



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Control del metabolismo mitocondrial:
Caracterización de una proteína con actividad tipo UCP en
Yarrowia lipolytica

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A :

I.Q. Luis Alberto Luévano Martínez

Asesor:

DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Para mis padres con el más profundo respeto y agradecimiento
por quien sin su ayuda y apoyo no hubiera sido
posible llegar a este punto.*

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a mi mamá quien me enseñó a ser perseverante y a mi papá por enseñarme a no rendirme ante los problemas. A los dos, porque con su ejemplo me enseñaron a ser dedicado y a entregarme por completo a lo que me gusta y nunca dejar cosas a medias.

A mi tía Emma por inculcarme la curiosidad de investigar y de aprender a buscar soluciones y por darme todo el apoyo durante todo este tiempo.

A mis hermanos: Paty, Guillermo, Lupita y Marilú por su apoyo, consejos y porque me han demostrado que mas que hermanos son mis mejores amigos.

Un agradecimiento especial a mi tía Cuca porque con su ejemplo y cariño me mostró que siempre es bueno luchar por algo y a mi tío Olallo porque me enseñó a ser persistente en los objetivos que busco.

Al Dr. Salvador Uribe porque en las buenas y en las malas siempre me brindó su apoyo para salir adelante; por dejarme trabajar en su laboratorio y ser una de las mejores guías que pude haber tenido durante mi doctorado. Al Doctor Eduardo Rial por permitirme desarrollar este proyecto en su laboratorio.

A mis compañeros y amigos: Manuel Gutiérrez, Gisela Ruiz, Rodrigo Díaz, Jacqueline Hernández, Miriam Rodríguez, Nancy Velásquez, Edith Sánchez, Rocío Navarro, Emmanuel Villanueva, Laurita Kawasaki y muy en especial a una gran persona como es Daniela Araiza, por que me ha brindado su apoyo y consejos en momentos difíciles y a mi compañero de aventuras con este bicho: Sergio Guerrero.

A las Doctoras Leticia Ramírez, Xóchitl Pérez por sus consejos y haberme guiado durante el doctorado A Natalia Copitin por su amistad y por sus buenos consejos. A la Maestra Lorena Pedraza porque desde la ibero confió en mí y gracias a eso pude lograr muchas cosas en el doctorado.

A Ramón Méndez por su ayuda.

TABLA DE ABREVIATURAS

ANT	Translocador de adenín nucleótidos
AOX	Alternative oxidase (oxidasa alterna)
BMCP	Brain mitochondrial carrier protein (equivalente a UCP5)
BSA	Albúmina sérica bovina
DiC	Acarreador de dicarboxilatos
EEM	Error estándar de la media
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FCCP	Carbonil p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
OAC	Acarreador de oxaloacetato
OGC	Acarreador de α -cetogluturato
PiC	Acarreador de fosfatos
PUMP	Plant uncoupling mitochondrial protein
UCP	Uncoupling protein (proteína desacoplante)
YD	Extracto de levadura/ glucosa
YMUC	Canal inespecífico mitocondrial de levadura
YNB	Yeast nitrogen base
$\Delta\psi$	Potencial transmembranal

INDICE

Resumen.....	7
1. Introducción	
1.1. Familia de acarreadores mitocondriales.....	9
1.2. Las proteínas desacoplantes, localización y estructura.....	10
1.3. Mecanismo de regulación de las proteínas desacoplantes	
1.3.1 Modulación positiva por ácidos grasos.....	12
1.3.2 Modulación negativa por purín nucleótidos.....	13
1.3.3 Modulación por el potencial transmembranal.....	14
1.4. Fisiología de las proteínas desacoplantes en los eucariontes unicelulares	15
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Reactivos y materiales	22
2.2 Cepas y condiciones de cultivo.....	22
2.3 Aislamiento de mitocondrias.....	23
2.4 Medición de consumo de oxígeno.....	23
2.5 Potencial transmembranal (medición de $\Delta\psi$) y cinética de fuga de protones	24
2.6 Transporte mitocondrial de sulfato y succinato.....	25
2.7 Permeabilidad mitocondrial a protones.....	25
2.8 Expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i>	26
2.9 Análisis filogenético.....	26
2.10 Estadística.....	27
3. RESULTADOS	28
3.1 Detección y análisis cinético de la actividad tipo UCP en <i>Y. lipolytica</i>	28

3.2 Cinética de fuga de protones en mitocondrias aisladas de <i>Y. lipolytica</i> en distintas fases de crecimiento.....	35
3.3 Búsqueda de proteínas ortólogas en <i>Yarrowia lipolytica</i>	39
3.4 Transporte de metabolitos por las proteínas XP_503525 y XP_500457...41	
3.5 Actividad protonofórica de las proteínas XP_500457 y XP_503525.....	42
4. DISCUSIÓN.....	50
4.1 Mecanismo de acción de la UCP de <i>Yarrowia lipolytica</i>	50
4.2 Regulación de la actividad de la UCP de <i>Yarrowia lipolytica</i>	51
4.3 Diferencia en la actividad de la UCP con la fase de crecimiento.....	51
4.4 Consideraciones evolutivas.....	54
4.5 El elevado metabolismo de ácidos grasos de <i>Yarrowia lipolytica</i> facilita el control de una posible UCP.....	55
5. CONCLUSIONES.....	56
6. PERSPECTIVAS.....	57
7. REFERENCIAS.....	58

Resumen.

Las proteínas desacoplantes (UCP) son acarreadores mitocondriales distribuidos a través del reino eucariota. Mientras que en plantas y animales han sido identificados los genes codificantes para estas proteínas, en hongos y protozoarios la evidencia ha sido únicamente funcional. En este trabajo reportamos que en la levadura *Yarrowia lipolytica* hay una actividad desacoplante sensible a ácidos grasos y a GDP lo que nos indica la presencia de una proteína tipo UCP. Así mismo esta actividad tipo UCP es mayor en fase estacionaria que en logarítmica. Se realizó búsqueda *in silico* en el genoma de *Y. lipolytica* la cual arrojó dos genes que codifican para dos posibles UCP: el primero (XM_503525) se predijo como un acarreador de oxaloacetato y el segundo (XM_500457) como un transportador de dicarboxilatos. Cada gen se expresó heterológamente en *Saccharomyces cerevisiae* y el fenotipo resultante se analizó. Las actividades de transporte de los productos de dichos genes confirmaron el análisis filogenético. Además, solo las mitocondrias de las células expresando a la proteína XP_503525 mostraron propiedades bioenergéticas características de una UCP: la conductancia de protones se incrementó en presencia de ácido linoleico y esta a su vez es inhibida por GDP. Se concluye que el gen XM_503525 codifica para un acarreador de oxaloacetato, aunque de manera importante posee una actividad desacoplante estimulada por ácidos grasos e inhibida por purín nucleótidos.

Abstract.

Uncoupling proteins (UCP) are mitochondrial carriers distributed throughout the eukaryotic kingdoms. While genes coding for UCPs have been identified in plants and animals, evidences for the presence of UCPs in fungi and protozoa are only functional. Here, it is reported that in the yeast *Yarrowia lipolytica* there is a fatty acid promoted and GDP-sensitive uncoupling activity indicating the presence of a UCP. The uncoupling activity is higher in the stationary phase than in the mid-log growth phase. The *in silico* search on the *Y. lipolytica* genome led to the selection of two genes with the highest similarity to the UCP family, XM_503525 and XM_500457. By phylogenetic analysis, XP_503525 was predicted to be an oxaloacetate carrier while XP_500457 would be a dicarboxylate carrier. Each of these two genes was cloned and heterologously expressed in *S. cerevisiae* and the resulting phenotype was analyzed. The transport activity of the two gene products confirmed the phylogenetic predictions. In addition, only mitochondria isolated from yeasts expressing XP_503525 showed bioenergetic properties characteristic of a UCP: the proton conductance was increased by linoleic acid and inhibited by GDP. It is concluded that the XM_503525 gene from *Y. lipolytica* encodes for an oxaloacetate carrier although, remarkably, it also displays an uncoupling activity stimulated by fatty acids and inhibited by nucleotides.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Familia de acarreadores mitocondriales.

El metabolismo mitocondrial necesita estar en continua comunicación con su parte citosólica o entre organelos; parte de esta comunicación es mediada por sistemas de transporte que intercambian metabolitos con diversos fines ya sea catabólicos (e.g piruvato) o anabólicos (e.g citrato). Estos sistemas de transporte mitocondrial se encuentran relacionados estructuralmente ya que todos presentan un motivo estructural firma (P-X-[D/E] -X-X- [R/K]). Esta firma ha servido para identificar a muchos de los miembros de esta familia aunque su papel fisiológico o los metabolitos que transportan cada uno de ellos se desconozcan (Aquila y cols., 1987). Evolutivamente se cree que esta familia de acarreadores surgió a partir de tres repeticiones de un gen que codificaba para un péptido de aproximadamente 100 aminoácidos. Por lo tanto esta familia presenta una estructura tripartita, donde un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos es repetida tres veces (Fig. 1). En general todas estas proteínas tienen un peso molecular aproximado de 30 KDa. Se cree que la unidad funcional es un dímero, por lo tanto esta familia pertenecería al subgrupo de transportadores secundarios de 12 cruces transmembranales aunque la funcionalidad del dímero esté en discusión (Saier, 2000).

Debido a que solo se ha logrado resolver la estructura del acarreador de adenín nucleótidos (Pebay-Peyroula, 2003) la estructura terciaria estaría conservada en todos los miembros de esta familia. Esta consta de seis hélices transmembranales, dos asas orientadas hacia el espacio intermembranal que conectan las hélices 2-3 y 4-5 y tres hélices paralelas al plano de la membrana que conectan a las hélices 1-2, 3-4 y 5-6 (Saraste y Walker, 1982). Así mismo los extremos N y C terminales se orientan topológicamente hacia el espacio intermembranal. Tanto la traducción como la inserción de estas proteínas se

realizan desde el citosol; sin embargo a diferencia de otras proteínas mitocondriales éstas no requieren de una presecuencia específica (Zimmermann y Neupert, 1980).

La naturaleza del metabolito a transportar es tan diversa como el número de acarreadores encontrados. Tan solo en *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado la presencia de 35 acarreadores mitocondriales de los cuales aproximadamente sólo 20 se les ha asignado una función (Kunji y Robinson, 2006). El mecanismo de transporte en general es por simporte (e.g. acarreador de fosfato) o antiporte (e.g. translocador de adenín nucleótidos) aunque no se descarta que exista un mecanismo tipo uniporte (probablemente las proteínas desacoplantes (UCP) tengan este mecanismo) (Palmieri y cols., 1992).

1.2 Las proteínas desacoplantes, localización y estructura

Las UCP se localizan en la membrana interna mitocondrial; pertenecen a la familia de los acarreadores mitocondriales.

En los animales que hibernan hay un tejido adiposo especializado al que se ha denominado tejido grasa marrón o grasa café. Este tejido contiene mitocondrias que pueden desacoplarse, disipando la energía de la cadena respiratoria en forma de calor en lugar de conservarla como energía química (ATP) (Nicholls, 1976; Lin y Klingenberg 1980).

El análisis fisiológico de estas mitocondrias ha mostrado que contienen una proteína protonofórica llamada proteína desacoplante, modulada por ácidos grasos y por nucleótidos de purina (específicamente ATP, ADP, GDP y GTP). Los ácidos grasos actúan como moduladores positivos, mientras que los nucleótidos son moduladores negativos (Rial y cols., 1983; Locke y cols., 1982). En cuanto a la modulación por ácidos grasos, se sabe que como requisito para ser activadores deben de tener un grupo carboxilo libre, ya que las acil CoAs o las acil-carnitinas no actúan como activadores. En los ácidos grasos, la longitud de la cadena hidrocarbonada puede afectar la activación; son mejores activadores los ácidos grasos insaturados de cadena larga que los saturados. La activación de la UCP disminuye con la longitud de la cadena del ácido graso, debido principalmente a efectos fisicoquímicos como su alta hidrofobicidad (Winkler y Klingenberg, 1994). En cuanto a los nucleótidos de

purina, los más potentes moduladores negativos son el GDP y el GTP, seguidos de los adenín-nucleótidos. Aunque los adenín nucleótidos presenten una mayor relevancia fisiológica debido a su concentración en la célula.

En el humano se encuentran cinco isoformas de UCP que están distribuidas en diferentes tejidos: la UCP1, se encuentra exclusivamente en las mitocondrias de tejido café, la UCP2, en músculo esquelético y riñón, la UCP3 en músculo esquelético, y por último la UCP4 y la BMCP (UCP5) están en el cerebro. El mecanismo bioquímico es similar en todas las isoformas; sin embargo, su función fisiológica no es clara. La única isoforma para la que hay consenso en cuanto a su papel fisiológico es la UCP1. Esta proteína tiene un papel termogénico en animales aclimatados al frío o en hibernación. Las otras isoformas podrían funcionar con fines termogénicos o bien para controlar la fuerza protónmotriz. Apoyando la función termogénica, hay reportes de que aumentan los niveles de mensajero de UCP2 en músculo esquelético de animales aclimatados al frío. Además se ha visto que ratones knockout de UCP1 presentan fenotipos de obesidad, lo que sugiere una función de esta proteína en el metabolismo de ácidos grasos.

Se ha visto que la producción de especies reactivas de oxígeno es dependiente de la magnitud del gradiente electroquímico de protones, es decir, su producción se incrementa al incrementar esta fuerza; es aquí donde sí parece haber consenso sobre la función de estas proteínas al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) al colapsar parcialmente y de manera controlada el gradiente electroquímico de protones (Riquier, 2005; Krauss y cols., 2005).

Filogenéticamente no hay consenso sobre la evolución de la subfamilia de las UCP; por un lado, el grupo de Jezek, establece que las UCP de organismos inferiores son ancestros evolutivos. Esto lo hacen comparando las secuencias de genes de invertebrados, como es el caso de *Dictyostelium discoideum* y *Drosophila melanogaster*. En todas estas secuencias hay regiones conservadas similares a la isoforma 4 de mamíferos. Cabe notar que las isoformas 4 y 5 (BMCP) son las que presentan menor similitud con las UCP1, 2 y 3; sin embargo, las primeras tienen más similitud con las UCPs de organismos inferiores. Al contrario, el grupo de Sokolova establece que la isoforma 2 es el ancestro común, y lo hace mediante alineamientos múltiples

de las 5 isoformas con la secuencia del gen del ostión. Sin embargo, el alineamiento se limita a la comparación entre esta especie invertebrada y organismos pluricelulares, sin tomar en cuenta otro tipo de organismos como invertebrados u organismos unicelulares (Hanak y Jezek, 2001; Sokolova y Sokolov, 2005).

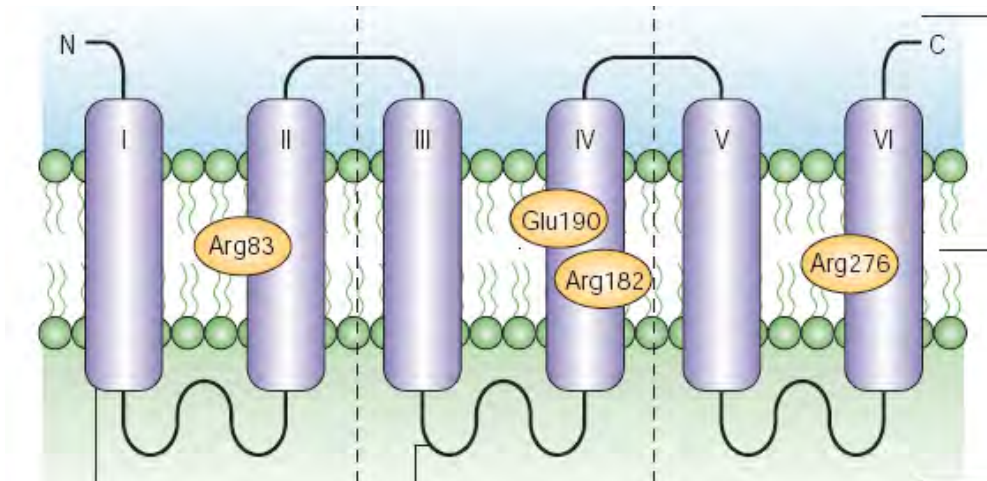


Fig 1. Estructura terciaria de la UCP1; se muestran los residuos conservados en el sitio de unión a purín nucleótidos.

1.3 Mecanismos de regulación de las proteínas desacoplates.

1.3.1 Modulación positiva por ácidos grasos.

Se han propuesto dos mecanismos por los cuales las proteínas desacoplates catalizan el desacoplamiento mediado por ácidos grasos (Fig. 2). En el primer modelo, el ácido graso protonado actúa como un cofactor, sirviendo de puente entre los grupos ácidos de la proteína, permitiendo así el movimiento a favor del gradiente de los valores del pKa de los aminoácidos orientados hacia la matriz (Fig 2a). En el segundo modelo, el ácido graso se protona en el espacio intermembranal y es capaz de translocarse a través de la membrana sin necesidad de un acarreador (flip-flop); una vez en la matriz el ácido graso se ioniza. El ácido graso ionizado es incapaz de regresar al espacio

intermembranal, por lo que las UCP deben catalizar su transporte, completando el ciclo (Fig 2b) (Jezek y cols., 1997).

La diferencia principal en estos dos modelos es el sustrato a transportar por estas proteínas. En el primer modelo el sustrato es un protón, mientras que en el segundo el sustrato es el ácido graso ionizado. Análisis estructurales y funcionales sugieren que esta subfamilia de acarreadores evolucionó de un ancestro común y que posteriormente se diversificó hacia la familia de acarreadores de oxoácidos, por lo tanto es mas probable en términos evolutivos que sea el ácido graso ionizado el verdadero sustrato (Robinson y Kunji, 2006). Incluso los primeros estudios de transporte con la UCP1 demostraban que estas proteínas transportaban metabolitos aniónicos como son los halogenuros, los nitratos y el piruvato (Klingenberg y Echtay, 2001).

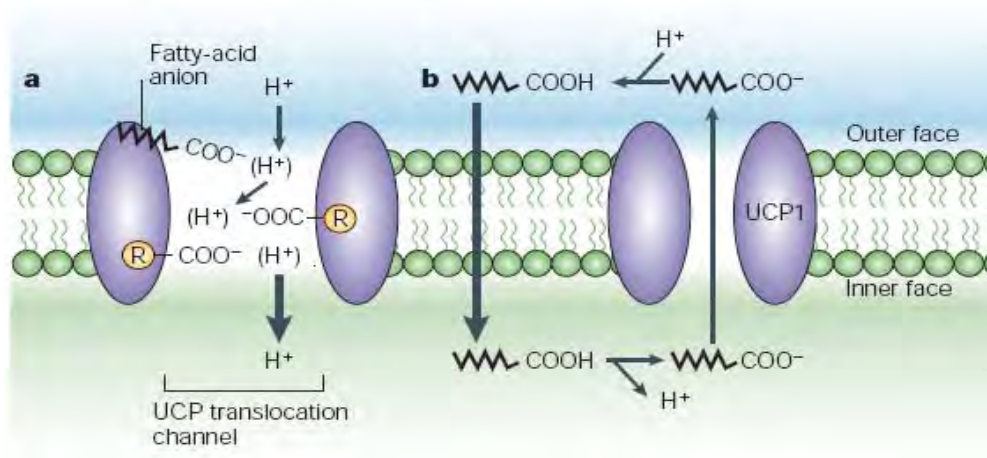


Fig. 2. Mecanismo de activación por ácidos grasos. a) Ácido graso como cofactor para la translocación de protones. b) Movimiento transmembranal de ácido graso. Para la explicación de cada mecanismo ver el texto.

1.3.2 Modulación negativa por purín nucleótidos.

Al igual que los demás miembros de los acarreadores mitocondriales, las UCP's presentan una gran cantidad de residuos básicos (en la UCP1 hay un total de 28 residuos básicos y 19 ácidos), lo que favorece la unión de purín nucleótidos en una zona específica de la proteína. Esta región presenta cuatro

aminoácidos conservados: tres argininas (R83, R182, R273) y un glutámico (E190). El glutámico actúa como barrera para la interacción de las tres argininas y los grupos ácidos de los nucleótidos, gracias a la formación de un puente salino entre los residuos E190 y R83. Una vez que el glutámico se protona, los grupos fosfato del nucleótido pueden interactuar con las argininas (Fig 3). Esta protonación explica que la inhibición de las UCP mediada por purín nucleótidos depende del pH. Cuando el pH citosólico aumenta durante la lipólisis, el E190 se ioniza, y la afinidad por purín nucleótidos disminuye, permitiendo así la activación de la UCP por los ácidos grasos. Al terminar la lipólisis el pH vuelve a disminuir, regresando así al estado basal de la proteína (Fig. 3) (Huang y Klingenberg, 1995). Una característica importante de la interacción de las UCP con los purín nucleótidos es que estos únicamente interactúan con la proteína desde el espacio intermembranal y no son translocados hacia la matriz como es el caso del acarreador de adenín nucleótidos.

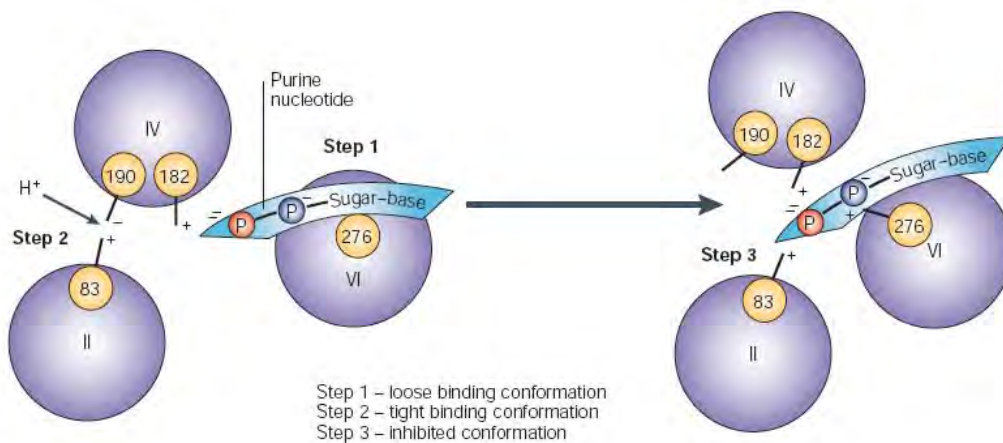


Fig 3. Mecanismo de inhibición por purín nucleótidos de las UCPs. Se muestran los cuatro residuos involucrados en la interacción con los grupos fosfato del nucleótido.

1.3.3 Modulación por el potencial transmembranal ($\Delta\psi$).

Independientemente de cual de los dos mecanismos de transporte de las UCPs sea el correcto (Fig 2), ambos tienen en común que esta proteína funciona como uniportador de un soluto con carga eléctrica.

Termodinámicamente, los uniportadores dependen exclusivamente de la diferencia de potencial transmembranal (al contrario de los cotransportadores y antiportadores que dependen del gradiente químico o de ambos componentes respectivamente).

En la membrana interna mitocondrial, el paso de protones desde el espacio intermembranal a la matriz por mecanismos independientes de la F_1F_0 -ATP sintasa tiene un comportamiento no óhmico; es decir, al elevarse el potencial de membrana la corriente de protones aumenta, y viceversa, a bajos potenciales la membrana es impermeable a los protones. En otras palabras, la relación entre la corriente de protones y la fuerza protónmotriz no es lineal, sino hiperbólica. Este comportamiento permite a los protones vencer la impermeabilidad de la membrana y evita que la fuerza protónmotriz aumente indefinidamente. Los ácidos grasos y los protonóforos aumentan la corriente de protones hacia la matriz (Fig 4) (Winkler y Klingenberg, 1992; Nicholls y Rial, 1989).

