGAG GAATACCAAG TTCAGAGATA
TGAGGTCAGA GGCTTAGATA AGAAGGAAGA GCTTGTAGGA TCTTTCTTGA TTTCTGCTC TTAAACCAAC
TCTGTTTATT CTTTCCCTCA GGGTGCATCG ACTTTGTATG GACCTCACAC GCTAAGCGGA TACATTCAAG
AATTCAAGAA ACTAGCAAAT GATCTTCTAT CTGCTCAAA CACTGACCCG GGTCCTCAAC CACCTGACTT
ACTTCACAAG CAAATAAGCT TACTAACACC TGTTGTGCG GATATGACAC CAATTGGAAC TGCATTGGGA
GATGTTACAT CGGATGTTCC TCGGTTATCC AAATTCAGGA AGGGAGCTGA CATAGTGAGG GTTCAATTCC
GGTCAGCTAA CCCGAGAAAC GATCTGATGA CGGAAGGAAC TTTCGCGCTT GTTGAGAGGT GGCTCGAAGG
AAGAGAGACA TGGGTACCTG TTTATGATGA TGATGACTTT TGCTCCGGT TTAAGTGGTC AAGACCGTTT
AAACTCAGCA CGCAGAGCAC AGCAACTATC GAATGGAGAA TCCCTGAAAC CGCATCACCT GGTGTTTATA
GAATCACTCA CTTTGGTTCA GCTAAAATC CTATAAGCTC CATTACCAT TTCTCTGGTT CATCTAGTGC
CTTTGTTGTA TATTGAAATG TACACGTGAA TAGTCTTTAT ACGTATCCCT AGCAACACCA TCCAGTAAAT
AACCTTGTGT GTGCGAAAA CAGTTTGTGT ACATAACCTT CCAGTGGAGG AAGAGGGTCT ATCTAATGAC
GTGTTTAGTT ACAACAAAA CAGAGAGAAA CTTTTATAGT GAAAATAGTA ACACACAAAA GATTGAGAGA
GACTCTGTAC TTGTTCTGAA TTCGTTACGC CATTATTAAT TCTCGATCTC ACTTTTCTTC ATTACTACTC
CTAAAACTA TAATCATTGA GAAACCCATT TTAAGATTAC ATCAATCATC ATCGCTGTTA GAGAGAACT
GGAGCAACTT CTCAAATTTT AGCCTTTTTT TGTTTTTGCA TTTTGCCTAA TCGGTGCTTC TCCAGATTTT
GCTTATCTTG TTCTATAGC ATAACAATG

Oligonucleotídeo Reverse