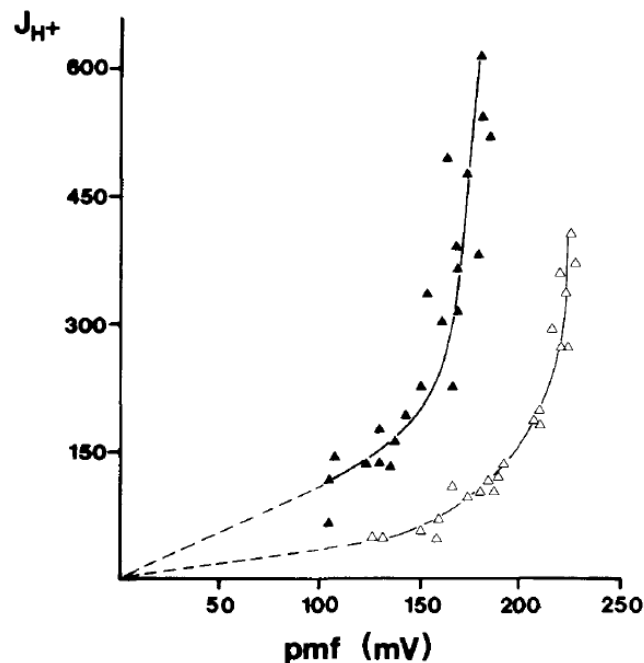


Fig 4. Dependencia de la fuerza protónmotriz (pmf) con la corriente de protones (J_{H^+}) hacia la matriz en mitocondrias de tejido café (comportamiento no-óhmico). En triángulos oscuros se muestra el efecto del ácido graso sobre la conductancia de la mitocondria, mientras que en triángulos vacíos el estado basal de corriente de protones.

1.4 Fisiología de las Proteínas desacoplantes en los eucariontes unicelulares.

Durante mucho tiempo se pensaba que la isoforma UCP1 de tejido café era una adaptación única de los mamíferos; sin embargo, a principios de los noventa se descubrió que en las plantas existía una proteína con similitud a la UCP1, a la que se le denominó PUMP (del inglés, **Plant Uncoupling Mitochondrial Protein**) (Vercesi y cols., 2006). Dicha proteína presenta los mismos mecanismos regulatorios que la UCP1. Posteriormente se descubrieron las otras 4 isoformas de la UCP en mamíferos, cuya función es desconocida, pero posiblemente constituyan un mecanismo de control de la fuerza protónmotriz. Es sabido que la expresión de la UCP aumenta durante la adaptación al frío, tanto en animales (UCP1) como en plantas (PUMP). También en los frutos se ha visto que la actividad de la PUMP depende de la etapa de maduración del fruto, posiblemente como un mecanismo termogénico que ayuda a incrementar la tasa metabólica del fruto o como disipador de compuestos volátiles que sirven de atrayentes para insectos polinizadores (Onda y cols., 2008).

El grupo de Vercesi reportó la presencia de un análogo funcional de las proteínas desacoplantes en un hongo de la especie *Candida* (*Candida parapsilosis*) (Jarmuszkiewicz y cols., 2000). Posteriormente se ha reportado la misma actividad de UCP en diferentes especies de hongos: *Aspergillus fumigatus* (Tudella y cols., 2003), *Candida albicans* (Cavalheiro y cols., 2004), en protozoarios: *Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewicz y cols., 1999), *Plasmodium berghei* (Uyemura y cols., 2004), *Dictyostellum discoideum* (Jarmuszkiewicz y cols., 2002) y *Plasmodium yoelli yoelli* (Uyemura y cols., 2000).

El papel fisiológico de estas proteínas en eucariontes inferiores es desconocido. El grupo de Jarmuszkiewicks observó que las células de *Acanthamoeba castellanii* cultivadas a 4^o C, tienen un nivel de expresión mayor de proteínas desacoplantes, de manera similar a como sucede con la UCP1 en los mamíferos. Sin embargo, posiblemente ésta no sea la función primordial de la UCP en estas mitocondrias, ya que la concentración de esta proteína es baja comparada con la que hay en el tejido graso café. De igual forma, el gradiente

térmico entre el citosol y el medio extracelular sería insuficiente como para mantener una temperatura citosólica diferente al medio, lo cual eliminaría el papel termogénico de esta proteína en organismos unicelulares (Jarmuszkiewicz y cols., 2004).

El mismo grupo de investigación reportó que una posible función alternativa es la de controlar la producción de EROs (especies reactivas de oxígeno), ya que al inhibir esta proteína con GDP había un incremento notable en los niveles de peróxido liberado. Probablemente este aumento en los niveles de EROs sea consecuencia de la pérdida del control que puede llegar a ejercer esta proteína sobre la fuerza protónmotriz. Adicionalmente se ha propuesto que este control en la producción de EROs es el papel fisiológico de las UCPs en eucariontes inferiores en condiciones de alta carga energética y alta fuerza protónmotriz (Czama y cols., 2005).

El mecanismo por el que las UCP evitan la sobreproducción de EROs consiste en que se produce un desacoplamiento modulado y parcial de la cadena respiratoria. Se sabe que la cadena respiratoria en condiciones de reposo y máxima fuerza protónmotriz produce altas cantidades de EROs debido a que el flujo de electrones es impedido por el potencial de membrana elevado, produciendo mayores tiempos de residencia de los equivalentes reductores móviles en algunos centros redox (por ejemplo, el ubiquinol en los centros Q_p y Q_n en la ubiquinol: citocromo *c* oxidoreductasa), lo que facilita la transferencia de electrones directamente al oxígeno produciendo así anión superóxido; al activarse las UCP aceleran el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y por consiguiente disminuye la producción de radicales libres. De esta manera el desacoplamiento parcial mediado por UCP sería particularmente importante en condiciones no fosforilantes. Por otro lado, en condiciones fosforilantes (estado 3) se ha observado que el desacoplamiento parcial de la fosforilación oxidativa (relación ADP/O) produce únicamente una disminución de la eficiencia de la fosforilación oxidativa ya que solamente acelera el consumo de oxígeno sin necesidad de colapsar el potencial transmembranal, esto se ha observado en plantas (Jarmuszkiewicz y cols., 1998) y en los organismos unicelulares *Dictyostelium discoideum* y *Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewicz y cols., 2002; Jarmuszkiewicz y

cols.,2005); aún así este desacoplamiento en un proceso altamente regulado tanto por el $\Delta\psi$, por los purín-nucleótidos y los ácidos grasos.

En organismos unicelulares, la actividad de las UCP's generalmente coexiste con otro sistema disipador de energía como es la ubiquinol oxidasa terminal (AOX); sin embargo, poco se sabe acerca de la interacción entre estas dos proteínas, su regulación o sus implicaciones fisiológicas. Ambas proteínas parecen inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno por mecanismos diferentes: mientras que la AOX disminuye la disponibilidad de equivalentes reductores (ubiquinol) capaces de ceder electrones directamente al oxígeno, las UCP la disminuyen al colapsar el gradiente electroquímico acelerando así la actividad de la cadena respiratoria. Sin embargo, la regulación actúa en direcciones opuestas: La AOX es activada por GDP u otros nucleótidos de purina mientras que se inhibe por ácidos grasos (Jarmuszkiewicz y cols., 2001). Por lo menos hay un reporte donde se observa que la presencia de una cadena respiratoria ramificada más una UCP, resulta en una adaptación mayor a ambientes hostiles: *Candida. albicans* depende de ambos sistemas para incrementar su resistencia a medios oxidantes y potenciar su invasividad (Cheng y cols., 2007).

Otro punto importante a destacar del metabolismo energético y su regulación, es su aplicación en la producción industrial de metabolitos y en bioremediación. Desde los años setentas se ha observado que la tasa de producción de metabolitos en organismos unicelulares está inversamente relacionada a la eficiencia de crecimiento (Linton y Rye, 1989). La razón de esta paradoja reside en el hecho de que la producción de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico o ácido glutámico requiere cantidades bajas de ATP (Linton, 1991). En otras palabras, el rendimiento en la tasa de crecimiento disminuye como resultado de la oxidación incompleta de las fuentes de energía (metabolismo en sobreflujo). Industrialmente, los desacoplantes químicos como el 2,4- dinitrofenol o el ácido benzoico incrementan exitosamente la producción de metabolitos (Gallmetzer y Burgstaller, 2002). Los organismos usados para la producción industrial de metabolitos son generalmente aerobios obligados y por lo tanto la cadena respiratoria es: 1) el mayor sitio de conservación de energía y 2) el principal mecanismo de utilización de equivalentes reductores. Como se mencionó anteriormente las proteínas desacoplantes son acarreadores

mitocondriales que modulan la eficiencia energética al catalizar la disipación regulada de la fuerza protónmotriz y probablemente sean utilizadas en organismos unicelulares para regular el potencial redox celular.

De los organismos unicelulares con mayor potencial en la industria de los ácidos orgánicos es la levadura *Yarrowia lipolytica*. Debido a las características de su metabolismo actualmente esta levadura se ha empezado a utilizar no solo para la producción de ácido cítrico sino también en la bioremediación de suelos y aguas (Ficker y cols., 2005; Lanciotti y cols., 2005). En la mayoría de estos procesos industriales el metabolismo mitocondrial juega un papel imprescindible aunado a que posee sistemas de degradación de xenobióticos e hidrocarburos muy eficientes comparados con otros organismos unicelulares. Con base en que hay evidencia bioquímica de la presencia de proteínas desacoplantes en organismos unicelulares, resulta interesante estudiar si en esta levadura existe una proteína de este tipo así como estudiar los mecanismos de regulación del metabolismo mitocondrial principalmente la fuerza protónmotriz.

Yarrowia lipolytica es una levadura oleaginosa con gran capacidad para almacenar lípidos (Barth y Gaillardin, 1996). El patrón de almacenaje depende de la fase de crecimiento: en la fase exponencial o anabólica, los cuerpos lipídicos se forman para almacenar ácidos grasos; al contrario, en la fase estacionaria o de mantenimiento, estos cuerpos lipídicos son degradados. Por lo tanto en esta última fase la concentración de ácidos grasos libres es mayor que en la exponencial. Además, las necesidades energéticas son menores que en la fase exponencial y las fuentes de carbono exógenas son menores (la disponibilidad de glucosa como sustrato es menor). Por estas razones, los triacilglicerolés de los cuerpos lipídicos son hidrolizados (Beopoulos y cols., 2008; Mlickova y cols., 2004). En consecuencia se decidió explorar la posibilidad de que exista una proteína desacoplante en *Yarrowia lipolytica* y que ésta aumente en la fase estacionaria como un mecanismo de control del potencial transmembranal ya que presentaría un metabolismo similar al del tejido adiposo café, es decir, un mayor metabolismo lipídico. Una elevación en la actividad de una proteína desacoplante evitaría daño en la integridad de las membranas, no sólo por cuestiones mecánicas, sino también por prevención

del daño oxidativo. En resumen, pensamos que las UCPs son importantes reguladores de la fosforilación oxidativa.

Hipótesis.

- Si en las mitocondrias de *Yarrowia lipolytica* existe una proteína desacoplante (UCP), esta proteína catalizará la translocación de protones mediada por ácidos grasos en un proceso sensible a nucleótidos de purina y al potencial transmembranal.
- Si los niveles de actividad de la UCP se modifican dependiendo de la fase de crecimiento de la levadura, la tasa de translocación de protones a la matriz cambiará en paralelo.

Objetivo general.

- Identificar y caracterizar una posible proteína desacoplante en las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica*.

Objetivos particulares.

- Evaluar la actividad protonofórica de diferentes ácidos grasos en las mitocondrias de *Y. lipolytica*.
- Medir la sensibilidad a nucleótidos de purina de la actividad protonofórica mitocondrial de diferentes ácidos grasos.
- Analizar la sensibilidad al potencial de membrana de la actividad de la UCP.
- Cuantificar la sensibilidad a ácidos grasos en las mitocondrias de *Y. lipolytica*, en diferentes fases de crecimiento en paralelo con la actividad de UCP.
- Identificar el gen que codifica para la posible UCP y caracterizar sus propiedades de transporte.

2. Materiales y métodos.

2.1 Reactivos y materiales.

Manitol, sorbitol, ácido maleico, glucosa, galactosa, NADH, ácido succínico, L-triptofano, sulfato de amonio, adenina, oligomicina, hidróxido de amonio, nigericina, octil galato, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, GDP, safranina O, FCCP y valinomicina fueron adquiridos en Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). Carboxiatractilósido de Calbiochem (La Jolla, Ca). Zimoliasa de Seikagaku Co. (Tokyo, Japan). Base de nitrógeno (YNB), extracto de levadura, casamino ácidos de laboratorios DIFCO (Detroit, MI, U.S.A).

2.2 Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas usadas en este trabajo fueron *Yarrowia lipolytica* E150 (MatB; his1-1; ura3-302; leu2-270; xpr2-322) y *Saccharomyces cerevisiae* W303 diploide (Mat a/α; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; ura3-1; can1⁻100; trp⁻). Las cepas de *Yarrowia lipolytica* fueron donadas por el Dr. Ulrich Brandt, de la Universidad de Frankfurt, Alemania. En el caso de *Y. lipolytica* esta se creció en medio YD (Extracto de levadura 1%- glucosa 2%) a 30 °C bajo aeración vigorosa hasta llegar a la fase exponencial o estacionaria. (Figura 1). Para *S. cerevisiae* se hizo un precultivo en medio SP (YNB 0.67%, KHPO₄ 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.12%, glucosa 0.1%, lactato 2%, casamino ácidos 1.06 g/L al que se adicionaron: adenina 40 mg/mL y L-triptofano 20 mg/mL, pH 4.5). Las células se centrifugaron y resuspendieron en medio SG (o de inducción) (galactosa 2%, YNB 0.67%, casaminoácidos 1.06 g/L adicionados con adenina 40mg/mL y L-triptofano 20 mg/mL) hasta una densidad óptica de 0.3; cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica de 0.6, las células se cosecharon y utilizaron para aislar mitocondrias.

2.3 Aislamiento de mitocondrias.

Las Mitocondrias de *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* se aislaron diferencialmente de acuerdo al método descrito por Guérin et al. (Guérin y cols., 1979). Brevemente, las células al alcanzar la densidad óptica deseada (aproximadamente de 0.6 para la fase logarítmica y de 1.1 para la fase estacionaria, figura 5) se recolectaron, lavaron dos veces con agua desionizada y resuspendieron en un amortiguador de β -mercaptoetanol 0.5 M, Tris 0.1 M, (pH 9.3). La suspensión de células se incubó por 15 minutos a 30 °C con agitación constante y posteriormente las células se lavaron tres veces en un amortiguador de Tris 10 mM, KCl 0.5 M, (pH 7). Una vez lavadas se incubaron en el amortiguador de digestión [Sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, amortiguador de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 10 mM (pH 6.8)] al que se le adicionó previamente zimoliasa 1 mg/mL por 10 min a 30 °C. Los esferoplastos resultantes se lavaron con el amortiguador de esferoplastos [Sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris-maleico 10 mM, BSA 0.2%, (pH 6.8)]. Una vez lavados se rompieron en un homogenizador Potter–Evelheim de 50 mililitros al que se le introdujo el vástago 15 veces. Las mitocondrias se obtuvieron por centrifugación diferencial. La concentración de proteína se determinó por el método de biuret usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

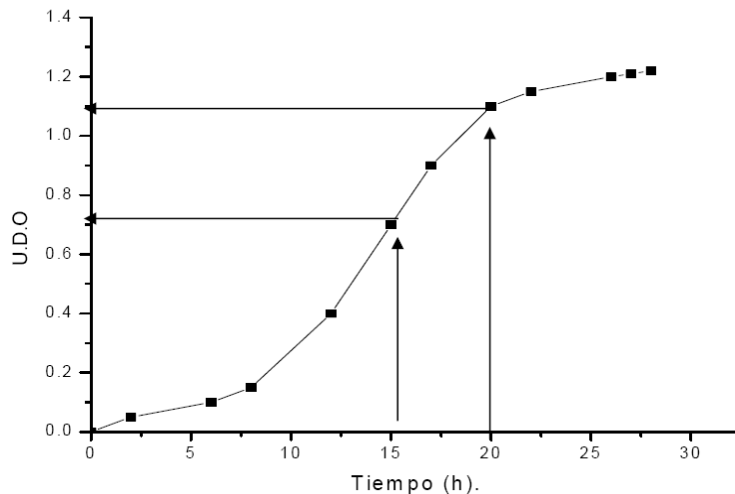


Fig. 5. Cinética de crecimiento de la levadura *Yarrowia lipolytica* en medio YD a 30 °C. Las flechas indican el tiempo de recolección de las células usadas en los experimentos.

La curva se realizó usando una dilución 1:100 usando agua como blanco. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro usando una longitud de onda de 600 nm.

2.4 Medición de consumo de oxígeno

Las mitocondrias de *S. cerevisiae* se incubaron en medio de respiración que consiste de manitol 0.6 M, Tris–maleico 10 mM (pH 6.8), K_2HPO_4 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 0.5 mM, BSA 1 mg/mL, carboxiatractilósido 1 μ M (inhibidor del translocador de adenín nucleótidos) y oligomicina 10 μ g/mL (inhibidor de la ATP sintasa). La tasa de consumo de oxígeno se cuantificó usando un oxímetro YSI modelo 5300 equipado con un electrodo tipo Clark en una cámara de 1.5 mililitros a temperatura constante de 30 °C. Donde se indica se adicionó ácido linoleico 48 μ M (relación molar 3:1 con respecto a la albúmina) y GDP 1 mM con el objeto de evaluar la activación (desacoplamiento) o inhibición del consumo de oxígeno respectivamente.

Se utilizó NADH 1 mM como sustrato respiratorio. Al final de cada experimento se adicionó FCCP 1 μ M para obtener la máxima actividad respiratoria (estado desacoplado).

Las mitocondrias de *Y. lipolytica* fueron incubadas en el mismo amortiguador respiratorio con la diferencia que se adicionó nigericina 100 ng/mL (con el objeto de eliminar el gradiente químico de protones) y octil galato 1 μ M (inhibidor de la oxidasa alterna). Se utilizó succinato 10 mM (en presencia rotenona 1 μ M) como sustrato respiratorio. En todos estos experimentos la respiración se moduló al añadir distintas concentraciones de cianuro (de 1 hasta 50 μ M). En un conjunto de experimentos las mitocondrias se incubaron con 48 μ M de ácido linoleico para estudiar el efecto desacoplante de este ácido graso y en otro conjunto se incubaron en presencia de GDP 1 mM más ácido linoleico 48 μ M. El mismo experimento se realizó en ausencia de moduladores como control.

Con el fin de obtener la eficiencia fosforilante de las mitocondrias aisladas en distintas condiciones experimentales se cuantificó la relación ADP/O. Las mitocondrias aisladas se resuspendieron en el mismo medio de

respiración usando succinato 10 mM (más rotenona 1 μM) como sustrato respiratorio. Una vez que se obtuvo un primer estado estacionario (estado 2) se adicionó un pulso de ADP 100 μM (estado 3). Una vez terminado el estado 3 se cuantificó la concentración de oxígeno consumida durante la fosforilación del ADP y se relacionó con la concentración añadida de ADP (ADP/O).

2.5 Potencial transmembranal y cinética de fuga de protones.

Los experimentos se realizaron en mitocondrias de *Y. lipolytica* bajo las mismas condiciones que en los experimentos de consumo de oxígeno excepto que se adicionó safranina O 10 μM (como indicador del potencial transmembranal). La fluorescencia de la safranina se midió en un espectrofluorómetro Aminco/Ollis con longitud de onda de excitación a 495 nm y de emisión a 586 nm. Adiciones secuenciales de cianuro (de 1 a 50 μM) se usaron para conseguir diferentes estados estacionarios de potencial transmembranal. Al final del experimento se adicionó valinomicina 1 μM con el objeto de eliminar el $\Delta\psi$ y obtener una línea base. La fluorescencia de la safranina a distintos $\Delta\psi$ se calibró usando un medio libre de potasio al cual se le adicionó valinomicina 1 μM y distintos pulsos de K^+ (en forma de KCl). Este método fue descrito por Akerman y Wikström (1976). La cinética de corriente de protones se determinó al graficar la tasa de consumo de oxígeno en estado 4 contra el potencial transmembranal en los diversos estados estacionarios obtenidos de la titulación con cianuro. La corriente de protones se calculó asumiendo una estequiometría H^+/O teórica para el succinato de 6. La concentración de ácido graso libre se estimó usando las constantes de afinidad ácido graso- albúmina calculadas por Richieri y cols., (1993).

2.6 Transporte mitocondrial de sulfato y succinato.

El transporte de succinato se determinó indirectamente al medir la tasa de hinchamiento matricial en presencia de succinato de amonio. Las mitocondrias fueron resuspendidas en un medio iso- osmótico: succinato de amonio 0.125 mM, Tris- maleico 10mM, (pH 6.8), y antimicina 1 μM . El hinchamiento se indujo al adicionar K_2HPO_4 5 mM. Se ha visto que el acarreador de oxaloacetato es capaz de transportar sulfato con alta afinidad

(Palmieri y cols., 1999). Por lo tanto el transporte de sulfato se evaluó al seguir el hinchamiento mitocondrial en respuesta al sulfato de amonio. La mezcla de reacción fue la misma que para el transporte de succinato excepto que se adicionó sulfato de amonio 0.125 M en lugar de succinato de amonio y en estos últimos experimentos no fue necesaria la adición de fosfato para inducir el hinchamiento de la matriz mitocondrial. En ambos experimentos, la tasa de hinchamiento se determinó al medir el cambio en absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Aminco/Olis DW2000.

2.7 Permeabilidad mitocondrial a protones

La permeabilidad a protones se determinó al medir el hinchamiento mitocondrial en presencia de un medio iso- osmótico que consiste de acetato de potasio 0.2 M, Tris-maleico 10 mM, (pH 6.8), K_2HPO_4 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, BSA 1 mg/mL, carboxiatractilósido 1 μ M, oligomicina 10 μ g/mL y antimicina A 1 μ M. El hinchamiento se inició al adicionar valinomicina 1 μ M y la disminución en absorbancia se determinó de la misma forma que en el transporte de sulfato y succinato. El mismo experimento se realizó en presencia de GDP 1 mM y de ácido linoleico 48 μ M (ácido graso: BSA=3).

2.8 Expresión heteróloga en *S. cerevisiae*.

Los cADN de cada uno de los genes de interés se amplificaron por PCR y se clonaron en la cepa diploide de *S. cerevisiae* W303 usando el vector de expresión pYEDP el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina y un promotor llamado *Gal-cyc*, el cual permite la inducción del gen en medios mínimos de galactosa) de acuerdo a Rial y cols., (1999). Brevemente, los cADN se clonaron en el vector pGemTeasy entre los sitios de restricción NotI/PstI para XP_500457 y NotI/NcoI para XP_503525, ambos vectores se secuenciaron para verificar la correcta secuencia de nucleótidos; el vector se cortó con estas enzimas de restricción y los insertos se purificaron. Éstos se clonaron en el vector de expresión pYEDP previamente linearizado entre los sitios de restricción KpnI/SacII. El vector pYEDP modificado se introdujo en la

cepa diploide *S. cerevisiae* W303 por electroporación y las células transformadas fueron seleccionadas por su auxotrofia para uracilo.

2.9 Análisis filogenético.

Este análisis se realizó con el objeto de buscar uno o varios genes que codifiquen para una posible proteína desacoplante en el genoma de *Y. lipolytica*. Un total de 400 secuencias completas y no redundantes de proteínas correspondientes al acarreador de fosfatos (PiC), al translocador de adenín nucleótidos (ANT), al acarreador de dicarboxilatos (DIC), al acarreador de α -cetoglutarato (OGC), al acarreador de oxaloacetato (OAC), a las proteínas desacoplantes de animales (UCP) y de plantas (pUCP) se obtuvieron de las bases de datos NCBI y ENSEMBL (la lista completa de secuencias se muestra en el apéndice A). De acuerdo al análisis evolutivo realizado por Rial y Zardoya (2009) las secuencias fueron alineadas usando el programa en el servidor Mafft (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>) con la estrategia de análisis L-INS-i (Kato y Toh, 2008). El árbol filogenético de máxima probabilidad se dedujo usando el programa PhyML v. 2.4.4 (Guindon y Gascuel, 2003) con JTT como modelo de sustitución. El árbol obtenido se encuentra dentro del rango de confiabilidad ($P < 0.05$) determinado con los programas RaxML v. 7.0.4 (Stamatakis y cols., 2005) y Consel v. 0.1j (Shimodaira y Hasegawa, 2001). El análisis global de secuencias se realizó usando RaxML en el portal Cipres (<http://www.phylo.org/>).

2.10 Estadística

Los datos experimentales se sometieron a un análisis tipo ANOVA de dos colas. Una $P < 0.05$ se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

3. Resultados.

3.1 Detección y análisis cinético de la actividad tipo UCP en *Y. lipolytica*.

Este trabajo se inició con el objetivo de buscar un posible canal inespecífico similar al YMUC (Yeast mitochondrial unespecific channel) de *Saccharomyces cerevisiae*. Se probaron diferentes inductores del YMUC (como son el ADP y el ATP), sin encontrar evidencia de dicho canal; sin embargo, al probar el efecto de ácido palmítico sobre estas mitocondrias se encontró que no se producía ningún poro similar al YMUC, pero aún así se observó un incremento en la respiración mitocondrial (desacoplamiento). El desacoplamiento observado era inhibido por purín nucleótidos; del mismo modo, en experimentos donde se midió el potencial transmembranal el efecto fue similar, es decir, al adicionar ácido graso se colapsó el potencial eléctrico al igual que si se hubiera puesto un desacoplante. Sin embargo, al adicionar un purín nucleótido se recuperó el potencial (Figura 6). Esto nos llevó a explorar la posibilidad de que existiera una proteína desacoplante parecida a las de mamífero y plantas.

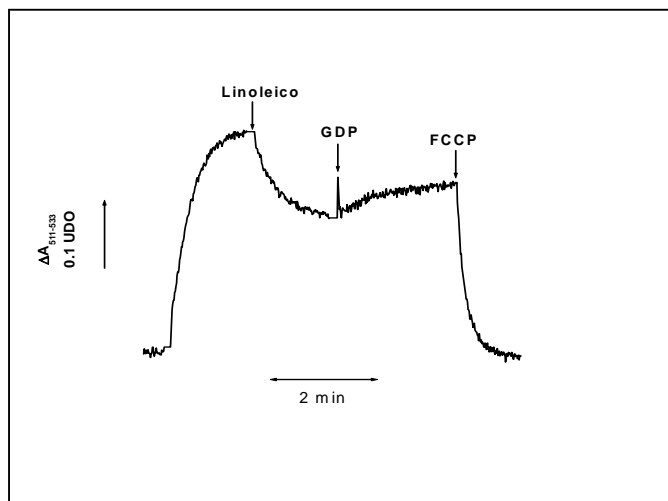


Fig. 6. Efecto del ácido linoleico y del GDP sobre el potencial de membrana de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*. Mezcla de reacción: manitol 0.6 M, Tris–maleato 10 mM, K_2HPO_4 10 mM, $MgCl_2$ 1mM, EGTA 0.5mM, BSA 1 mg/mL (16 μ M), carboxiatractilósido 1 μ M, oligomicina 10 μ g/mL, succinato 10 mM, rotenona 1 μ M y safranina 10 μ M (pH 6.8). Al final del trazo se añadió 1 μ M de FCCP para disipar el gradiente electroquímico. Trazo representativo.

Para empezar a caracterizar este fenómeno y comprobar que el efecto de los purín nucleótidos se debía a una posible proteína desacoplante, se realizó un análisis cinético en presencia de los cuatro ácidos grasos que se encuentran en mayor concentración en membranas y cuerpos lipídicos de *Y. lipolytica*, es decir: ácido esteárico, palmítico, oleico y linoleico (Barth y Gaillardin, 1997; Athenstaedt y cols., 2006). Se observó mayor activación de la respiración con ácidos grasos insaturados que con saturados. De los dos ácidos grasos saturados probados, el ácido palmítico produjo una mayor conductancia de protones (desacoplamiento) que el ácido esteárico, lo que se explica debido a la menor solubilidad del ácido esteárico y su mayor propensión a formar micelas, lo cual disminuye la concentración real del ácido y por lo tanto hay menor posibilidad de interacción proteína -ácido graso (Hamilton, 1998). Para los cuatro ácidos, el resultado fue el esperado, ya que un ácido graso insaturado tiene la capacidad de realizar mas fácilmente movimientos transmembranales (flip-flop) produciendo así una mayor corriente de protones comparado con los ácidos grasos saturados, además de que este fenómeno implica la acidificación de la matriz mitocondrial (Kanicky y Shah, 2002); por esta razón los ensayos posteriores se hicieron con ácido linoleico. Al calcular el número de Hill para cada ácido graso (tabla I) se observó una ligera cooperatividad la cual es común en los acarreadores aniónicos mitocondriales (Klingenberg y Echtay, 2001). Sin embargo el número de Hill es muy cercano para los cuatro ácidos probados, lo que implicaría que el ácido graso se une a la proteína independientemente de la naturaleza del ácido graso y que dicho proceso es únicamente dependiente de la capacidad de ácido graso a realizar movimientos transmembranales.

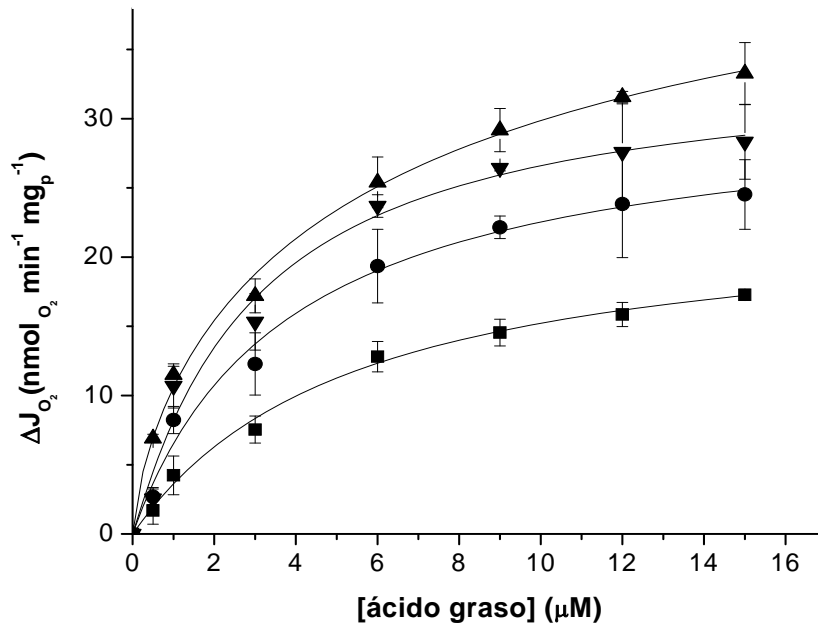


Fig. 7. Efecto de diferentes ácidos grasos sobre la respiración de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*. Mezcla de reacción igual a la utilizada en la figura 6. ■, ácido esteárico; ●, ácido palmítico; ▼, ácido oleico; ▲, ácido linoleico. La tasa basal de consumo de oxígeno en todos los casos fue de $119 \pm 2 \text{ nmol O}_2 (\text{min mg protein})^{-1}$. Los datos representan la media \pm EEM de 5-6 experimentos independientes.

Tabla I. Parámetros cinéticos para los cuatro ácidos grasos probados obtenidos por regresión no lineal de las cinéticas de la figura 5. Los valores de $S_{0.5}$ se convirtieron a la concentración real del ácido graso tomando en cuenta los valores de las constantes de disociación ácido graso/albúmina establecidos por Richieri (Richieri y cols., 1993)

Ácido graso	Vmax ($\text{nmol}_{\text{O}_2} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_p^{-1}$)	$S_{0.5}$ (nM)	Número de Hill (n)
Palmítico	27.10	13.65	1.39
Esteárico	18.58	19.49	1.2
Oleico	29.25	8.35	1.4
Linoleico	42.51	9.58	1.28

Posteriormente se evaluó la sensibilidad de dicho desacoplamiento al purín nucleótido GDP. Cabe notar que todos los experimentos cinéticos se realizaron en presencia de carboxiatractilósido (CAT) y succinato, con el fin de eliminar posibles interacciones del translocador de adenín nucleótidos (ANT) y del acarreador de dicarboxilatos (DIC) con los ácidos grasos respectivamente. Estos transportadores son capaces de actuar de una manera similar a las proteínas desacoplantes en ausencia de su sustrato (o inhibidor específico de alta afinidad para ANT como es el CAT) y con ácidos grasos presentes. Al adicionar tanto el carboxiatractilósido y el succinato el sitio de interacción con el sustrato se encuentra ocupado evitando así la interacción con los ácidos grasos (Skulachev, 1991). En la figura 8 se describe el efecto de los moduladores de las UCP sobre la respiración de las mitocondrias aisladas. En ausencia de nucleótido (condición no fisiológica) la tasa de consumo de oxígeno se incrementó casi 16 veces con la concentración mayor de ácido linoleico; al incrementar la concentración de GDP se empezó a observar una disminución progresiva del desacoplamiento. Al obtener la K_m aparente por regresión no lineal de las curvas de la figura 8 y regraficarlas contra la concentración de GDP (figura 9A) para obtener la constante de inhibición nos arroja un valor de 1.64 ± 0.038 mM, concentración que se encuentra dentro del intervalo fisiológico para este nucleótido. Para determinar con mayor exactitud que tipo de inhibición evoca el GDP, se reevaluaron los datos de la figura 8 en forma de un regráfico de Dixon (figura 9B). Analizando la figura 8 se puede determinar que el GDP inhibió el desacoplamiento de manera no competitiva ya que tanto la afinidad por el ácido graso como la velocidad máxima se vieron afectadas por el nucleótido. Sin embargo el GDP *per se* no es capaz de inhibir completamente el desacoplamiento inducido por el ácido graso (Figura 9A) pues las curvas obtenidas no son completamente lineales sino hiperbólicas, lo cual nos indicó que aún cuando se forma el complejo ternario proteína- GDP- ácido graso éste sigue siendo catalíticamente activo incluso con la concentración mayor de GDP (2 mM) y la menor de ácido linoleico ($1\mu\text{M}$) probadas. Por lo tanto el GDP actúa como un inhibidor no competitivo parcial.

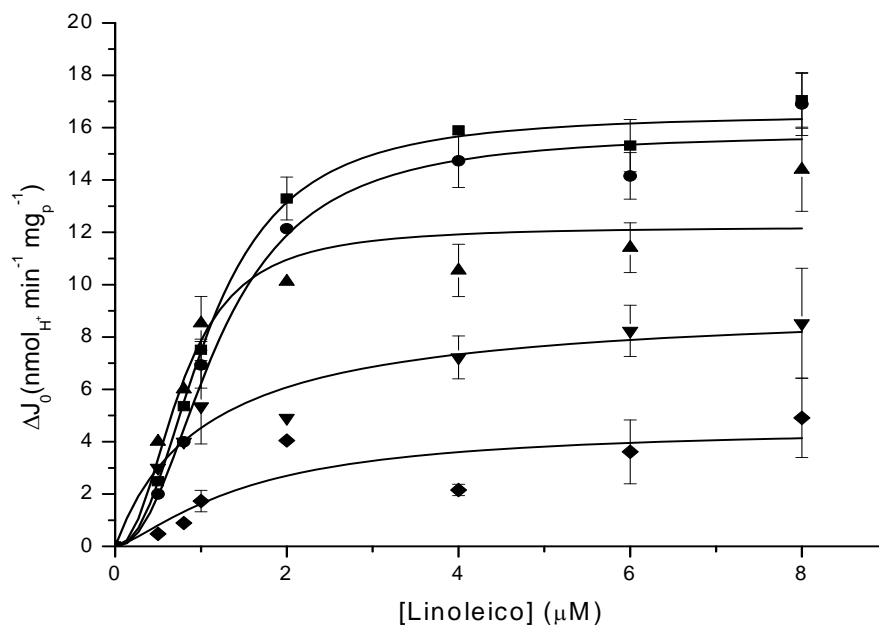


Fig. 8. Inhibición de la respiración estimulada por ácido linoleico por GDP. El medio de incubación es el mismo que en las figuras anteriores con la diferencia que las mitocondrias se incubaron previamente con la concentración de GDP marcada para cada curva. ■, sin GDP; ●, 0.5 mM; ▲, 1 mM; ▼, 1.5 mM; ◆, 2 mM. Los datos representan la media \pm EEM de 5- 6 experimentos independientes.

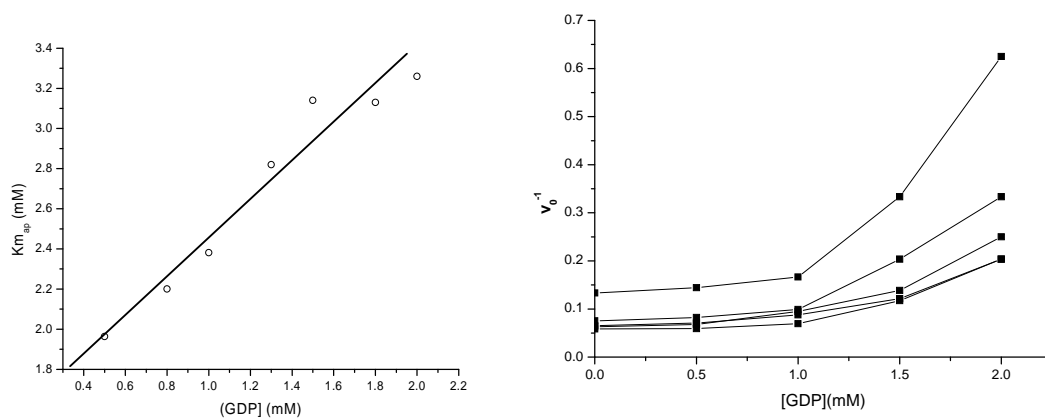


Fig. 9. A) Regráfico de las K_m aparentes obtenidas por regresión no lineal de las curvas de la figura 8. B) Regráfico de Dixon para determinar el tipo de inhibición del GDP sobre la actividad desacoplante del ácido linoleico. Se utilizaron las siguientes concentraciones de ácido linoleico: ■, 1 μ M; ●, 2 μ M; ▲, 4 μ M; ▼, 6 μ M; ◆, 8 μ M.

Los experimentos anteriores se realizaron en condiciones donde existe un gradiente electroquímico de protones, por lo tanto se diseñaron experimentos donde la actividad de la cadena respiratoria no se viera involucrada, es decir donde la fuerza protónmotriz fuese nula, ya que la afinidad de los acarreadores mitocondriales por sus sustratos o inhibidores se ve afectada en presencia o ausencia de esta fuerza; además de que con esta condición podemos excluir cualquier efecto de estos moduladores sobre la cadena respiratoria. Estos experimentos se realizaron en un medio iso-osmótico de acetato de potasio en el cual el hinchamiento mitocondrial se inició al adicionar valinomicina permitiendo así el flujo electroneutro de acetato de potasio hacia la matriz mitocondrial y trayendo como consecuencia un incremento en la presión osmótica (Jezek y cols, 1996). Esa fuerza osmótica mete agua a la matriz mitocondrial. Cabe notar que si en las mitocondrias a estudiar no existiera un sistema de transporte similar a una UCP dichas mitocondrias serían insensibles al efecto de la valinomicina ya que no existiría un mecanismo de compensación de cargas (Nicholls y Ferguson, 2002).

En la figura 10 se muestran los resultados de dicho experimento, Cuando las mitocondrias se incuban sin ácido graso pero con GDP no hay una disminución de la actividad de transporte (al contrario de lo que sucede con la UCP1 de ratón donde hay una actividad basal de esta proteína) lo que corrobora que la presencia de los ácidos grasos es necesaria para activar este mecanismo de transporte. De igual forma se puede apreciar que en presencia de los dos moduladores, la entrada de protones fue sólo marginalmente mayor al control, lo que aparentemente se tradujo en una completa inhibición de este mecanismo de transporte.

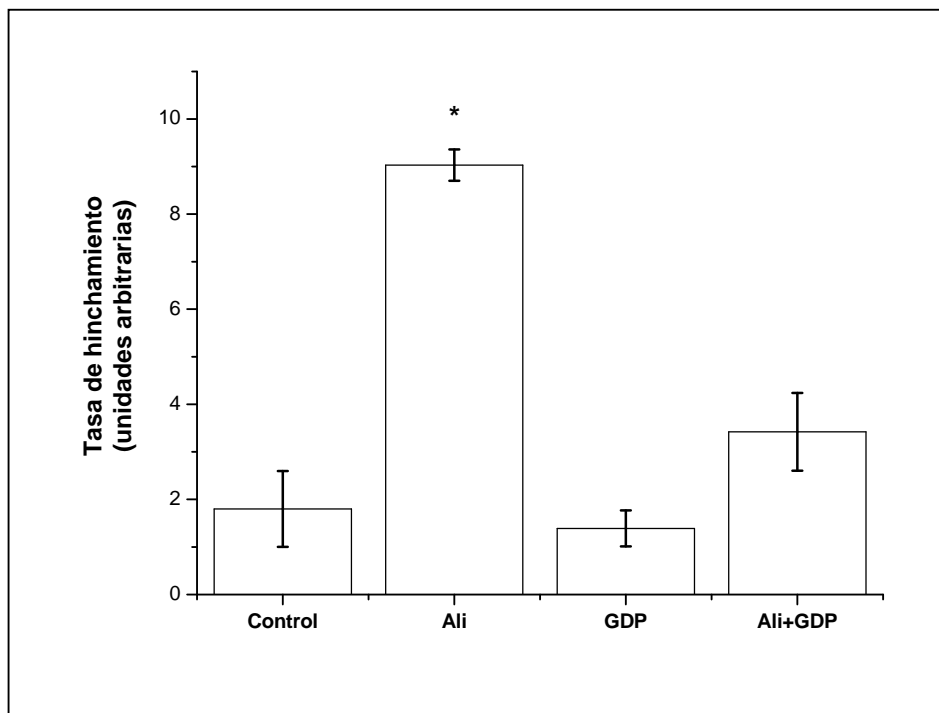


Fig. 10. Efecto del ácido linoleico y del GDP en la tasa de hinchamiento de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*. el medio de incubación consiste de acetato de potasio 0.2 M, K_2HPO_4 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM TRIS- Maleico 10 mM (pH 6.8), carboxiatractilósido 1 μ M, oligomicina 10 μ g/mL, rotenona 10 μ M, antimicina A 10 μ M; donde se indica se añadieron: ácido linoleico 48 μ M y GDP 1 mM. Para inducir el hinchamiento se añadió valinomicina 1 μ M despues de 15 segundos de incubación en el medio iso-osmótico. * $P < 0.05$ respecto al control.

Aunque estos experimentos podrían explicar el tipo de inhibición por GDP y de activación por ácidos grasos, no explican completamente el efecto dual observado por el $\Delta\mu_{H^+}$. Esto es, la inhibición completa en ausencia e inhibición parcial en presencia del gradiente electroquímico. Al ser proteínas que dependen de la fuerza protónmotriz (en particular del $\Delta\psi$ para su funcionamiento), se esperaría que este fenómeno de inhibición estuviera regulado también por dicha fuerza electroquímica por esta razón se procedió a medir la entrada de protones tomando en cuenta los tres moduladores de estas proteínas.

3.2 Cinética de fuga de protones en mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica* en distintas fases de crecimiento.

Las UCP son uniportadores de protones; por lo tanto, su actividad de transporte depende del potencial eléctrico, y es electroforética; es decir, desacoplante (Klingenberg y Echay, 2001). Se analizó el efecto del desacoplamiento mediante un análisis de la conductancia de la membrana interna mitocondrial durante distintas fases de crecimiento. En dicho análisis se mide la entrada de protones hacia la matriz que ocurre a diferentes potenciales transmembranales (Fig 10). Este análisis tiene varias ventajas: 1) Permite ver el efecto simultáneo de los tres moduladores de las proteínas desacoplantes, i.e. ácido graso, purín nucleótidos y potencial transmembranal, 2) Se puede discriminar entre un desacoplamiento mediado por una proteína (por ejemplo por una UCP) o sobre la membrana (como en el caso de los desacoplantes químicos como el FCCP o el 2,4- dinitrofenol). En este último caso se esperaría observar que la corriente de protones sea directamente proporcional con el potencial eléctrico (a mayor diferencia de potencial mayor corriente de protones o en otras palabras sigue un comportamiento óhmico). Esto debido a que los desacoplantes químicos disminuyen la resistencia eléctrica de las membranas lipídicas.

Como se puede observar en la figura 11, la cinética sigue un comportamiento de tipo no- óhmico (no hay proporcionalidad entre diferencia de potencial y corriente de protones). Se pueden distinguir claramente tres zonas en dichas gráficas: una de baja conductancia (a voltajes pequeños), una de alta conductancia (a voltajes altos) y una zona de transición entre ambas. En ambas fases de crecimiento la conductancia se incrementó notablemente en presencia de ácido graso, sin embargo el GDP solo tuvo un efecto notorio en las mitocondrias de células en fase estacionaria. En estas mitocondrias es notorio que dependiendo de la zona de la curva el efecto del GDP fue diferente: a) en la zona de baja conductancia la corriente de protones fue similar para el control que para las mitocondrias incubadas con GDP y linoleico; b) en la zona de alta conductancia el efecto del GDP se perdió conforme el voltaje se incrementó. Esto nos indica que cuando las mitocondrias están en estado fosforilante o a un potencial bajo (estado 3) el efecto inhibitorio de los purín

nucleótidos sobre la proteína es mayor (parecido a los resultados de la figura 10) y cuando se encuentran en estado de reposo ó estado 4 el efecto del GDP es menor (como en las figuras 7 y 8). Lo anterior implica que estas proteínas son capaces de censar el ambiente eléctrico de la membrana interna mitocondrial, evitando así que haya un elevado gradiente electroquímico, disminuyendo así la probabilidad de que se produzcan especies reactivas de oxígeno en concentraciones nocivas para la célula. En cambio, cuando el estado energético de la célula es bajo, es necesario mantener un gradiente electroquímico óptimo para la fosforilación oxidativa y esto se lograría inhibiendo todos los procesos disipadores de dicho gradiente.

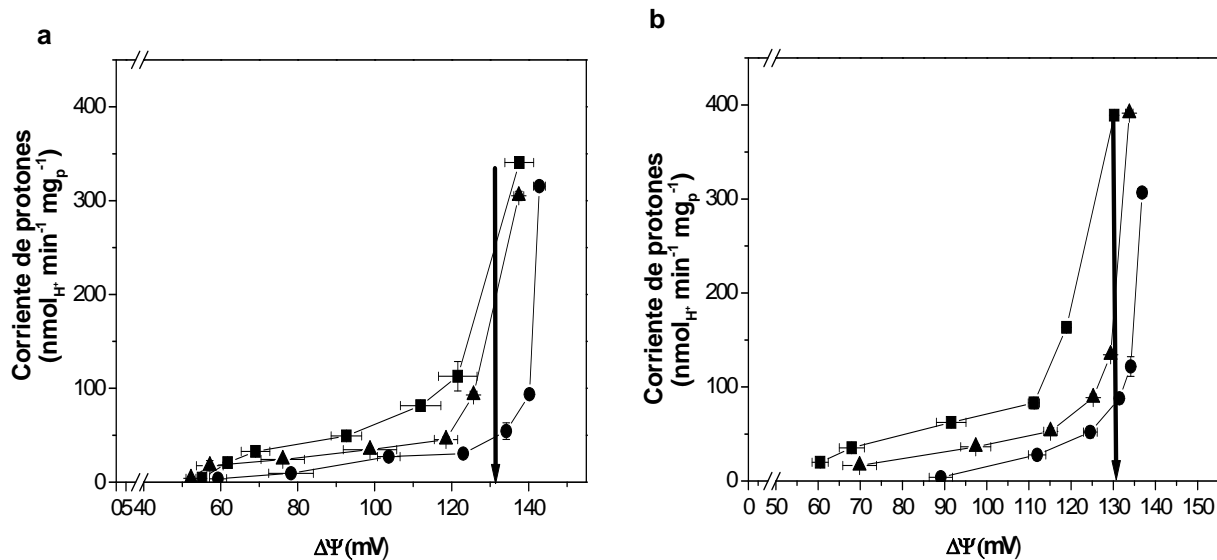


Fig. 11. Cinética de fuga de protones de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica* en la fase media logarítmica (a) y estacionaria (b). ●, Control; ■, ácido linoleico; ▲, ácido linoleico + GDP. Los datos representan la media \pm EEM de 5-6 experimentos independientes. La flecha indica el máximo voltaje común a todas las curvas (131 mV).

Una primera aproximación para analizar el efecto de los moduladores de las UCP sobre las mitocondrias de *Y. lipolytica* es observar el voltaje y la conductancia a la cual ocurre la transición entre baja y alta conductancia (tabla II). En este caso es claro que las mitocondrias en fase estacionaria responden mejor al efecto acoplante del GDP donde prácticamente se restituyó la resistencia de la membrana interna mitocondrial con respecto al control. En cambio, en ambas fases de crecimiento el ácido graso incrementó la

conductancia de protones. En este mismo caso las mitocondrias de la fase estacionaria presentaron una mayor sensibilidad al ácido graso; sin embargo, para obtener una comparación con mayor validez es necesario analizar ambas condiciones a un voltaje que sea común y el máximo voltaje posible para todas las curvas, en este caso el voltaje que nos permite dicha comparación fue 131 mV, el cual se encuentra marcado con la flecha en las figuras 11A y 11B (figura 12). En este voltaje fue más notorio que ambas mitocondrias responden positivamente y con la misma magnitud al efecto desacoplante del ácido linoleico, sin embargo, al igual que en el primer análisis de conductancia, el GDP tuvo un efecto mayor en las mitocondrias en fase estacionaria. Así mismo, al desacoplar las mitocondrias con un protonóforo como el FCCP y posteriormente adicionar GDP no se observó un efecto acoplante del nucleótido (no se muestra) lo que corroboró que el fenómeno observado involucra una proteína y no es un mero efecto sobre la membrana.

Tabla II. Valores de conductancia (en $\text{nmol}_{\text{H}^+} \text{min}^{-1} \text{mg}_p^{-1} \text{mV}^{-1}$) y potencial de transición (en mV) para cada condición de cultivo.

	Exponencial		Estacionaria	
	C_{H^+}	$\Delta\Psi$	C_{H^+}	$\Delta\Psi$
Control	0.43	138	0.45	133
+ ácido linoleico	0.63	118	0.83	108
+ ácido linoleico +GDP	0.58	120	0.51	127

Una vez analizado el comportamiento eléctrico de la proteína tipo UCP, se verificó si había cambios en la eficiencia fosforilante de la mitocondria; para eso se realizó un ensayo para medir el ADP/O, como índice de eficiencia de la fosforilación oxidativa. El máximo teórico para el succinato es de 1.5. En la tabla III se resumen los datos de ADP/O en ambas condiciones experimentales.

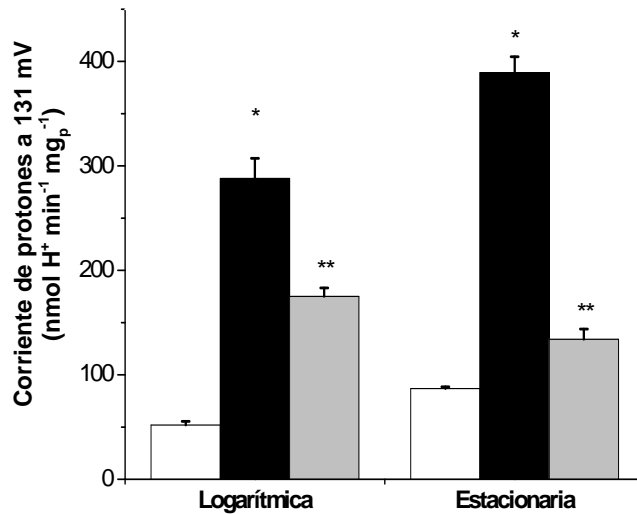


Fig. 12. Corriente de protones usando el valor máximo de voltaje de las figuras 11a-b. □, control; ■, ácido linoleico 48 μM; ■, ácido linoleico 48 μM más GDP 1 mM. Los datos representan la media ± EEM de 5-6 experimentos independientes. * $P < 0.05$ respecto al control; ** $P < 0.05$ respecto al estado desacoplado (con ácido linoleico) sin GDP.

Se puede observar que en los dos casos el ácido graso disminuyó la eficiencia al aumentar la concentración de oxígeno necesario para fosforilar una concentración constante de ADP; al hacer el mismo ensayo en presencia de GDP, se restablecieron los valores basales en las mitocondrias en fase estacionaria, lo cual nos vuelve a confirmar que es en esta condición donde hay una mayor actividad desacoplante de la proteína tipo UCP ya que hay una mayor inhibición ocasionada por GDP.

Tabla III. Valores de ADP/O en las condiciones experimentales probadas.

	ADP/O
Control Exponencial	1.28 ±0.05
+ ácido linoleico	0.85 ±0.02
+ácido linoleico + GDP	1.01 ±0.04
Control Estacionaria	1.20 ±0.04
+ ácido linoleico	0.93 ±0.02
+ácido linoleico +GDP	1.18 ±0.02

3.3 Búsqueda de proteínas ortólogas en *Yarrowia lipolytica*.

Una vez que el fenotipo similar a una UCP se detectó en las mitocondrias de *Y. lipolytica*, se analizó su genoma con el fin de identificar posibles candidatos para un gen que codifique para una proteína tipo UCP. Puesto que el genoma de *Yarrowia* se encuentra completamente secuenciado (Dujon y cols., 2004), se hizo un PSI- BLAST usando un perfil de secuencias generado con las secuencias conocidas de proteínas relacionadas con las UCP. En el análisis se incluyeron a los acarreadores de dicarboxilatos (DIC), de fosfato (PiC), de α -cetoglutarato (OGC), del acarreador de oxaloacetato (OAC), del de adenín nucleótidos (ANT) y de las 5 isoformas de UCP de mamíferos y las de plantas (pUCP). Se pudieron identificar dos posibles candidatos XM_500457 y XM_503525. El análisis filogenético reveló que XM_500457 aparece como un ortólogo de un acarreador de dicarboxilatos (DIC) en *S. cerevisiae* mientras que XM_503525 está relacionado con los acarreadores de oxaloacetato de otras levaduras (Figura 13). Un punto a resaltar en este análisis es la distribución filogenética de la familia de acarreadores de oxaloacetato (en la cual se encuentra una de nuestras proteínas) ya que se encuentran únicamente en hongos y levaduras estando ausente en animales; además, se puede observar que esta familia de acarreadores es la que presenta menos divergencias comparado con otros acarreadores.

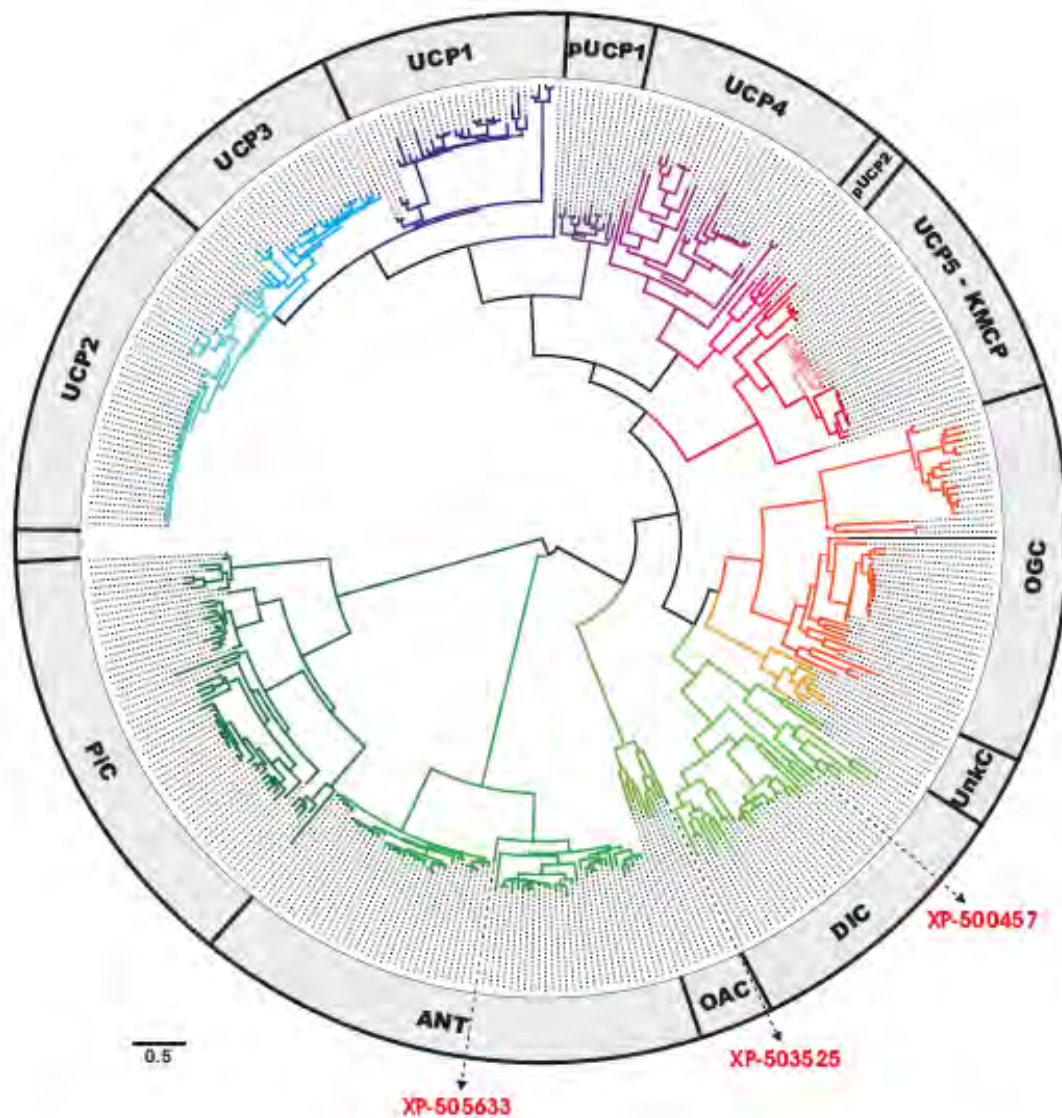


Figura 13. Árbol circular representando las relaciones filogenéticas de los acarreadores mitocondriales con homología a las proteínas desacoplantes. La ubicación de las proteínas de *Yarrowia lipolytica* XP_500457 y XP_503525 se indica en rojo. El translocador de adenín nucleótido de *Yarrowia* también se indica (XP_505633). Una versión detallada del árbol con todos los números de acceso se encuentra en el apéndice. La topología del árbol se realizó usando el programa Dendroscope v.2.3y el diagrama circular usando el programa FigTree v1.2.2.

3.4 Transporte de metabolitos por las proteínas XP_503525 y XP_500457.

Las proteínas encontradas en la búsqueda *in silico* se expresaron heterológamente en *S. cerevisiae* puesto que este organismo carece de proteínas tipo UCP (Arechaga y cols., 1993; Roussel y cols., 2002). Una vez expresadas se aislaron mitocondrias de cada una de las cepas y se analizaron sus propiedades de transporte con el fin de verificar lo siguiente: 1) Que la proteína sea expresada y que se dirija a la mitocondria una vez traducida, ya que no se contaba con los anticuerpos contra estas proteínas y 2) Confirmar el tipo de metabolitos transportado por dichas proteínas de acuerdo a lo arrojado por el análisis filogenético. En estos experimentos se incluyó una cepa de *S. cerevisiae* que contiene el vector *pYEDP* vacío con el fin de obtener los niveles basales de transporte.

Para medir la tasa de transporte se utilizó la técnica de hinchamiento mitocondrial en medios isoosmóticos, la cual ha sido usada ampliamente para determinar el tipo de metabolito transportado, el mecanismo de transporte (uniporte, simporte, antiporte) así como reguladores tanto positivos como negativos de estos transportadores. Así, el hinchamiento en succinato de amonio se puede utilizar con el fin de identificar un posible acarreador de dicarboxilatos (DIC) mientras que en sulfato de amonio para identificar un acarreador de oxaloacetato (Palmieri y cols., 1999; Palmieri y cols., 2000).

La figura 14A presenta las tasas de hinchamiento de mitocondrias de las cepas control y de las recombinantes en succinato de amonio. En estos experimentos es necesario agregar fosfato porque el acarreador de dicarboxilatos funciona como un antiporte dicarboxilato/ fosfato. Las mitocondrias aisladas de la cepa conteniendo la proteína XP_500457 presentan un incremento significativo en la incorporación de succinato comparado con el control o con la cepa conteniendo la proteína XP_503525. Aún así las tres cepas son capaces de transportar succinato lo cual indica que hay un sistema nativo de transporte para dicho dicarboxilato al cual se suma el sistema de transporte de *Y. lipolytica* expresado heterológamente.

Del mismo modo, la figura 14B presenta la tasa de hinchamiento pero ahora en presencia de sulfato de amonio, en este caso no es necesario agregar fosfato como inductor del hinchamiento ya que este mecanismo es por simporte

sulfato/ protón (Palmieri y cols., 1999). La cepa que contiene a la proteína XP_503525 presenta una tasa de transporte mayor de sulfato comparado con la cepa XP_500457, mientras que la XP_500457 presenta solo un incremento marginal de actividad de este translocador.

Un punto a resaltar es que incluso la cepa XP_503525 presenta un ligero incremento en la incorporación de succinato y viceversa (la cepa XP_500457 incorpora sulfato) esto es debido a que todos estos transportadores provienen de la misma familia filogenética (figura 13) lo que implica que aunque estén especializados en translocar algún metabolito aún tienen la capacidad de transportar otros metabolitos relacionados aunque con una afinidad muy baja. Probablemente en un principio la selectividad era baja y solamente por presión evolutiva dicha familia empezó a especializarse en ciertos metabolitos dependiendo del ambiente metabólico en que se encontraba la célula; esto explica el porqué algunas mitocondrias posean un tipo de acarreadores mientras que en otras estén ausentes, e.g. UCP1 en tejido adiposo café.

Con los datos en las figuras 14 se concluye que XM_503525 codifica para un acarreador de oxaloacetato mientras que XM_500457 codifica para un acarreador de dicarboxilatos. Adicionalmente, se demuestra que el sistema de expresión recombinante permite la correcta expresión, dirección y plegamiento de estos acarreadores de *Y. lipolytica* en mitocondrias de *S. cerevisiae*.

3.5 Actividad protonofórica de las proteínas XP_500457 y XP_503525.

Aunque los datos filogenéticos y los de transporte demuestran que la proteína XP_500457 transporta dicarboxilatos y la XP_503525 transporta oxaloacetato, resultaba necesario determinar si la expresión heteróloga de estas proteínas se traduce en un fenotipo similar a una UCP. Se incluyeron dos controles: a) un control positivo para reafirmar si hay un fenotipo parecido en nuestras cepas mutantes; estas mitocondrias contienen expresada la proteína UCP1 de ratón y 2) un control negativo en el cual se insertó el vector *pYEDP* vacío en la misma levadura.

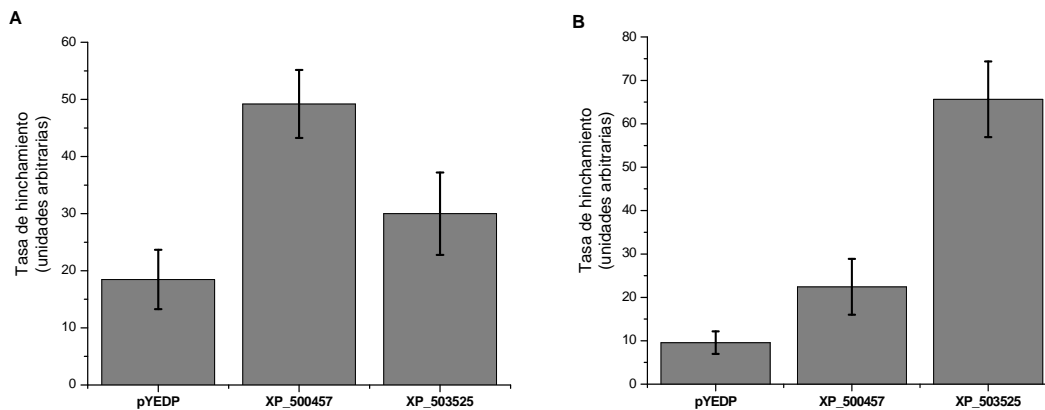


Fig. 14. A) Transporte de succinato en mitocondrias de *S. cerevisiae*. Las mitocondrias fueron resuspendidas en medio iso- osmótico: succinato de amonio 0.125 M, antimicina 1 μ M, Tris-maleico 10 mM (pH 6.8) y la tasa de hinchamiento se midió a 540 nm. El hinchamiento se indujo al adicionar K_2HPO_4 5 mM. B) Actividad del acarreador de oxaloacetato. Esta actividad se evaluó como el hinchamiento en medio de sulfato de amonio. Las mitocondrias fueron resuspendidas en el siguiente medio iso- osmótico: sulfato de amonio 0.125 M, antimicina 1 μ M, Tris-maleico 10 mM, (pH 6.8) y la tasa de hinchamiento se midió a 540 nm. Los datos representan 3 experimentos independientes cada uno realizado por duplicado \pm EEM. * $P < 0.05$ comparado con el control (pYEDP).

Se realizaron dos tipos de experimentos diferentes: a) Midiendo el efecto de los moduladores de las UCP sobre el consumo de oxígeno. Aunque es una medición indirecta del transporte de protones refleja el efecto desacoplante de los ácidos grasos sobre la fosforilación oxidativa y b) Por medio del transporte de protones mediado por un ácido débil (acetato) más valinomicina, en estos experimentos el resultado obtenido es una medición directa (aunque cualitativa) del transporte de protones (ver experimentos de la figura 10).

La tasa de consumo de oxígeno por mitocondrias aisladas de cada una de las cepas de *S. cerevisiae* se midió antes y después de la adición de ácido linoleico o ácido linoleico + GDP. La tasa de consumo de oxígeno en estado 4 fue significativamente mas alto en la cepa expresando la proteína UCP1 reflejando la conductancia basal de protones independiente de ácidos grasos como ya se ha reportado previamente (Rial y cols., 2004). En contraste, la expresión de las proteínas de *Y. lipolytica* no tiene ningún efecto detectable en la conductancia basal. En la presencia de ácido linoleico, hubo un incremento

en la tasa de consumo de oxígeno solamente en las mitocondrias de las células expresando tanto UCP1 como XP_503525. El incremento en el consumo de oxígeno producido por ácido linoleico no se observó en las mitocondrias de las células conteniendo el vector vacío *pYEDP* ni en la XP_500457, confirmando la ausencia de proteínas nativas tipo UCP en *S. cerevisiae* y que sus acarreadores no fueron sensibles a bajas concentraciones de ácidos grasos. Cuando el GDP se añadió posterior a la adición del ácido linoleico, el incremento en la respiración ocasionada por el ácido graso fue completamente revertido en mitocondrias de las células expresando tanto a la proteína UCP1 como a la XP_503525 (figura 15). Resultados similares se obtuvieron cuando el efecto del ácido graso y del GDP se probaron en condiciones de hinchamiento pasivo con acetato de potasio más valinomicina. La permeabilidad a los protones fue sensible a ácidos grasos y a GDP únicamente en las cepas UCP1 y XP_503525 (figura 16). De este modo los resultados claramente indican que la proteína XP_503525 se comporta como una proteína desacoplante; de manera adicional, la falta de respuesta a los moduladores clásicos de las UCP por parte de la cepa XP_500457 la descarta como una proteína tipo UCP y además descarta que los efectos observados en mitocondrias de *S. cerevisiae* sean debido a la sobreexpresión de un acarreador mitocondrial ajeno o a su mala inserción en la membrana.

Varios acarreadores mitocondriales (e.g. ANT, DIC, acarreador de aspartato/ glutamato) pueden catalizar un incremento en la conductancia de protones en la presencia de ácidos grasos; sin embargo, esta actividad es insensible a purín nucleótidos (ANT puede ser la única excepción). Como antecedente, en 2006 el grupo de Anibal Vercesi reportó que el producto del gen SCCCLR1076E12.g de la caña de azúcar era una UCP (ScPUMP5) (Borecky y cols, 2006), sin embargo, en este trabajo se probó el efecto del ácido linoleico como criterio de identificación de dicha UCP y nunca se analizó el efecto del GDP. Posteriormente, el grupo de Palmieri demostró que ScPUMP5 no era una UCP sino un acarreador de dicarboxilatos (Palmieri y cols., 2008)

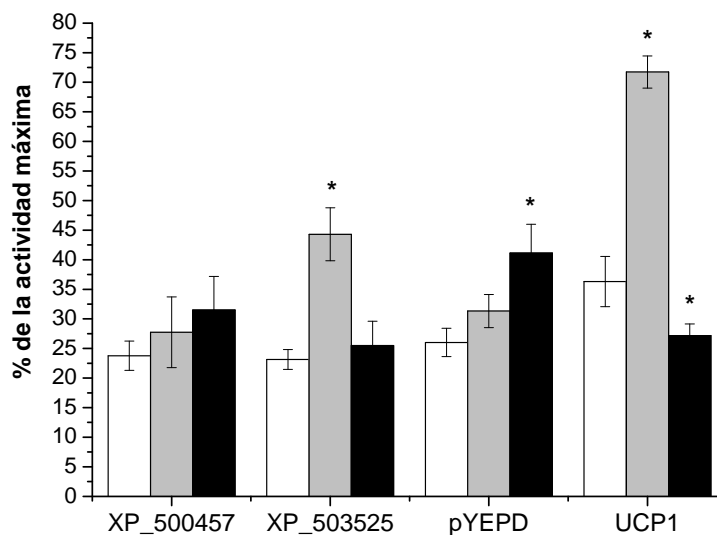


Fig. 15. Actividad respiratoria en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* expresando diferentes acarreadores mitocondriales. El medio de incubación es similar al de la figura 6 con la diferencia que se usó NADH 3 mM como sustrato respiratorio. Las barras representan en porcentaje de la actividad respiratoria en presencia de FCCP la cual fue de $421 \pm 282 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_p^{-1}$. Las barras representan las siguientes adiciones: □, Estado 4; ■, ácido linoleico 48 μM ; ■, ácido linoleico 48 μM más GDP 1 mM. Los datos representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes cada uno realizado por triplicado* $P < 0.05$ comparado con el control.

En esta tesis se muestra que XP_500457 es un DiC pero es incapaz de inducir un desacoplamiento mediado por ácidos grasos. En contraste, XP_503525 muestra solamente una actividad de acarreador de dicarboxilatos de manera marginal mientras que sus propiedades de transporte de oxaloacetato se mantienen íntegras. Además, el transporte de protones por medio de esta proteína es activado por ácidos grasos y este transporte es a su vez inhibido por GDP como una *bona fide* UCP lo haría.

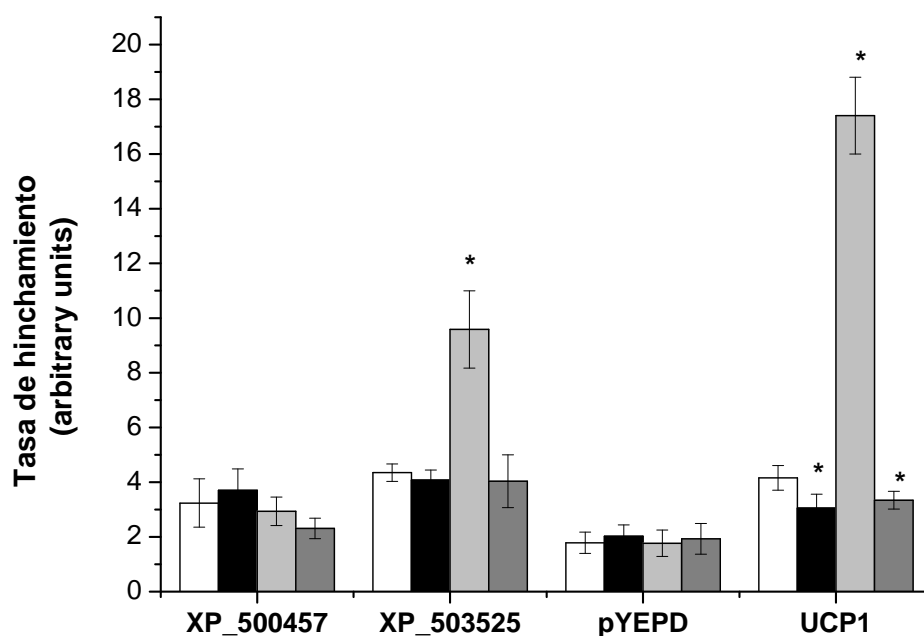


Fig. 16. Permeabilidad de protones de mitocondrias de *S. cerevisiae* expresando diferentes acarreadores mitocondriales. Medio de incubación: acetato de potasio 0.2 M, K_2HPO_4 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, BSA 1 mg/mL, carboxiatractilósido 1 μ M, oligomicina 10 μ g/mL, antimicina 1 μ M y Tris- maleico 1 mM, (pH 6.8). El hinchamiento se inició al adicionar valinomicina 1 μ M. Las barras representan las siguientes adiciones: \square , hinchamiento basal; \blacksquare , GDP 1 mM; \blacksquare , ácido linoleico 48 μ M; \blacksquare , ácido linoleico 48 μ M mas GDP 1 mM. Los datos representan la media \pm EEM de 5 experimentos independientes cada uno realizado por duplicado. * $P < 0.05$ comparado con el hinchamiento basal.

Lo último que se planteó en esta parte del trabajo fue si ambas propiedades de transporte coexistían en mitocondrias de *Yarrowia lipolytica* es decir, una vez que se demostró la actividad desacoplante sensible al ácido linoleico y al GDP en estas mitocondrias faltaba por comprobar que dicho fenotipo fuera ocasionado por el acarreador de oxaloacetato en las condiciones nativas de este acarreador, ya que se pudo comprobar que esta proteína presenta tanto actividad de transporte de sulfato como de actividad desacoplante (Figuras 14 -16). Por lo tanto se realizó el mismo tipo de experimentos de hinchamiento mitocondrial en las dos fases de crecimiento probadas anteriormente pero ahora incubando las mitocondrias con los dos moduladores de las UCP y midiendo la entrada de sulfato. Como se puede

observar en la figura 17 la incubación con ácido linoleico no afecta en ninguna condición el transporte de sulfato; no así cuando se incuban con GDP donde solamente en el caso de los cultivos en fase estacionaria se ve un ligero efecto inhibitorio.

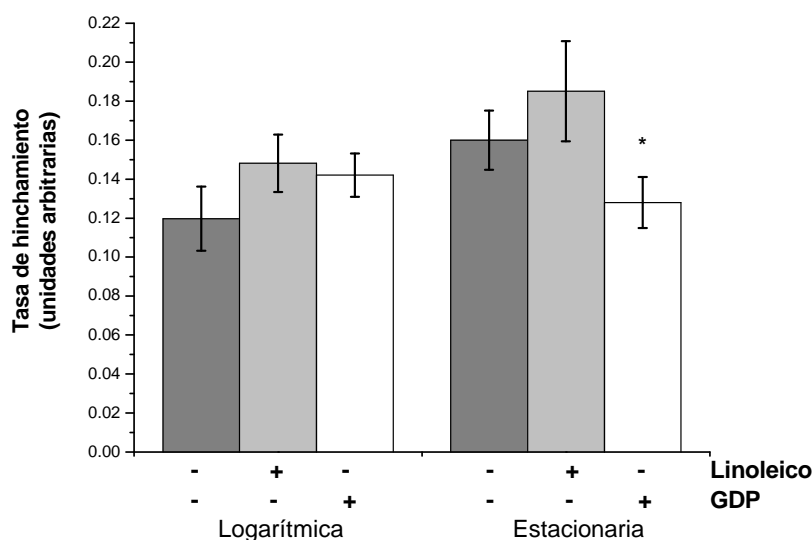


Fig. 17. Transporte de sulfato en presencia de moduladores de las UCP en mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*. El medio de incubación y las condiciones de medición del hinchamiento mitocondrial son los mismos que en la figura 14. Los datos representan 3 experimentos independientes cada uno realizado por duplicado \pm EEM. * $P < 0.05$ comparado con el experimento sin adiciones de moduladores.

Estos datos sugieren que el GDP interactúa con algunos residuos de aminoácidos del poro de la proteína que son necesarios para el transporte de sulfato y que además es la región donde el ácido graso interactúa con la proteína (Fig. 8-12). Sin embargo, de acuerdo a los experimentos de la figura 17, la afinidad del acarreador por su sustrato (sulfato) es mucho mayor que por el propio GDP y por el ácido graso.

Si tomamos en cuenta los modelos de poro con compuertas establecido por Klingenberg (Klingenberg, 2007) y el modelo de simetría de los acarreadores mitocondriales de Kunji¹ (Robinson y cols., 2008) podemos concluir que el OAC presenta una mayor afinidad por el sulfato el cual interactúa con mayor eficiencia con el poro de translocación de la proteína. Sin embargo, si un nucleótido, como el GDP, se encuentra presente, podría

interactuar con alguno de los sitios de contacto del sulfato produciendo impedimentos de tipo estérico que impiden a dicho metabolito unirse completamente al poro, disminuyendo así la eficiencia en el transporte de sulfato. Si el GDP interactuara con todos los sitios de contacto, la inhibición sería de tipo competitiva. Lo que indicaría que el GDP presenta los mismos grupos funcionales y en la misma orientación espacial que el sulfato lo cual no es el caso. Con el ácido graso el problema es de otro tipo, ya que el carboxilato del ácido graso puede interactuar e incluso ser transportado por la proteína (figura 10 y 16). Aunque en este caso hablaríamos de afinidad en lugar de competencia por el sitio catalítico, ya que podríamos decir que ambos metabolitos (ácido graso y sulfato) son los sustratos del acarreador de oxaloacetato. Aunque se esperaría que la afinidad por el sulfato sea mucho mayor que por el ácido graso. Es por esta razón que no se ve afectada la entrada de sulfato en presencia de ácido graso (Una explicación mas detallada se encuentra en el apéndice 4).

4. Discusión

4.1 Mecanismo de acción de la UCP de *Yarrowia lipolytica*.

A partir del análisis cinético llevado a cabo en este trabajo se concluye que la especie transportada por la proteína desacoplante (UCP) es la forma aniónica del ácido graso y no los protones, ya que si sucediera lo contrario el comportamiento del ácido graso en la membrana sería irrelevante y el grado de activación sería el mismo independientemente del ácido graso estudiado. Esto se fundamenta en las propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos en la membrana: un ácido graso ionizado no es capaz de realizar movimientos transmembranales debido a que la membrana provee una barrera que evita la translocación de dicho ácido. Sin embargo, para el ácido graso protonado la membrana no es impedimento para su difusión pasiva. Como resultado de la diferente distribución de la especie protonada e ionizada, el ácido graso se equilibra de manera diferente dependiendo del pH a cada lado de la membrana (Hamilton y Kamp, 1999).

En el caso de los experimentos de las figuras 7 y 8 donde el espacio intermembranal es más ácido, el ácido graso se protona, se equilibra con la membrana por medio de flip- flop y se ioniza en la matriz mitocondrial. Si no existiera un mecanismo de transporte del ácido graso ionizado las especies no lograrían equilibrarse en la membrana y el colapso del gradiente electroquímico sería transitorio, lo cual no se observa en nuestros experimentos donde el efecto protonofórico es sostenido. En los experimentos de hinchamiento se observa un gradiente de pH invertido (la matriz mitocondrial ahora es más ácida que el espacio intermembranal). Por lo tanto, para observar el efecto de hinchamiento mostrado en la figura 10 es necesario que algún sistema equilibre el ácido graso ionizado, ya que esta especie es incapaz de realizar flip- flop. Una vez dentro de la matriz el fenómeno es idéntico a la condición anterior, es decir, se protona en el ambiente ácido de la matriz y una vez protonado se equilibra de acuerdo al ΔpH (Hamilton, 1998). Es por esto que concluimos que la única especie que es transportada por la UCP es el ácido graso ionizado y no la forma protonada de dicho ácido. Este punto es corroborado por la

naturaleza de esta familia de transportadores mitocondriales los cuales únicamente transportan aniones (a excepción del acarreador de carnitina la cual cotransporta la forma zwitteriónica de la carnitina con la forma catiónica de la acil-carnitina).

4.2 Regulación de la actividad de la UCP de *Yarrowia lipolytica*.

En la figura 8 se puede observar que la proteína tipo UCP de *Yarrowia lipolytica* necesita de los ácidos grasos como activadores esenciales ya que el GDP no disminuye la conductancia basal de protones (en ausencia de ácido graso). Es decir, si previo a la adición de ácido graso adicionamos GDP el consumo de oxígeno no se ve afectado (Fig 8). Además el nucleótido se une a una zona de la proteína que comparte regiones del sitio de unión, ya sea del carboxilato o de la cola hidrofóbica del ácido graso; por lo tanto al unirse el nucleótido produciría un impedimento estérico para la unión del ácido graso. Lo más probable es que el nucleótido interfiera en alguna región donde se estabiliza la cadena hidrofóbica del ácido graso ya que aún en presencia de GDP se presenta un incremento pequeño en el consumo de oxígeno lo que implica que el carboxilato aún es capaz de interactuar con su sitio de unión aunque con menor afinidad.

4.3 Diferencia en la actividad de la UCP con la fase de crecimiento.

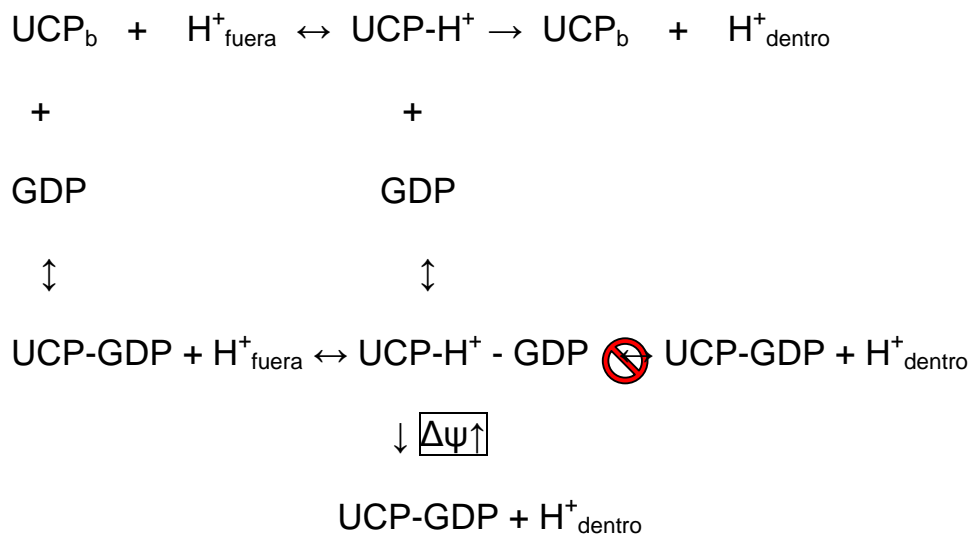
Dentro del análisis de la fuga de protones se puede establecer que en la fase estacionaria, la actividad desacoplante del ácido graso disminuye el potencial de transición. Es decir, incrementa la sensibilidad de la proteína al potencial transmembranal, lo cual la haría funcionar con un umbral menor que en un estado no activado. En contraste, en presencia del nucleótido y del ácido graso, este umbral no se modifica significativamente en el cultivo en fase exponencial, lo cual nos indica lo siguiente:

1. El aumento de la conductancia por los ácidos grasos en un cultivo en fase exponencial es ocasionado principalmente por las interacciones no específicas del ácido graso con la membrana interna mitocondrial. En esta fase la UCP tiene una participación menor en este efecto desacoplante.

Contrario a lo que sucede en fase estacionaria donde hay una mayor sensibilidad al purín nucleótido ya que el potencial de transición (que disminuyó en presencia del ácido graso) vuelve a aumentar con la adición del GDP hasta llegar a ser similar al control.

2. El potencial transmembranal juega un papel importante en la actividad de la UCP ya que si este gradiente es pequeño el ácido graso es incapaz de disminuir el potencial de transición, al contrario de lo que sucede con el GDP con el cual este valor llega a incrementarse. Se puede suponer que la fuerza protónmotriz juega un papel dual en la activación de la UCP: 1) al elevarse, se activa el mecanismo de transporte de la proteína permitiendo al ácido graso ionizado una mayor recirculación sobre la membrana interna mitocondrial y 2) esta mayor recirculación de ácidos grasos lograría que el sitio de unión al nucleótido perdiera afinidad lo cual explica el mecanismo no competitivo parcial del GDP sobre la actividad de la UCP y podría indicar que el sitio de interacción proteína / ácido graso/ purín nucleótido es similar o adyacente uno de otro.

Posible mecanismo catalítico de la UCP de *Y. lipolytica*. A partir de los resultados cinéticos obtenidos en la sección 3.1 y 3.2 se propone el siguiente esquema:



Esquema 1. Modelo de inhibición y activación de la UCP en *Yarrowia lipolytica*.

En donde, la condición que en el análisis cinético nos indicaba la formación del complejo UCP-GDP productivo podría corresponder a valores altos del potencial transmembranal, es decir donde hay corriente de protones aún en presencia del nucleótido. Como se puede observar en las gráficas de cinética de fuga de protones, la conductancia con el nucleótido es mayor en las condiciones de alto voltaje, al contrario de los bajos potenciales, donde sí se puede observar una inhibición clara de la actividad de la proteína. Esta transición de baja conductancia a altas conductancias puede explicar la presencia de un complejo ternario productivo UCP-GDP-acido graso; sin embargo, aún a estos valores altos de potencial, la conductancia sigue siendo menor que en la completa activación de la proteína en ausencia de GDP, lo que nos indicaría que únicamente el número de recambio se ve afectado cuando está presente el nucleótido.

Junto con los experimentos de alto potencial (cinética de fuga de protones) más los de bajo potencial se puede concluir que el GDP es unido con mayor afinidad cuando las mitocondrias se encuentran con un gradiente electroquímico bajo y que es el potencial de membrana el responsable de que la afinidad GDP- proteína disminuya lo cual en principio indicaría que algún residuo de aminoácido del sitio de unión al nucleótido sea el que deja de interactuar con el GDP a altos potenciales, por lo tanto este residuo sería el sensor de la fuerza protónmotriz y que también podría ser parte del sitio de unión del ácido graso.

Proteínas que podrían ser la UCP de *Yarrowia lipolytica*. Hasta la fecha no se ha podido encontrar la proteína responsable de los fenotipos tipo UCP encontrados en organismos eucariontes unicelulares ya que solamente se ha caracterizado funcionalmente dicha actividad además de que en estos organismos no es posible realizar una búsqueda exhaustiva de alguna proteína implicada en dicho fenómeno debido a que sus genomas no se han secuenciado completamente. Nosotros observamos esta misma actividad tipo UCP pero con la ventaja de que el genoma de *Yarrowia lipolytica* se encuentra completamente secuenciado por lo tanto nos fue posible encontrar una proteína con similitud a las UCP y que esta proteína presenta no sólo una actividad desacoplante mediada por ácidos grasos e inhibida por purín nucleótidos sino

que además conserva la capacidad de transportar el metabolito para el cual presenta especificidad (sulfato).

El principal papel de la mayoría de los miembros de la familia de las UCP es incierto; en el caso de los organismos unicelulares, donde una actividad tipo UCP se ha demostrado, un papel termoregulatorio por parte de estas proteínas es poco probable puesto que no es posible establecer un gradiente térmico sostenido entre la célula y el medio ambiente. Actualmente, hay muchos datos, no solo en organismos eucariontes unicelulares sino también en plantas y mamíferos, en los cuales se establecen a estas proteínas como participantes en la defensa contra el estrés oxidativo. Así, en *A. castellanii*, la activación de su UCP disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno, mientras que su inhibición por GDP la incrementa. La actividad de las UCP resulta en un incremento en la conductancia de protones que ocasiona un incremento en la tasa respiratoria y concomitantemente a la disminución de la producción de las EROS. Este desacoplamiento mediado por UCP's sería particularmente importante bajo condiciones no fosforilantes, sin embargo un efecto importante se ha llegado a observar durante el estado fosforilante (estado 3) en plantas, *A. castellanii*, *D. discoideum* y en este trabajo, en el cual se observa una disminución en la eficiencia fosforilante (relación ADP/O) como consecuencia de la entrada de protones a la matriz mediada por una UCP.

4.4 Consideraciones evolutivas.

La cercanía del acarreador de OAC con el acarreador de 6 cruces transmembranales original, su función dual como acarreador de OAC y de protones y su desaparición en organismos superiores, sugieren que las UCP pluricelulares podrían haberse derivado del OAC primitivo. Esta extrapolación de nuestros datos no es totalmente descabellada pues observamos una alta funcionalidad del OAC como UCP en *Y. lipolytica*. Por otro lado, en *S cerevisiae* hay un acarreador de OAC que no funciona como UCP. Estas diferencias deben explorarse para tratar de rastrear el origen y la evolución de los acarreadores mitocondriales. La paulatina especialización de todos éstos sería un interesante tema de estudio.

Las proteínas con mas similitud a XP_503525 son un grupo de acarreadores que solo presentan entre 55 y 60% de identidad con el acarreador de *Y. lipolytica* cuyo homólogo en *S. cerevisiae* (NP_012802) es el acarreador de oxaloacetato y sulfato. La divergencia evolutiva observada no implica una función diferente de dicho transportador pero puede ser suficiente para explicar un cambio en las propiedades de transporte. Poniéndolo en perspectiva, la UCP1 de humano tiene un 60% de identidad con su ortólogo en *Cyprinus carpio* (carpa común). Esta comparación tiene relevancia puesto que los análisis filogenéticos de la familia de las UCP's revelan que la UCP1 de mamíferos homeotermos ha estado sujeta a fuertes divergencias estructurales que finalmente estuvieron acompañadas del desarrollo de un órgano termogénico como es el tejido adiposo café. De esta forma la UCP1 de la carpa no posee una función termogénica puesto que su expresión en el hígado disminuye cuando el pez ha estado expuesto al frío y por lo tanto, su caracterización funcional ha demostrado que la proteína de la carpa no presenta la conductancia típica sensible a nucleótidos encontrada en la UCP1 (Jastroch y cols., 2007; Jiménez- Jiménez y cols., 2006).

Se tiene que tomar en cuenta que no existen ortólogos a las UCP en *S. cerevisiae* y por lo tanto no hay evidencia de que exista una actividad sensible a ácidos grasos y que a su vez sea inhibida por purín nucleótidos similar a la UCP1, por lo tanto podemos asegurar que el acarreador de oxaloacetato de *S. cerevisiae* solo tiene una propiedad de transporte (transporte de sulfato/oxaloacetato) además de que nuestros datos sugieren que la proteína XP_503525 de *Y. lipolytica* mantiene dos sistemas de transporte lo que sugiere que esta especie de levadura pudo haber retenido, evolutivamente hablando, estas características y en cambio el de *S. cerevisiae* perderla durante la evolución. Esto tendría otras implicaciones evolutivas ya que algunos organismos selectivamente retuvieron el sistema de transporte que posteriormente daría origen a las UCP mientras que otros (en particular hongos y levaduras) mantuvieron el sistema de transporte de oxaloacetato (sulfato). En el caso particular de *Y. lipolytica* el problema es que un sistema de transporte que principalmente es de oxaloacetato retenga el transporte tipo UCP. Lo que a priori haría pensar que el ancestro evolutivo de la mayoría de los acarreadores

de oxoácidos (OAC, DIC, OGC y UCP) tuviera un comportamiento similar al acarreador de oxaloacetato de *Y. lipolytica*.

4.5 El elevado metabolismo de ácidos grasos de *Yarrowia lipolytica* facilita el control de una posible UCP.

Y. lipolytica es una levadura oleaginosa con un metabolismo de ácidos grasos muy dinámico; esta levadura almacena grandes cantidades de triacilgliceroles en cuerpos lipídicos. Mientras que en la fase exponencial los lípidos son usados para construir membranas, en la fase estacionaria, los ácidos grasos son liberados de dichos cuerpos y usados como fuente de carbono. Cuando los cuerpos lipídicos son degradados durante la fase estacionaria, los principales ácidos grasos liberados son linoleico, oleico, palmítico y esteárico. En mitocondrias aisladas, encontramos que estos ácidos grasos fueron capaces de modular la actividad respiratoria probablemente a través de una interacción con el OAC. Puesto que las concentraciones citosólicas de los ácidos grasos varían ampliamente, es posible que puedan actuar como mensajeros internos. Estos ácidos grasos son degradados exclusivamente en peroxisomas (al contrario de mamíferos que sucede en las mitocondria), por lo tanto la activación de la actividad desacoplante en *Y. lipolytica* no aceleraría la oxidación de ácidos grasos como ocurre en tejido adiposo café y en su lugar estarían involucrados en la disminución de EROS y/o en la reoxidación de NAD(P)H bajo condiciones de baja demanda de ATP como sucede en la fase estacionaria, por lo tanto se esperaría que hubiera una comunicación directa entre estos tres organelos: cuerpos lipídicos- mitocondria-peroxisoma.

5. Conclusiones.

Se caracterizó la cinética de una proteína tipo UCP:

- a) Se determinó que el GDP ejerce una inhibición no competitiva parcial.
- b) El sustrato de esta proteína (y tal vez de todas las UCP) es el ácido graso ionizado y no el protón.
- c) El potencial transmembranal ejerce un efecto sinérgico con el ácido graso al vencer la inhibición del GDP.
- d) El efecto de los tres moduladores es mas notorio en mitocondrias de cultivos en fase estacionaria que en los de fase exponencial.

Se lograron encontrar dos proteínas homólogas a las UCP:

- a) La proteína XP_500457 se caracterizó como un transportador de dicarboxilatos (DIC).
- b) La proteína XP_503525 como un acarreador de sulfato/ oxaloacetato (OAC).
- c) El OAC de *Yarrowia lipolytica* presenta un comportamiento dual, al actuar como UCP y conservar el transporte de sulfato.
- d) Es posible que XP_503525 sea un acarreador atrapado entre dos funciones.
- e) Ambos sistemas de transporte no actúan simultáneamente.
- f) El efecto inhibitorio del GDP se observa en los dos mecanismos de transporte aunque el efecto es mayor en el mecanismo tipo UCP.

6. Perspectivas

Puesto que la caracterización de proteínas desacoplantes en organismos unicelulares no se ha explorado lo suficiente, resultaría interesante ver en que condiciones y bajo que estímulo celular este tipo de proteínas son expresadas y que función metabólica realizan, puesto que hablar de termogénesis en organismos unicelulares no tiene sentido debido a que no es posible mantener un gradiente térmico.

Otro punto a considerar es el origen evolutivo de estas proteínas. En este trabajo se empezó a trabajar en este sentido pero aún queda mucho por investigar, por ejemplo, realizar un análisis estructural entre los acarreadores de oxaloacetato de distintos hongos e investigar porque en un tipo de hongos estos acarreadores presentan una función dual (como UCP y como OAC) y que modificaciones en la estructura permitieron especializar el mecanismo de transporte (como sucede en *S. cerevisiae*). Como trabajo preliminar se ha empezado a analizar el papel de algunos aminoácidos de esta proteína, tanto en *Y. lipolytica* como en *S. cerevisiae*. Se está analizando el papel que tienen dos aminoácidos no conservados de la compuerta matricial por medio de biología molecular así mismo dentro del análisis realizado se está explorando la posibilidad de que orientación de una histidina localizada en el sitio de unión al sustrato pueda influir en el comportamiento cinético de esta proteína. En este sentido se está analizando la posibilidad de que en *S. cerevisiae* esta histidina presente mayor sensibilidad a DEPC que su contraparte en *Y. lipolytica* puesto que la orientación es completamente diferente en ambas levaduras (ver apéndice 4).

7. Referencias

1. Åkerman KEO, Wikström MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 1976; 68: 191-197.
2. Aquila H, Link TA, Klingenberg M. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Lett.* 1987; 212: 1-9
3. Arechaga I, Raimbault S, Prieto S, Levi-Meyrueis C, Zaragoza P, Miroux B, Ricquier D, Bouillaud F, Rial E. Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function, *Biochem. J.* 1993; 296: 693-700.
4. Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, Zivy M, Negroni L, Nicaud JM, Chardot T. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source, *Proteomics.* 2006; 6: 1450-1459.
5. Barth G, Gaillardin C. 1996. *Yarrowia lipolytica*. pp. 313-388. In "Non-conventional yeast in Biotechnology". Vol 1. W.K Wolf (ed.). Berlin, Germany.
6. Barth G, Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev.* 1997; 19: 219-237.
7. Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, Le Dall MT, Hapala I, Papanikolaou S, Chardot T, Nicaud JM. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *App. Environ. Microbiol.* 2008; 74: 7779-7789.
8. Borecky J, Nogueira FTS, de Oliveira KAP, Maia IG, Vercesi A, Arruda P. The plant energy- dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J. Exp. Bot.* 2006; 57: 849-864.
9. Cavalheiro RA, Fortes F, Borecký J, Faustini VC, Schreiber AZ, Vercesi AE. Respiration, oxidative phosphorylation and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz J. Med Biol Res* 2004; 37: 1455-1461
10. Cheng S, Clancy CJ, Zhang Z, Hao B, Wang W, Iczkowski KA, Pfaller MA, Nguyen MH. Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida*

- albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue, *Cell Microbiol.* 2007; 9: 492-501.
11. Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3136–3140.
 12. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. Genome evolution in yeasts, *Nature* 2004; 430: 35–44.
 13. Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 2005; 5: 527-543.
 14. Gallmetzer M, Burgstaller W. Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy-spilling process, adjusting the catabolic carbon flow to the nutrient supply and the activity of catabolic pathways, *Microbiology* 2002; 148: 1143-1149.
 15. Guérin B, Labbe P, Somlo M. Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios; *Meth Enzymol*; 1979; 55: 149-159.
 16. Guindon, S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 2003; 52: 696-704.
 17. Hamilton J. Fatty acids transport: difficult or easy. *J. Lipid Res.* 1998; 39: 467-481.

18. Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes: Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 1999; 48: 2255- 2269.
19. Hanak P, Jezek P. Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett.* 2001; 495: 137-141.
20. Huang SG, Klingenberg M. Fluorescent nucleotide derivatives as specific probes for the uncoupling protein thermodynamics and kinetics of binding and the control by pH. *Biochemistry*, 1995; 34: 349-360.
21. Jarmuszkiewicz W, Almeida AM, Vercesi AE, Sluse FE, Sluse-Goffart CM. Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria, *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 34882-34886.
22. Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart C, Hryniewiecka L, Sluse F. Identification and characterization of a protozoa uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol Chem.* 1999; 274: 23198–23202.
23. Jarmuszkiewicz W, Milani G, Fortes F, Schreiber A, Sluse F, Vercesi AE. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Letters* 2000; 467:145-149.
24. Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Vercesi AE, Sluse FE. Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance, *Biosci. Rep.* 2001; 21: 213-222.
25. Jarmuszkiewicz W, Behrendt M, Navet R, Sluse F. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development, *FEBS Lett.* 2002; 532: 459-464.
26. Jarmuszkiewicz W, Antos N, Swida A, Czarna M, Sluse FE. The effect of growth at low temperatura on the activity and expresión of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Letters* 2004; 569: 178–184.
27. Jarmuszkiewicz W, Swida A, Czarna M, Antos N, Sluse-Goffart CM, Sluse FE, Vercesi AE. In phosphorylating *Acanthamoeba castellanii* mitochondria the sensitivity of uncoupling protein activity to GTP depends on the redox state of quinone, *J. Bioener. Biomemb.* 2005; 37: 97-107.

28. Jastroch M, Buckingham JA, Helwig M, Klingenspor M, Brand MD, Functional characterization of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain, *J. Comp. Physiol.* 2007; 177: 743-752.
29. Jezek P, Costa AD, Vercesi AE. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *J Biol Chem.* 1996; 271: 32743-8.
29. Jezek P, Modriansky M, Garlid KD. A structure-activity study of fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling protein. *FEBS Lett.* 1997; 408: 166–170.
30. Jiménez-Jiménez J, Zardoya R, Ledesma A, García de Lacoba M, Zaragoza P, González-Barroso MM, Rial E, Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance, *J. Mol. Biol.* 2006; 359: 1010-1022.
31. Kanicky JR, Shah D. Effect of degree, type and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. *J. Coll & Interf Sci.* 2002; 256: 201-207.
32. Kato H, Toh H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.* 2008; 9: 286-298.
33. Klingenberg M, Echtay K. Uncoupling proteins: the issue from a biochemical point of view. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504:128-143.
34. Klingenberg M, Transport viewed as a catalytic process. *Biochimie.* 2007; 89: 1042-1048.
35. Krauss S, Zhang ZCY, Lowell B. The mitochondrial uncoupling proteins homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 248-261.
36. Kunji ER, Robinson A, The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 1237-1248.
37. Lanciotti R, Gianotti A, Baldi D, Angrisani R, Suzzi G, Mastrocola D, Guerzoni ME. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour Technol.* 2005; 96: 317-22.
38. Lin CS, Klingenberg M. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 1980; 113: 299–303.

39. Linton JD, Rye AL. The relationship between the energetic efficiency in different micro-organisms and the rate and type of metabolite overproduced, *J. Industrial Microbiol.* 1989; 4: 85-96.
40. Linton JD. Metabolite production and growth efficiency, *Antoine van Leeuwenhoek.* 1991; 60: 293-311.
41. Locke RM, Rial E, Nicholls DG. The acute regulation of mitochondria proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea pigs. *Eur. J. Biochem.* 1982; 129 : 381–387.
42. Mlíckova K, Roux E, Athenstaedt K, d'Andrea S, Daum G, Chardot T, Nicaud JM. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *App. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 3918-3924.
43. Nicholls DG. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.* 1976; 62: 223–228.
44. Nicholls DG, Rial E. Measurement of proton leakage across mitochondrial inner membranes and its relation to protonmotive force. *Methods Enzymol.* 1989: 85-94
45. Nicholls DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 3. Academic Press. 2002.
46. 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.* 2008; 146: 636-645.
47. Palmieri F, Bisaccia F, Iacobazzi V, Indiveri C, Zara V. Mitochondrial substrate carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1101: 223–227.
48. Palmieri L, Vozza A, Agrimi G, De Marco V, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE. Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate, *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 22184-22190.
49. Palmieri L, Lasorsa FM, Vozza A, Agrimi G, Fiermonte G, Runswick MJ, Walker JE, Palmieri F, Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1459: 363-369.
50. Palmieri L, Picault N, Arrigoni R, Besin E, Palmieri F, Hodges M, Molecular identification of the three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate

- carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem. J.* 2008; 410: 621-629.
51. Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ, Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature.* 2003; 426: 39-44.
51. Rial E, Poustie A, Nicholls DG. Brown- adipose tissue mitochondria: the regulation of the 32,000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. *Eur. J. Biochem.* 1983; 137:197–203.
52. Rial E, González-Barroso MM, Fleury C, Iturrizaga S, Sanchos D, Jiménez-Jiménez J, Ricquier D, Goubern M, Bouillaud F. Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2, *EMBO J.* 1999; 18: 5827-5833.
53. Rial E, Aguirregoitia E, Jiménez-Jiménez J, Ledesma A. Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1608:122-30.
54. Rial E, Zardoya R. Oxidative stress, thermogenesis and evolution of uncoupling proteins, *J. Biology* 2009; 8: 58.
55. Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry.* 1993; 32: 7574-7580.
56. Riquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc. Nutr. Soc.* 2005; 64: 47-52.
57. Robinson AJ, Kunji ER. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 2617-262.
58. Robinson AJ, Overy C, Kunji ER, The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 17766-17771.
59. Roussel D, Harding M, Runswick MJ, Walker JE, Brand MD. Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *J. Bioener. Biomembr.* 2002; 34: 165-176.
60. Saier M, Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol.* 2000; 182: 5029-5035.

61. Saraste M, Walker JE. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 1982; 144: 250–254.
62. Shimodaira H, Hasegawa M. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 2001; 17: 1246-1247.
63. Skulachev VP, Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 1991; 294: 158-162.
64. Sokolova IM, Sokolov EP. Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Lett.* 2005; 579: 313-317.
65. Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. RAxML-III: A fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2005; 21: 456-463.
66. Tudella V, Curti C, Soriani F, Santos A, Uyemura S. In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Biochem & Cell Biol.* 2003; 36:162–172.
67. Uyemura SA, Luo S, Moreno SN, Docampo R. Oxidative phosphorylation, Ca(2+) transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria, *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 9709-9715.
68. Uyemura SA, Luo S, Vieira M, Moreno SN, Docampo R. Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* mitochondria in situ, *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 385-393.
69. Vercesi AE, Borecký J, Godoy Maia I, Arruda P, Midea Cuccovia I, Chaimovich H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006; 57: 383–404.
70. Winkler E, Klingenberg M. An improved procedure for reconstitution of the uncoupling protein and in-depth analysis of H⁺/OH transport. *Eur. J. Biochem.* 1992; 207: 135–145.
71. Winkler E, Klingenberg M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 2508–2515.
72. Zimmermann R, Neupert W. Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria in vitro. *Eur J Biochem.* 1980; 109: 217-29.

APÉNDICES.

Apéndice 1:

Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity.

Luévano-Martínez L.A, Moyano E, de Lacoba MG, Rial E, Uribe-Carvajal S. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797 (2010) 81–88

Apéndice 2:

Structure and mechanism of the mitochondrial uncoupling protein (UCP).

Luévano- Martínez L.A, Uribe- Carvajal S. In “Advances in Protein Physical Chemistry” Editors: Enrique García Hernandez and Alejandro Fernandez- Velasco. Ed. Transworld research Network. 2008. pp. 387- 405.

Apéndice 3:

Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. (Halophilic organelles?)

Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Luévano-Martínez L.A, Peña A, Uribe-Carvajal S. *J Bioenerg Biomembr.* 42 (2010):11-9.

Apéndice 4:

Hipótesis: Análisis *in silico* de la estructura del acarreador de oxaloacetato

Figura suplementaria:

Árbol filogenético de los acarreadores mitocondrial incluidos en este trabajo.

Tabla suplementaria:

Nomenclatura de los acarreadores mitocondriales incluidos en este trabajo.



Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity

Luis A. Luévano-Martínez^a, Eva Moyano^b, Mario García de Lacoba^b,
Eduardo Rial^{b,*}, Salvador Uribe-Carvajal^{a,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^b Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2009

Received in revised form 2 September 2009

Accepted 8 September 2009

Available online 17 September 2009

Keywords:

Uncoupling protein

UCP

Energy dissipation

Yarrowia lipolytica

Mitochondria

Heterologous expression

Yeast

ABSTRACT

Uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial carriers distributed throughout the eukaryotic kingdoms. While genes coding for UCPs have been identified in plants and animals, evidences for the presence of UCPs in fungi and protozoa are only functional. Here, it is reported that in the yeast *Yarrowia lipolytica* there is a fatty acid-promoted and GDP-sensitive uncoupling activity indicating the presence of a UCP. The uncoupling activity is higher in the stationary phase than in the mid-log growth phase. The in silico search on the *Y. lipolytica* genome led to the selection of two genes with the highest homology to the UCP family, XM_503525 and XM_500457. By phylogenetic analysis, XP_503525 was predicted to be an oxaloacetate carrier while XP_500457 would be a dicarboxylate carrier. Each of these two genes was cloned and heterologously expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and the resulting phenotype was analyzed. The transport activity of the two gene products confirmed the phylogenetic predictions. In addition, only mitochondria isolated from yeasts expressing XP_503525 showed bioenergetic properties characteristic of a UCP: the proton conductance was increased by linoleic acid and inhibited by GDP. It is concluded that the XM_503525 gene from *Y. lipolytica* encodes for an oxaloacetate carrier although, remarkably, it also displays an uncoupling activity stimulated by fatty acids and inhibited by nucleotides.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Uncoupling proteins (UCPs) belong to the mitochondrial carrier superfamily [1]. In mammals, there are five UCP homologs [2]. However, the physiological function is well defined only for UCP1, a protein expressed specifically in brown adipose tissue where it participates in adaptive thermogenesis [3]. Fatty acids act as physiological UCP1 activators through a mechanism still unknown; in turn, cytosolic purine nucleotides inhibit the protein [3]. The physiological role and the molecular mechanism of transport and regulation of the other four homologs are still uncertain [4,5]. Available data suggest that these homologs could be part of the antioxidant defense system of the cells; modulating the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$), increasing the rate of oxygen consumption and thus decreasing the production of reactive oxygen species (ROS) [4,6,7]. The acute regulation of the mitochondrial activity of UCP2 and UCP3 is not well established and several reports indicate that fatty acids, retinoids, superoxide and lipoperoxides could

function as activators [8–12]. The physiological role and regulation of UCP4 and UCP5 (also called BMCP1) is still unclear.

The first UCP gene outside the animal kingdom was identified in *Arabidopsis thaliana* (named PUMP, or Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) [13]. Since then UCP homologs have been described in many plants. Most of these UCPs are stress induced and their physiological role seems to be to control the production of ROS. Additionally, some of the UCPs from plants seem to be involved in thermogenic processes related to reproduction and ripening of seasonal fruits [14]. Recently, uncoupling proteins were discovered in unicellular eukaryotes; *Acanthamoeba castellanii* being the first where a UCP activity was reported [15]. Subsequently, there have been reports of UCPs in other fungi such as *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* [16–18] and in protozoa such as *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii yoelii* and *Dictyostelium discoideum* [19–21]. However, none of the genes coding for the UCPs in these unicellular organisms have yet been identified.

The physiological role of UCPs in unicellular organisms is uncertain. Jarmuszkiewics et al. [22] have reported that *A. castellanii* cells growing at 4 °C exhibited an increase in their UCP levels, resembling what happens in mammalian brown fat during cold adaptation. However, it has been reasoned that in these small unicellular organisms it is not possible to establish a thermal gradient between the cytosol and the external environment, and therefore in

* Corresponding authors. E. Rial is to be contacted at the Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain. Tel.: +3491 837 3112 ext. 4236; fax: +3491 536 0432. S. Uribe-Carvajal, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, AP 70-242, México, D.F. México. Tel.: +5255 56225632; fax: +5255 5622 5630.

E-mail addresses: rial@cib.csic.es (E. Rial), suribe@ifc.unam.mx (S. Uribe-Carvajal).

lower eukaryotes a thermoregulatory role for these proteins is unlikely [23]. Again, there are evidences that point to a role in the protection against oxidative stress, e.g. it has been shown that in *A. castellanii* the inhibition of the AcUCP increased ROS production while the activation of this protein by fatty acids decreased ROS levels [23,24].

As stated above, and even though a large amount of biochemical information is available, nothing is known about the genes from lower eukaryotes that code for UCPs. Here, we demonstrate the presence of a UCP-like activity in *Yarrowia lipolytica* and report its regulation by fatty acids and nucleotides. The analysis of the *Y. lipolytica* genomic database led to the identification of two mitochondrial carrier sequences that may code for proteins with UCP-like activity. The two candidate genes were cloned, expressed recombinantly in *Saccharomyces cerevisiae* and their bioenergetic properties determined. The characterization indicates that in *Y. lipolytica* XP_500457 encodes for a dicarboxylate carrier, while XP_503525 yields an oxaloacetate carrier which nonetheless exhibits UCP-like activity.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

Mannitol, sorbitol, maleic acid, glucose, galactose, NADH, succinic acid, L-tryptophan, ammonium sulfate, adenine, oligomycin, ammonium hydroxide, nigericin, octyl gallate, linoleic acid, oleic acid, stearic acid, palmitic acid, GDP, safranin O, FCCP and valinomycin were from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). Carboxyatractyloside was from Calbiochem (La Jolla, CA). Zymolyase was from Seikagaku Co. (Tokyo, Japan). Yeast nitrogen base (YNB), yeast extract and casamino acids were from DIFCO labs (Detroit, MI, USA).

2.2. Cell strains and growth

The yeast used in this study were *Y. lipolytica* E150 (*MatB; his1-1; ura3-302; leu2-270; xpr2-322*) and *S. cerevisiae* W303 diploid (*Mat a/c; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; ura3-1; can1-100; trp-*). The *Y. lipolytica* strain was a kind gift from Dr Ulrich Brandt, University of Frankfurt, Germany. *Y. lipolytica* was grown in YD media (yeast extract–dextrose) at 30 °C under vigorous aeration until mid-exponential or stationary phase, as specified in each experiment. *S. cerevisiae* was precultured in SP med (0.67% YNB, 0.1% KH₂PO₄, 0.12% (NH₄)₂SO₄, 0.1% glucose, 2% lactate, 1.06 g/L casamino acids supplemented with 40 mg/mL adenine and 20 mg/mL L-tryptophan, pH 4.5). Cells were centrifuged and resuspended in SG (induction) medium (2% galactose, 0.67% YNB, 1.06 g/L casamino acids supplemented with 40 mg/mL adenine and 20 mg/mL L-tryptophan) to an optical density of 0.3; when the culture reached an optical density of 6, the cells were harvested and subjected to mitochondrial isolation.

2.3. Isolation of mitochondria

Y. lipolytica and *S. cerevisiae* mitochondria were isolated according to Guérin et al. [25]. Briefly, cells were harvested, washed two times and resuspended in 0.5 M β -mercaptoethanol, 0.1 M Tris, pH 9.3. The suspension was incubated for 15 min at 30 °C under agitation and washed three times in Tris–KCl buffer, pH 7. Cells were incubated in digestion buffer supplemented with 1 mg/mL zymolyase for 10 min at 30 °C. The resulting spheroplasts were washed with protoplast buffer (0.75 M sorbitol, 0.4 M mannitol, 10 mM Tris–maleate, 0.1% BSA, pH 6.8), centrifuged and disrupted with 15 passes of a tight pestle in a 50–mL Potter–Evelheim homogenizer. Mitochondria were obtained by differential centrifugation. Protein concentration was measured by the Biuret method using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.4. Oxygen uptake measurements

S. cerevisiae mitochondria were incubated in a respiration medium containing 0.6 M mannitol, 10 mM Tris–maleate, 10 mM K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mg/mL BSA, 1 μ M carboxyatractyloside (adenine nucleotide translocator inhibitor) and 10 μ g/mL oligomycin (ATP synthase inhibitor). The rate of oxygen uptake was measured using a YSI model 5300 oxygraph with a Clark-type electrode in a 1.5–mL water-jacketed chamber at 30 °C. Where indicated, 48 μ M linoleic acid (molar ratio 3:1 to albumin) and 1 mM GDP were used to evaluate, respectively, the activation or inhibition effects on the rate of respiration. Respiratory substrate was 1 mM NADH. At the end of the experiment, 1 μ M FCCP was added and the rate of oxygen consumption in the uncoupled state was determined. *Y. lipolytica* mitochondria were incubated in the same respiration buffer, except that 100 ng/mL nigericin and 1 μ M octyl gallate (alternative oxidase inhibitor) were added. Succinate (10 mM; plus 1 μ M rotenone) was used as respiratory substrate. Respiration was modulated by adding different concentrations of cyanide (1–50 μ M). Respiration was stimulated with 48 μ M linoleic acid and inhibited with 1 mM GDP.

2.5. Transmembrane potential ($\Delta\psi$) measurements and proton conductance kinetics

Experiments were performed in *Y. lipolytica* mitochondria under the same conditions as the oxygen consumption measurements, except 10 μ M safranin O was added. Fluorescence was measured in an Aminco/Ollis spectrofluorometer with excitation at 495 nm and emission at 586 nm. Sequential additions of different concentrations of cyanide (1–50 μ M) were used to get different steady states. One micromolar valinomycin was used to collapse the $\Delta\psi$ in order to get a baseline. Fluorescence was calibrated using a free K⁺ medium with valinomycin. K⁺ pulses were added to calibrate the membrane potential as described by Akerman and Wikström [26]. Proton conductance kinetics was determined by plotting the rate of oxygen consumption in state 4 against the $\Delta\psi$ in the presence of increasing concentrations of cyanide. The proton current was calculated assuming a theoretical H⁺/O stoichiometry of 6. Free fatty acid concentrations were estimated using the albumin binding constants according to Richieri et al. [27].

2.6. Mitochondrial transport of succinate and sulfate

Succinate transport was indirectly determined by measuring the rate of swelling in ammonium succinate. Mitochondria were suspended in iso-osmotic media: 0.125 mM ammonium succinate, 10 mM Tris–maleate pH 6.8, 1 μ M antimycin. Swelling was induced by the addition of 5 mM K₂HPO₄. Oxaloacetate carriers are capable of transporting sulfate [28]. Therefore, the sulfate-uptake activity was evaluated by following swelling in response to the addition of ammonium sulfate. The reaction mixture was the same as for succinate transport except 0.125 M ammonium sulfate instead of ammonium succinate. In both experiments, the rates of swelling were determined by the absorbance change at 540 nm in an Aminco/Ollis DW2000 spectrophotometer.

2.7. Mitochondrial permeability to protons

Proton permeability was determined from the rate of swelling in a potassium acetate reaction mixture containing 0.2 M potassium acetate, 10 mM Tris–maleate pH 6.8, 5 mM K₂HPO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA, 1 μ M carboxyatractyloside, 10 μ g/mL oligomycin and 1 μ M antimycin A. Swelling was initiated by the addition of 1 μ M valinomycin and the decrease in absorbance was where indicated: 1 mM GDP and 48 μ M linoleic acid (FA: BSA = 3).

2.8. Heterologous gene cloning in *S. cerevisiae*

The cDNA from each of the two genes of interest was synthesized by PCR and cloned in the *S. cerevisiae* diploid strain W303 using the pYEDP expression vector according to Rial et al. [9]. Cloned inserts were isolated and sequenced to confirm that the proper nucleotide sequence was obtained and cloned into pGemTeasy between restriction sites *NotI*/*PstI* for XP_500457 and *NotI*/*NcoI* for XP_503525; the vector was cut with these restriction enzymes to release inserts and the DNA was purified. The inserts were cloned in a pYEDP vector previously linearized between *KpnI*/*SacII* restriction sites. The modified pYEDP was introduced into *S. cerevisiae* W303 diploid by electroporation and transformant yeasts were selected for uracil autotrophy.

2.9. Phylogenetic sequence analysis

A total of 400 full-length, non-redundant protein sequences corresponding to phosphate carriers (PiC), adenine nucleotide translocators (ANT), dicarboxylate carriers (DiC), oxoglutarate carriers (OGC), oxaloacetate carriers (OAC), animal uncoupling proteins (UCP) and plant uncoupling proteins (pUCP) were retrieved from NCBI and ENSEMBL public databases (see complete list in Appendix A). According to the evolutionary analysis performed by Rial and Zardoya [29], the sequences were aligned using the program at the Mafft server (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>) with the L-INS-i strategy [30]. The maximum likelihood tree was inferred using PhyML v. 2.4.4 [31] with JTT as substitution model. The recovered tree shown was statistically within the confidence set ($P > 0.05$) as determined with the RaxML v. 7.0.4 [32] and the Consel v. 0.1j [33] programs. Bootstrap analysis was performed using RaxML at the Cipres Portal (<http://www.phylo.org/>).

2.10. Statistics

Data were analyzed with a two-way ANOVA. $P < 0.05$ was considered as a statistically significant difference.

3. Results and discussion

3.1. Metabolic implications/industrial applications of the modulation of the mitochondrial energetic efficiency in metabolite overproducers such as *Y. lipolytica*

It has been known since the late seventies that the rate of metabolite production by microorganisms is inversely related to their growth efficiency [34]. The reason behind this apparent paradox lies on the fact that the production of organic acids such as citric or glutamic requires low net amounts of ATP and NADH [35], i.e. the growth yield is lowered as a result of the incomplete oxidation of the energy source (overflow metabolism), bypassing potential sites of energy conservation or activating futile cycles that lead to net hydrolysis of ATP. Industrially, chemical uncouplers such as 2,4-dinitrophenol or benzoic acid successfully increase the production of metabolites [36]. The organisms used for the industrial production of metabolites are generally obligate aerobes and therefore the respiratory chain is (a) their major energy conserving system and (b) the principal reducing equivalent disposal mechanism. The uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial carriers that modulate the energetic efficiency by catalyzing the regulated dissipation of the proton gradient. In this regard, it may be suggested that manipulating the expression and activity of UCPs would optimize efficiency in the production of metabolites of industrial interest. The first uncoupling protein (UCP1) was described in the brown adipose tissue of mammals where it has a thermogenic role [1,3]. Since 1997, genes coding for UCP1 homologs have been described not only in all phyla of

the animal kingdom but also in plants [13]. In mitochondria from unicellular eukaryotes, the presence of uncoupling proteins has been evidenced mainly through cross-reaction with antibodies raised against plant UCPs and by detection of GDP-sensitive, fatty acid-promoted uncoupling [15–21]. However, the actual proteins responsible for this activity have not been identified.

3.2. Detection of a UCP-like activity in isolated mitochondria from *Y. lipolytica*

The ascomycetous yeast *Y. lipolytica* has raised a strong commercial interest due to its potential use in the large-scale industrial production of organic acids (2-ketoglutaric acid and citric acid); this yeast can use paraffins, hexadecanes, edible oils and other molecules as carbon sources [37]. In the *Y. lipolytica* cytoplasm, there are large lipid stores known as lipid bodies, and therefore the sensitivity of *Y. lipolytica* mitochondria to those fatty acids known to be present in its cytoplasm was tested [38]. All the fatty acids tested increased the rate of oxygen consumption with the following decreasing order of activity: linoleic > oleic > palmitic > stearic, suggesting an uncoupling effect (Fig. 1A).

To further analyze the possibility that *Y. lipolytica* mitochondria possess a UCP-like activity, it is necessary to demonstrate that the fatty acid effect can be inhibited by purine nucleotides such as ATP or GDP. With this aim, proton leak kinetics were analyzed in mitochondria isolated from yeasts harvested at two different growth stages: the mid-logarithmic phase (Fig. 2A) and the stationary phase (Fig. 2B). The changes in proton conductance were determined under three conditions: (a) basal conditions, without additions; (b) in the presence of linoleic acid; and (c) in the presence of linoleic acid plus GDP. The proton conductance of the two mitochondrial preparations was markedly increased in the presence of linoleic acid and this effect was partially reversed by the addition of GDP. In the stationary phase, the effect of GDP was higher.

The data in Fig. 2A and B were analyzed further by determining the proton flux at the highest common membrane potential under the different conditions of study (131 mV, dotted vertical lines in Fig. 2A and B). The effects are summarized in Fig. 2C: linoleic acid uncoupled to a similar extent both mid-log and stationary mitochondria. However, the inhibitory effect of GDP was higher in mitochondria from stationary cells (65% inhibition) than in those isolated from mid-

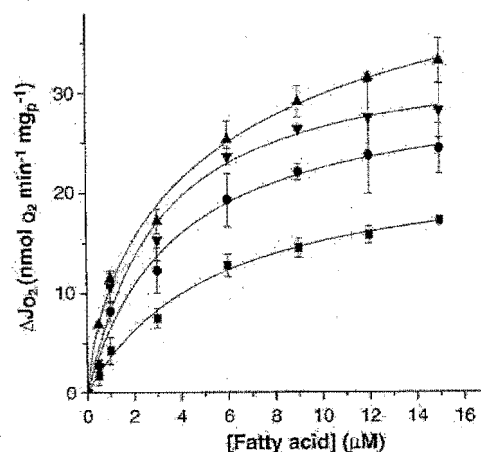


Fig. 1. Effect of fatty acids on the rate of respiration of mitochondria isolated from *Yarrowia lipolytica*. Reaction mixture: 0.6 M mannitol, 10 mM Tris-maleate, 10 mM K_2HPO_4 , 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, BSA 1 mg/mL (16 μM), 1 μM carboxyatractyloside, oligomycin 10 μg/mL, 10 mM succinate, 1 μM rotenone. Added fatty acids were as follows: ■, stearic acid; ●, palmitic acid; ▼, oleic acid; ▲, linoleic acid. The basal rate of respiration was 119 ± 2 nmol O_2 (min mg protein) $^{-1}$. Data represent the mean \pm SEM of five to six independent experiments.

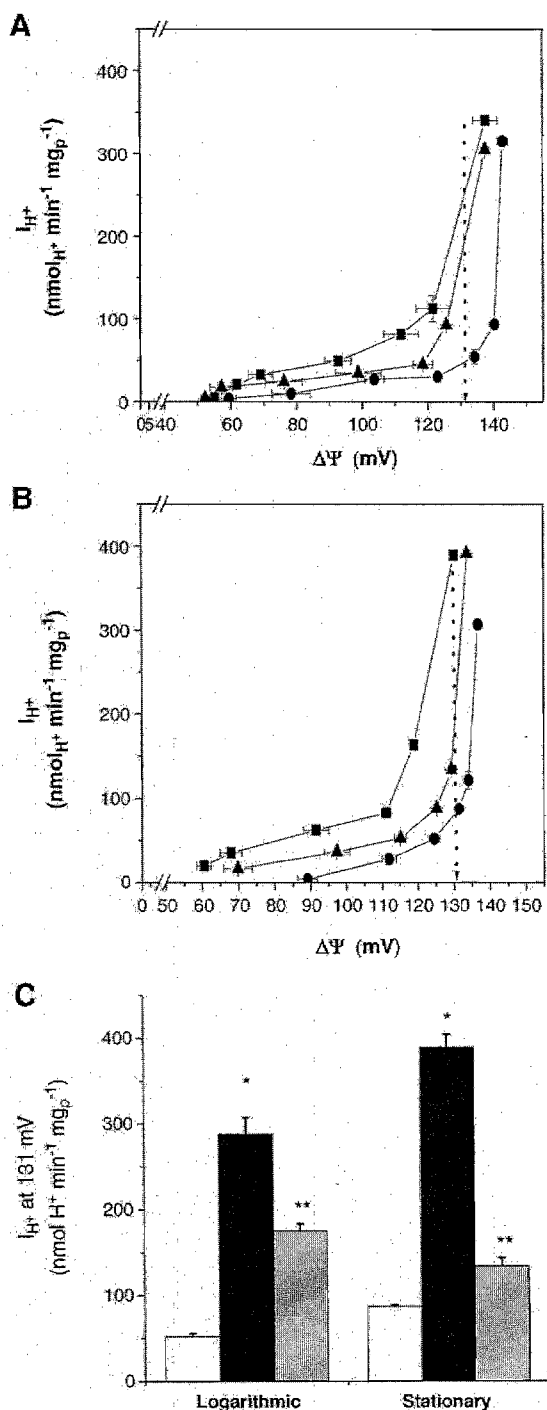


Fig. 2. Proton leak kinetics of mitochondria isolated from *Yarrowia lipolytica* in the mid-logarithmic (A) and stationary phase (B). Reaction mixture as in Fig. 1, except KCN was used for titration of the $\Delta\Psi$ and oxygen flux (see methods). ●, Control; ■, linoleic acid; ▲, linoleic acid + GDP. (C) Estimated proton current (I_{H^+}) at the highest common $\Delta\Psi$ (131 mV, dotted lines in panels A and B). Empty bars, control mitochondria; filled bars, 48 μ M linoleic acid; gray bars, 48 μ M linoleic plus 1 mM GDP. Data represent the mean \pm SEM of five to six independent experiments. * $P < 0.05$ compared to control; ** $P < 0.05$ compared to uncoupled state without GDP.

log phase cells (39% inhibition). The stimulation of respiration by the uncoupler FCCP was identical in the two preparations (data not shown). The inhibition by GDP of the linoleic-induced increase in proton conductance is indicative of the presence of a UCP in *Y. lipolytica*. Interestingly, when *Y. lipolytica* reaches the stationary

phase, the lipid bodies accumulated during the exponential phase are increasingly mobilized. The higher GDP-sensitive activity in mitochondria from cells grown to the stationary phase would imply a higher expression and a resemblance with other eukaryotic cells where UCP2 and/or UCP3 are up-regulated as they shift their catabolism from glucose to fatty acid oxidation [6,39,40]. This UCP-mediated mild uncoupling has been related to the prevention of ROS overproduction [4,6,7,41]. A recent publication has re-emphasized this function clarifying that UCP3 does not play a direct role in fatty acid oxidation or its transport and that UCP3 expression seems to be related to the mitigation of ROS-mediated damage [42].

3.3. Search for UCP sequences in *Y. lipolytica* genome

Once a UCP-like phenotype was detected in *Y. lipolytica* mitochondria, it was decided to analyze its genome in order to identify possible candidates for a gene coding for a UCP-like protein. Since the genome of *Y. lipolytica* has been sequenced [43], a PSI-BLAST search was performed using the sequence profile generated with the available UCP1 sequences. Two candidates were identified: XM_500457 and XM_503525 (Fig. 3). The phylogenetic analysis revealed that XM_500457 appeared as an ortholog of the dicarboxylate carrier (DIC) while XM_503525 is related to the yeast oxaloacetate carriers (OAC) (Fig. 4). Details of the names and sources of the specific proteins in the phylogenetic analysis can be found in the Supplementary material provided (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Table 1).

3.4. Characterization of the transport properties XP_500457 and XP_503525

The transport activity of the putative carriers was analyzed in mitochondria isolated from *S. cerevisiae* which was chosen as host organism because it lacks UCPs [44,45]. To do this, the candidate genes XM_500457 and XM_503525 were cloned and expressed recombinantly in *S. cerevisiae*. A strain containing the empty plasmid was used as a control.

Mitochondrial swelling in iso-osmotic salts has been widely employed to determine the transport specificity of mitochondrial carriers and particularly those present in yeast [46,28]. Thus, swelling in ammonium succinate (plus phosphate) can be used to establish the presence of a DIC while swelling in ammonium sulfate has been used to identify an oxaloacetate carrier [28]. In ammonium succinate, the swelling rates of mitochondria from the control and the recombinant strains were measured (Fig. 5A): all three strains swell in this medium, indicating the presence of carriers for this dicarboxylic acid. However, mitochondria isolated from the XP_500457-containing *S. cerevisiae* strain exhibited a significant increase ($P < 0.05$) in the uptake of succinate as compared to the control or to XP_503525-containing mitochondria. When the rates of swelling in ammonium sulfate were measured, it was observed that mitochondria containing the XP_503525 protein exhibited higher sulfate transport activity than the control (Fig. 5B). Mitochondria containing the XP_500457 protein exhibited only a marginal increase in activity as compared to the control (Fig. 5B). From the data in Fig. 5, it may be conclusively established that XM_503525 codes for an oxaloacetate carrier while XM_500457 codes for a dicarboxylate carrier. Additionally, it is demonstrated that this recombinant expression system allowed the correct targeting and folding of these *Y. lipolytica* carriers in the mitochondria from *S. cerevisiae*.

3.5. The protonophoric activity of the XP_500457 and XP_503525 proteins

Although both the phylogenetic data and the transport experiments demonstrated that XP_500457 is a dicarboxylate carrier while

A

```

MAVILDKQKK QPPKQISTLG GFVAGAIAC GAVTVTNPIE LVKTRMQLQG ELAARGEAKK
VYTSPLQALV KIYKSEGIKQ LQSGLFSAVY YQIGLNGCRL GLYEFTRKVI ANVCNIDLNK
ENPVGLNVAS GAISGIMGAV AGSPFYLIKT RQQSYSFAFK VQAQTYXYKSI GDGFRQIYGA
EGFKGLYRGV DAAILRTGAG SSVQLPIYNW AKELLLKHHI TDPGASTHLV ASAMSGLGVA
VVMNPWDVLM TRMYNQKGMN YKNPFDCLMK TVSIEGPFAL YKGFGAHLLR IAPHTLITLM
FMEQTMKWKV WFEQVVPF

```

B

```

MSSLQKHLPM ESKTKPAEIP LSAVPPSAKI HYPFWYGGFA SVVAGVFTHP LDLAKVRLQT
AKTRGQGLFG TLVNVVKHEG ITGVVYGLSA SMLRLSTVST MRFCMYEYLK ESIAPYYNYP
NKRDNQPPMY VLLPISIIAG ISGGIVGNPA DIINIRNQND QSLPKDQRN YKHAFDGLIR
MYKEGVRAM FRGLGPNCTR GVLMTSSQMV SYDSFKALLV NHLGMNPDKK ATHFSASLLA
GLMATTVCSP VDVVTRIMN AHAHHSKDSA FTIFFNALKQ EGPLEMFRGW LPSFVRLGQP
TILTYIVLEQ LKFYKIGMRH

```

Fig. 3. Protein sequences of the two mitochondrial carriers identified in the *Yarrowia lipolytica* genome as more closely related to the UCP family. (A) XP_503525. (B) XP_500457.

XP_503525 is an oxaloacetate carrier, it was still necessary to determine whether the heterologous expression of one of these proteins conferred a UCP-like phenotype to *S. cerevisiae*. Therefore, we decided to test the uncoupling activity in the strains expressing these proteins. Two controls were performed in order to exclude unspecific effects: (1) a positive control expressing the rat UCP1 and (2) a negative control containing the empty expression vector

(pYEDP). The rate of oxygen consumption by isolated mitochondria from each *S. cerevisiae* strain was measured before and after the addition of linoleic acid or linoleic acid plus GDP (Fig. 6). The rate of oxygen consumption in state 4 was significantly higher in the strain expressing UCP1, reflecting the fatty acid independent basal proton conductance of UCP1 that has been previously reported [47]. In contrast the expression of the *Yarrowia* proteins did not have any

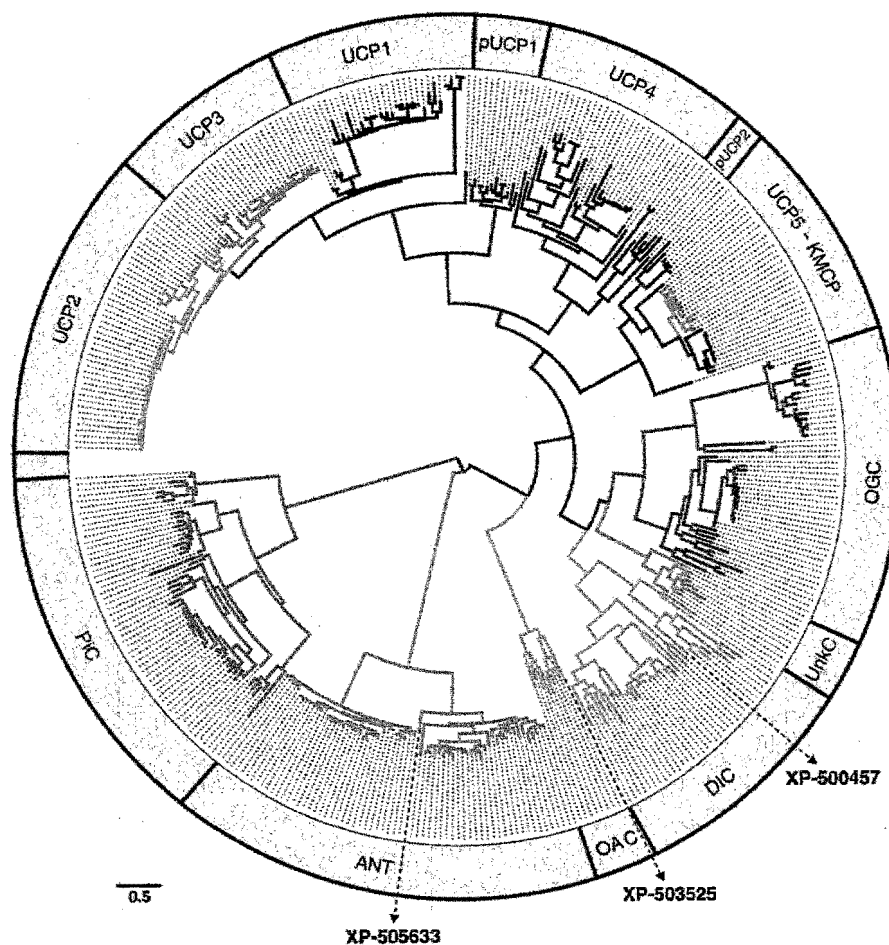


Fig. 4. Circular tree representing the phylogenetic relationships of the mitochondrial carrier proteins with highest homology to the uncoupling proteins. The location of the *Yarrowia lipolytica* carriers XP_503525 and XP_500457 are indicated. The ANT from *Yarrowia lipolytica* (XP_505633) is also indicated. Abbreviations: PiC, phosphate carriers; ANT, adenine nucleotide translocators; OAC, oxaloacetate carriers; DIC, dicarboxylate carriers; UnkC, carriers of yet undefined function; OGC, oxoglutarate carriers; UCP5, uncoupling protein 5 also termed BMCP1 (brain mitochondrial carrier protein 1); KMCP, kidney mitochondrial carrier protein; pUCP2, plant uncoupling protein 2; pUCP1, plant uncoupling protein 1; UCP1–4, uncoupling proteins 1 to 4. A detailed version of the tree where all the sequences are identified is included as Supplementary material. Tree topology was drawn by using Dendroscope v.2.3 and the circular tree generated with FigTree v1.2.2.

detectable effects. In the presence of linoleic acid, there was an increase in the rate of oxygen consumption only in mitochondria from cells containing UCP1 or XP_503525 (Fig. 6). The linoleic acid-mediated increase in oxygen consumption was not observed in mitochondria from the cells containing the empty pYEDP vector, confirming the absence of a UCP in *S. cerevisiae*, and furthermore, that its mitochondrial carriers were not sensitive to low fatty acid concentrations [44,45,48]. When GDP was added, the linoleic-induced increase in oxygen consumption was fully reverted in mitochondria from the cells expressing either UCP1 or XP_503525. Similar results were obtained when the effect of linoleic acid and GDP were tested under passive swelling conditions with potassium acetate plus valinomycin. Proton permeability was sensitive to fatty acids and nucleotides only in mitochondria from UCP1- or XP_503525-expressing yeast (Fig. 7). Thus, the results clearly indicate that the XP_503525 protein behaves as an uncoupling protein. Additionally, the lack of response when XM_500457 is present rules out the possibility that this protein is a UCP and furthermore that the effects observed in *S. cerevisiae* mitochondria are simply due to the expression of any given foreign mitochondrial carrier.

It is well established that several mitochondrial carriers (e.g. ANT, dicarboxylate carrier, aspartate/glutamate carrier) can catalyze an increase in the membrane proton conductance in the presence of fatty

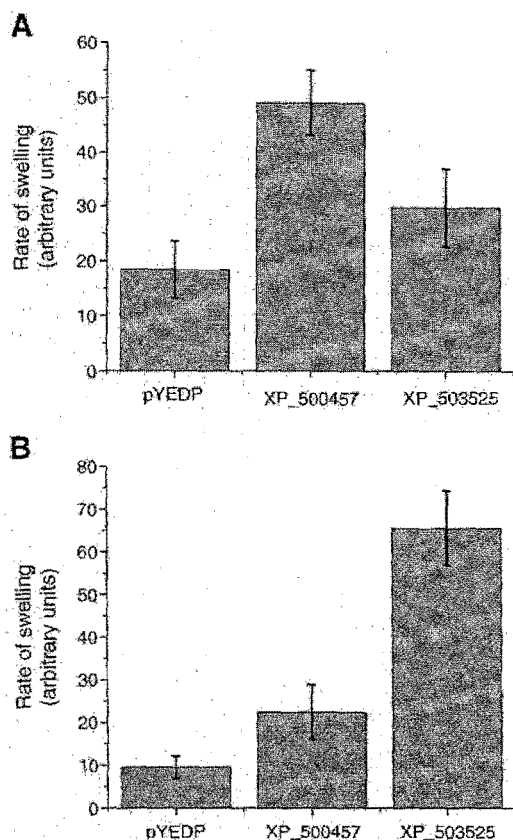


Fig. 5. Characterization of the transport activities of the XP_503525 and XP_500457 proteins. Both XP_503525 and XP_500457 were heterologously expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Their transport properties were evaluated in isolated mitochondria as follows: (A) succinate (DIC) transport. Mitochondria were resuspended in iso-osmotic medium: 0.125 M ammonium succinate, 1 μ M antimycin, 10 mM Tris-malate pH 6.8 and the rate of swelling was followed spectrophotometrically at 540 nm in an Aminco/Olis DW2000 spectrophotometer. Swelling was induced by addition of 5 mM K_2HPO_4 . (B) Oxaloacetate transport. This activity was evaluated as the sulfate-mediated mitochondrial swelling. Mitochondria were resuspended in iso-osmotic medium: 0.125 M ammonium sulfate, 1 μ M antimycin, 10 mM Tris-malate pH 6.8 and the rate of swelling was measured at 540 nm. Data from three independent experiments \pm SEM each performed in duplicate. * $P < 0.05$ compared to the control (pYEDP).

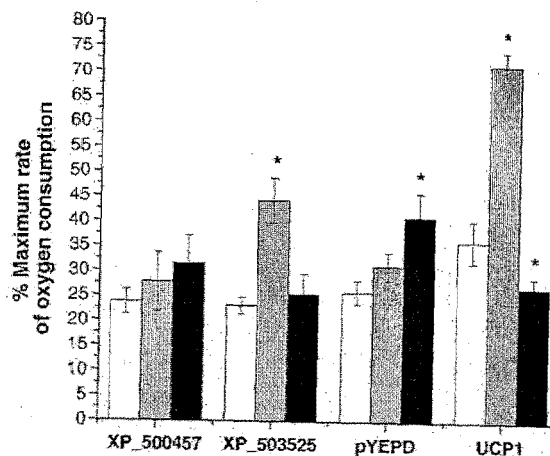


Fig. 6. Respiratory activity of isolated mitochondria from three *Saccharomyces cerevisiae* strains. Incubation mixture as in Fig. 1, except 3 mM NADH as a respiratory substrate. Rates are expressed as percentage of the respiratory activity in the presence of FCCP which was 421 ± 28 nmol O_2 (min mg protein) $^{-1}$. Each *Saccharomyces cerevisiae* strain contained a heterologous protein as indicated: XP_503525, XP_500457, UCP1 or the empty plasmid pYEDP. UCP1 was the positive control and the strains containing the pYEDP empty vector were the negative control. Additions were as follows: empty bars, State 4; gray bars, 48 μ M linoleic acid; black bars, 48 μ M linoleic acid plus 1 mM GDP. Data represent the mean values \pm SEM of five independent experiments. * $P < 0.05$ as compared to the control.

acids [46]. However, this activity is insensitive to purine nucleotides (ANT could be an exception). In 2006, Borecky et al. [49] reported that the gene product of SCCCLR1076E12.g was a UCP (ScPUMP5). However, these authors tested the effect of linoleic acid on transport but not that of purine nucleotides. Subsequently, Palmieri et al. [50] demonstrated that PUMP5 was not a UCP but instead it was a dicarboxylate carrier. Here, it is shown that XP_500457 is a DIC but it is unable to induce a fatty acid uncoupling activity. In contrast, XP_503525 exhibited only a marginal dicarboxylate carrier activity while it was an active oxaloacetate carrier. In addition, XP_503525 was stimulated by fatty acids and inhibited by GDP as a *bona fide* UCP would.

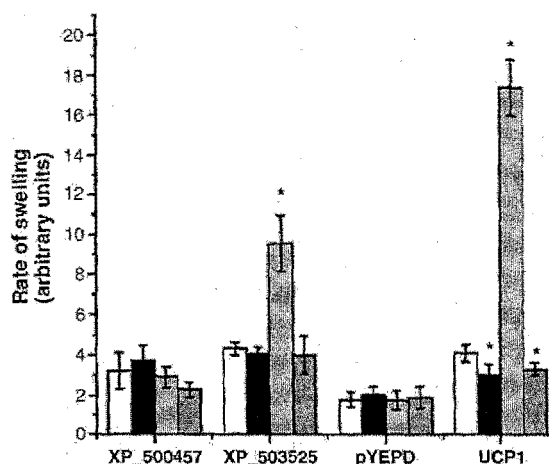


Fig. 7. Proton permeability of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria expressing different mitochondrial carriers. Incubation mixture: 0.2 M potassium acetate, 5 mM K_2HPO_4 , 2 mM $MgCl_2$, 1 mg/mL BSA, 1 μ M carboxyatractyloside, 10 μ g/mL oligomycin, 1 μ M antimycin and 1 mM Tris-malate, pH 6.8. Swelling was initiated by 1 μ M valinomycin. Proton permeability was determined from the swelling data. Conditions were as follows: empty bars, basal rate; black bars, 1 mM GDP; light gray bars, 48 μ M linoleic acid; dark gray bars, 48 μ M linoleic acid plus 1 mM GDP. Data represent the mean values \pm SEM of five independent experiments each performed in duplicate. * $P < 0.05$ compared to basal swelling.

3.6. Lipid handling by *Y. lipolytica* and the role of its uncoupling protein

The physiological role of most members of the UCP family is still under debate. Undoubtedly, a thermoregulatory role in unicellular organisms can be ruled out since it is not possible to establish a thermal gradient between the cell and its environment [23]. Currently, there are many data consistent with the participation of the UCPs in the defense against oxidative stress [2,4,5,6,7,23,40], e.g. in the amoeboid *A. castellanii*, activation of a UCP decreases ROS and vice versa. UCP inhibition increases ROS [24]. Here, it is likely that the UCP activity results in an increase in proton conductance that leads to a higher respiratory rate and the concomitant decrease in ROS production. This UCP-mediated uncoupling would be particularly important under resting, non-phosphorylating, conditions. Indeed, a decrease in ADP/O has been observed in plants [51] and unicellular organisms such as *A. castellanii* or *D. discoideum* [20,52].

An interesting observation is that in unicellular organisms, the UCP activity generally coexists with an alternative oxidase (AOX). However, little is known about the interactions between these two proteins or about the physiological implications and regulation resulting from their interaction. Both activities seem to inhibit the mitochondrial production of ROS, although by different mechanisms. AOX decreases the production of ROS through the oxidation of ubiquinol, while the UCP-like activity decreases the $\Delta\Psi$ accelerating the respiratory chain. However, regulation seems to work in opposite ways, as AOX is activated by GDP and inhibited by fatty acids [53]. There is one case where it has been suggested that the joint presence of an alternative respiratory chain and a UCP results in increased adaptability to adverse environments: *C. albicans* seems to depend on both its UCP and its AOX to increase its resistance to ROS and enhance its invasiveness [18,54].

Y. lipolytica is an oleaginous yeast with a dynamic fatty acid metabolism [55]. *Y. lipolytica* stores large amounts of triglycerides in lipid bodies. While in the exponential phase lipids are predominantly used to build membranes, in the stationary phase the fatty acids are liberated from the lipid bodies and are used as a carbon source [56,57]. When lipid bodies are degraded during the stationary phase, the major fatty acids released are linoleic, oleic, stearic and palmitic [38]. In isolated mitochondria, it was found that these fatty acids were able to modulate the respiratory activity, probably through the interaction with a UCP (Fig. 1). Since the cytosolic concentration of fatty acids vary widely, it is possible that they may act as internal messengers. The major site for fatty acid β -oxidation in animal cells is the mitochondrion. In contrast, in plant and yeasts, β -oxidation generally takes place in peroxisomes [55,58,59]. Therefore, the activation of a UCP in *Y. lipolytica* would not accelerate fatty acid oxidation as it occurs with UCP1 in the mammalian brown adipose tissue. Instead, it would be linked to the decrease in ROS production and/or the reoxidation of NAD(P)H under the conditions of low ATP demand of the stationary phase. It would be of interest to establish if in *Y. lipolytica* the variations in UCP-like activity influence the production of industrially desirable organic acids.

3.7. Evolutionary considerations

The closest homologs of XP_503525 are a group of yeast carriers that only present a 55–60% identity with the *Yarrowia* carrier. The homolog in *S. cerevisiae* is the carrier protein NP_012802 that has been characterized as the mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate [28]. The observed sequence divergence does not imply a different carrier function but it could be sufficient to explain a change in transport properties. To put it in perspective, the human UCP1 displays a 60% identity with its ortholog in *Cyprinus carpio* [60]. This comparison is of relevance since the phylogenetic analyses of the UCP family have revealed that the UCP1 from eutherian mammals has

been subject of a strong structural divergence that has accompanied the development of brown adipose tissue as a thermogenic organ.

Thus, the carp UCP1 does not have a thermoregulatory function since its expression in the liver decreases when fish are exposed to cold, and furthermore, its functional characterization has demonstrated that the carp protein does not display the distinctive nucleotide-sensitive basal proton conductance found in the eutherian UCP1 [60,61]. Finally, it should be remembered that in *S. cerevisiae* there are no orthologs of the known members of the UCP family, from UCP1 to UCP5 and indeed, that there is no evidence for the presence of a UCP-like activity activated by fatty acids and inhibited by nucleotides [44,45].

Phylogenetic analyses should be the basis for the nomenclature of protein families. The position of XP_503525 in the reconstructed phylogeny of the mitochondrial carrier protein superfamily presented in Fig. 4 does not allow naming this gene product as an uncoupling protein. The phylogeny implies that it is an oxaloacetate carrier although the data presented demonstrate that it has evolved to sustain a nucleotide-sensitive uncoupling activity that is activated by fatty acids as *bona fide* UCPs do. Therefore, we can envisage that the oxaloacetate carrier from *S. cerevisiae* would have a single metabolite transport activity while as our data suggest that the *Y. lipolytica* XP_503525 protein may have evolved to allow a fatty acid-induced uncoupling activity.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation to ER (BFU2006-08182 and Consolider-Ingenio CSD2007-00020). Research in Mexico was supported by grants from DGAPA/UNAM IN217109 and CONACyT 79989 to SU. The AEI, from the Spanish Ministry of Foreign Affairs and Cooperation, provided a visiting fellowship to LALM. LALM is a CONACyT fellow/Biochemistry PhD student at UNAM. We thank Pilar Zaragoza and Ramón Méndez for their expert technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbabo.2009.09.003.

References

- [1] F. Palmieri, The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 689–709.
- [2] F. Boujilaud, E. Couplan, C. Pecqueur, D. Ricquier, Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1); UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4, *Biochim. Biophys. Acta* 1504 (2001) 107–119.
- [3] E. Rial, M.M. González-Barroso, Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2, *Biochim. Biophys. Acta* 1504 (2001) 70–81.
- [4] B. Cannon, Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species—or not? *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 449–458.
- [5] K.S. Echtay, Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 1351–1371.
- [6] S. Krauss, C.Y. Zhang, B.B. Lowell, The mitochondrial uncoupling-protein homologues, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 248–251.
- [7] A.E. Vercesi, J. Borecký, Ide G. Maia, P. Arruã, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, Plant uncoupling mitochondrial proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 383–404.
- [8] A. Negre-Salvayre, C. Hirtz, G. Carrera, R. Cazenave, M. Troly, R. Salvayre, L. Penicaud, L. Casteilla, A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation, *FASEB J.* 11 (1997) 809–815.
- [9] E. Rial, M.M. González-Barroso, C. Fleury, S. Iturrizaga, D. Sanchis, J. Jiménez-Jiménez, D. Ricquier, M. Goubern, F. Boujilaud, Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2, *EMBO J.* 18 (1999) 5827–5833.
- [10] K. Echtay, T. Esteves, J. Pakay, M. Jakabsons, A. Lambert, M. Portero-Otín, R. Pamplona, A. Vidal-Puig, S. Wang, S. Roebuck, M.D. Brand, A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling, *EMBO J.* 22 (2003) 4103–4110.
- [11] M.D. Brand, C. Affourtit, T.C. Esteves, K. Green, A.J. Lambert, S. Miwa, J. Pakay, N. Parker, Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 755–767.
- [12] T.C. Esteves, M.D. Brand, The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3, *Biochim. Biophys. Acta* 1709 (2005) 34–44.

- [13] A.E. Vercesi, I.S. Martins, M.A. Silva, H.M. Leite, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, PUMPing plants, *Nature* 375 (1995) 24.
- [14] Y. Onda, Y. Kato, Y. Abe, T. Ito, M. Morohashi, Y. Ito, M. Ichikawa, K. Matsukawa, Y. Kakizaki, H. Koiwa, K. Ito, Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage, *Plant Physiol.* 146 (2008) 636–645.
- [15] W. Jarmuszkiwicz, C.M. Sluse-Goffart, L. Hryniewiecka, F.E. Sluse, Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 23198–23202.
- [16] W. Jarmuszkiwicz, G. Milani, F. Fortes, A.Z. Schreiber, F.E. Sluse, A.E. Vercesi, First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*, *FEBS Lett.* 467 (2000) 145–149.
- [17] V.G. Tudella, C. Curti, F.M. Soriani, A.C. Santos, S.A. Uyemura, *In situ* evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2003) 162–172.
- [18] R.A. Cavalheiro, F. Fortes, J. Borecký, V.C. Faustini, A.Z. Schreiber, A.E. Vercesi, Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 1455.
- [19] S.A. Uyemura, S. Luo, M. Vieira, S.N. Moreno, R. Docampo, Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* mitochondria *in situ*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 385–393.
- [20] W. Jarmuszkiwicz, M. Behrendt, R. Navet, F.E. Sluse, Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development, *FEBS Lett.* 532 (2002) 459–464.
- [21] S.A. Uyemura, S. Luo, S.N. Moreno, R. Docampo, Oxidative phosphorylation, Ca(2+) transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9709–9715.
- [22] W. Jarmuszkiwicz, N. Antos, A. Swida, M. Czarna, F.E. Sluse, The effect of growth at low temperature on the activity and expression of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria, *FEBS Lett.* 569 (2004) 178–184.
- [23] F.E. Sluse, W. Jarmuszkiwicz, Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects, *FEBS Lett.* 510 (2002) 117–120.
- [24] M. Czarna, W. Jarmuszkiwicz, Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3136–3140.
- [25] B. Guérin, P. Labbe, M. Somlo, Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios, *Methods Enzymol.* 55 (1979) 149–159.
- [26] K.E.O. Åkenman, M.K. Wikström, Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.* 68 (1976) 191–197.
- [27] G.V. Richieri, A. Anel, A.M. Kleinfeld, Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB, *Biochemistry* 32 (1993) 7574–7580.
- [28] L. Palmieri, A. Voza, G. Agrimi, V. De Marco, M.J. Runswick, F. Palmieri, J.E. Walker, Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22184–22190.
- [29] E. Rial, R. Zardoya, Oxidative stress, thermogenesis and evolution of uncoupling proteins, *J. Biol.* 3 (2009) 58.
- [30] K. Katoh, H. Toh, Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program, *Brief. Bioinform.* 9 (2008) 286–298.
- [31] S. Guindon, O. Gascuel, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood, *Syst. Biol.* 52 (2003) 696–704.
- [32] A. Stamatakis, T. Ludwig, H. Meier, RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees, *Bioinformatics* 21 (2005) 456–463.
- [33] H. Shimodaira, M. Hasegawa, CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection, *Bioinformatics* 17 (2001) 1246–1247.
- [34] J.D. Linton, A.L. Rye, The relationship between the energetic efficiency in different micro-organisms and the rate and type of metabolite overproduced, *J. Ind. Microbiol.* 4 (1989) 85–96.
- [35] J.D. Linton, Metabolite production and growth efficiency, *Antonie van Leeuwenhoek* 60 (1991) 293–311.
- [36] M. Galimetzter, W. Burgstaller, Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy-spilling process, adjusting the catabolic carbon flow to the nutrient supply and the activity of catabolic pathways, *Microbiology* 148 (2002) 1143–1149.
- [37] G. Barth, C. Gaillardin, Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev.* 19 (1997) 219–237.
- [38] K. Athenstaedt, P. Jolivet, C. Boulard, M. Zivy, L. Negroni, J.M. Nicaud, T. Chardot, Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source, *Proteomics* 6 (2006) 1450–1459.
- [39] D.S. Weigle, L.E. Selfridge, M.W. Schwartz, R.J. Seeley, D.E. Cummings, P.J. Havel, J.L. Kuijper, H. Bertran del Rio, Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle, a potential explanation for the effect of fasting, *Diabetes* 47 (1998) 298–302.
- [40] F. Bouillaud, UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 377–383.
- [41] V.P. Skulachev, "Mild" uncoupling of mitochondria, *Biosci. Rep.* 17 (1997) 347–366.
- [42] E.L. Seifert, V. Bézaire, C. Estey, M.E. Harper, Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 25124–25131.
- [43] B. Dujon, D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. de Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J.-M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G.-F. Richard, M.-L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, J.-L. Souciet, Genome evolution in yeasts, *Nature* 430 (2004) 35–44.
- [44] I. Arechaga, S. Raimbault, S. Prieto, C. Levi-Meyruis, P. Zaragoza, B. Miroux, D. Ricquier, F. Bouillaud, E. Rial, Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function, *Biochem. J.* 296 (1993) 693–700.
- [45] D. Roussel, M. Harding, M.J. Runswick, J.E. Walker, M.D. Brand, Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *J. Bioener. Biomembr.* 34 (2002) 165–176.
- [46] L. Palmieri, F.M. Lasorsa, A. Voza, G. Agrimi, G. Fiermonte, M.J. Runswick, J.E. Walker, F. Palmieri, Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1459 (2000) 363–369.
- [47] E. Rial, E. Aguirreitia, J. Jiménez-Jiménez, A. Ledesma, Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* 1608 (2004) 122–130.
- [48] M.M. González-Barroso, C. Fleury, F. Bouillaud, D.G. Nicholls, E. Rial, The uncoupling protein UCP1 does not increase the proton conductance of the inner mitochondrial membrane by functioning as a fatty acid anion transporter, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15528–15532.
- [49] J. Borecky, F.T.S. Nogueira, K.A.P. de Oliveira, I.G. Maia, A. Vercesi, P. Arruda, The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 849–864.
- [50] L. Palmieri, N. Picault, R. Arrigoni, E. Besin, F. Palmieri, M. Hodges, Molecular identification of the three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization, *Biochem. J.* 410 (2008) 621–629.
- [51] W. Jarmuszkiwicz, A.M. Almeida, A.E. Vercesi, F.E. Sluse, C.M. Sluse-Goffart, Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 34882–34886.
- [52] W. Jarmuszkiwicz, A. Swida, M. Czarna, N. Antos, C.M. Sluse-Goffart, F.E. Sluse, A.E. Vercesi, In phosphorylating *Acanthamoeba castellanii* mitochondria the sensitivity of uncoupling protein activity to GTP depends on the redox state of quinone, *J. Bioener. Biomembr.* 37 (2005) 97–107.
- [53] W. Jarmuszkiwicz, C.M. Sluse-Goffart, A.E. Vercesi, F.E. Sluse, Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance, *Biosci. Rep.* 21 (2001) 213–222.
- [54] S. Cheng, C.J. Clancy, Z. Zhang, B. Hao, W. Wang, K.A. Jczkowski, M.A. Pfaffler, M.H. Nguyen, Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue, *Cell. Microbiol.* 9 (2007) 492–501.
- [55] G. Barth, C. Gaillardin, in: W.K. Wolf (Ed.), *Yarrowia lipolytica*, pp. 313–388. In "Non-conventional Yeast in Biotechnology", Vol 1, 1996, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- [56] A. Beopoulos, Z. Mrozova, F. Thevenieau, M.T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot, J.M. Nicaud, Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *App. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 7779–7789.
- [57] K. Mlčková, E. Roux, K. Athenstaedt, S. d'Andrea, G. Daum, T. Chardot, J.M. Nicaud, Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *App. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 3918–3924.
- [58] L.A. Maggio-Hall, N.P. Keller, Mitochondrial beta-oxidation in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Microbiol.* 54 (2005) 1173–1185.
- [59] G. Feron, C. Blin-Perrin, I. Krasniewski, G. Mauvais, J. Lherminier, Metabolism of fatty acid in yeast: characterisation of beta-oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidiobolus* sp. cultivated on ricinoleic acid methyl ester, *FEMS Microbiol. Lett.* 250 (2005) 63–69.
- [60] M. Jastroch, J.A. Buckingham, M. Helwig, M. Klingenspor, M.D. Brand, Functional characterization of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain, *J. Comp. Physiol.* 177 (2007) 743–752.
- [61] J. Jiménez-Jiménez, R. Zardoya, A. Ledesma, M. García 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.

Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Advances in Protein Physical Chemistry, 2008: ISBN: 978-81-7895-324-3
Editors: Enrique García-Hernández and D. Alejandro Fernández-Velasco

Structure and mechanism of the mitochondrial uncoupling protein (UCP)

Luis Alberto Luévano-Martínez and Salvador Uribe-Carvajal
Department of Biochemistry, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apdo. Postal 70-242, México City, México

Abstract

Here, we review basic concepts of the mechanisms and thermodynamics of protein-mediated transport; on this basis, we then analyze the structure and possible action mechanism of some members of the mitochondrial six-transmembrane helix transport protein family. Transport proteins are highly specific intrinsic proteins, i.e. they contain transmembrane segments formed by hydrophobic residues arranged in highly organized secondary structures. In transport proteins these transmembrane segments may contain charged aminoacids which are sequestered from the lipid bilayer by the tertiary and quaternary structures. In regard to structure, many transport proteins are constituted by repeats of two-transmembrane-helix (2TMH) units. However, the permeation mechanisms

Correspondence/Reprint request: Dr. Salvador Uribe-Carvajal, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico City, México. E-mail: suribe@ifc.unam.mx

are not clear, e.g. the stoichiometry between the number of 2TMH units and the number of pores varies. The mitochondrial six-transmembrane helix transporter family probably includes 17 members. Each 6TMHT is constituted of three 2TMH units. The structure of one of these transporters, an electrophoretic antiporter, the adenine-nucleotide translocator, has recently been described and it may be used to understand the general structure of this family of mitochondrial transporters. In addition, uncoupling proteins (UCPs) which behave as proton uniporters are analyzed. The possible function of the different UCP isoforms is revised, together with the models designed to understand their solute translocation mechanism. In addition, the description of UCPs in non-mammalian organisms, including plants and unicellular organisms opens questions on the physiological role of these proteins. Thus, besides the recognized role of the brown adipose tissue UCP1 as a heat generator, possible roles in energy dissipation and prevention of reactive oxygen species formation in diverse organisms are discussed.

1. Biological membranes

The hydrophobic lipid bilayer in biological membranes is a thermodynamic barrier for the passage of hydrophilic solutes. As a result, biological membranes separate aqueous environments containing different ion or solute concentrations. Thus, the solutes in the extracellular milieu and in the cytoplasm may be very different. This is also true when the composition of the cytoplasm and different membranous organelles is compared. These differences constitute important driving forces involved in processes such as cell nutrition and signaling. However, in order to traverse the membrane and reach a different compartment, hydrophilic molecules need to bypass the thermodynamic barrier constituted by the bilayer. Such a bypass may be provided by specialized proteins known as transporters or pumps. Protein catalyzed transport is rapid and specific [1].

Transport proteins are intrinsic proteins. That is, they traverse the hydrophobic bilayer a number of times by means of their transmembrane segments. These protein segments are hydrophobic and thus, membrane soluble. It has been observed that, regardless of whether the transmembrane segments are in alpha helix or in beta-sheet, they need to be highly ordered shielding the hydrophilic peptide bonds and even some hydrophilic side chains from the surface of the protein in contact with the bilayer. At the same time, hydrophobicity is conferred by the side chains of non-polar amino-acids on the surface of the transporter [2].

2. Solute transport

The impermeability of the phospholipid bilayer to most charged molecules is a problem solved by the presence of protein transporters. The passage of a solute from an aqueous compartment across a membrane and into a second aqueous pool is termed transport. Different solutes are transported across membranes.

Spontaneous transport, also called facilitated diffusion, is driven by two forces which tend to equilibrate the concentration of solutes across a membrane. First, the concentration gradient of a solute at both sides of the membrane and second, if the solute is charged, the electric charge difference across the membrane. Thus, the spontaneous transport of a cation or an anion across a membrane is thermodynamically governed by its electrochemical gradient. It is catalyzed by protein channels opening in the membrane [3].

In many occasions, live organisms need to defeat electrochemical gradients. This protein-catalyzed transport of solutes against the electrochemical gradient is called active

transport. Active transport needs a source of energy in order to overcome the thermodynamic forces opposing it. Two possibilities have been identified: primary pumps use chemical energy (ATP, redox potentials) to transport a solute against its electrochemical gradient. Once established, the electrochemical gradient of a solute, generated by the primary pump may be used (dissipated) to move a second solute against its own gradient; this process is known as secondary transport. In secondary transport the secondary species may move in the same (symport) or in opposite (antiport) direction as the primary species. Secondary transport may also involve the movement of a single species as a result of the electric gradient established by a primary pump (uniport) [2].

In order to analyze an organelle with a large diversity of primary and secondary pumps, we have chosen to study mitochondria. Among these, the six-transmembrane carrier family is described with emphasis on the recently reported crystal of the adenine nucleotide translocator as a structural model and on the uncoupling proteins to analyze possible mechanisms of transport.

3. Mitochondria

Mitochondria store energy in the form of a proton electrochemical gradient used to produce ATP. They are integrated by two distinct membranes, different in lipid composition [4]: The outer membrane is permeable to almost any kind of metabolites. It is poor in proteins except for the mitochondrial porin (VDAC) which is believed to channel ATP to a cytosolic enzyme [5]. Another important protein in this membrane is the translocator of the outer membrane (TOM) which participates in the insertion of proteins to the different mitochondrial compartments [6].

The inner mitochondrial membrane is a specialized membrane, rich in proteins and in cardiolipin. These characteristics produce a compact membrane with a low degree of permeability, which maintains the proton electrochemical gradient produced by the primary pumps in the respiratory chain [7-8] (For reviews on the enzymes of oxidative phosphorylation see references 9-12).

The compartment enclosed by the inner membrane is the matrix. This compartment contains all the enzymes of the Krebs cycle and β -oxidation, plus some of the enzymes of the urea cycle, porphyrin and steroid synthesis. Most of these pathways are linked to the respiratory complexes. It is worth noting that some mitochondria contain specialized pathways, e.g. in erythroid tissues, mitochondria are specialized in porphyrin synthesis [13], progesterone is chemically modified in placenta mitochondria [14], also, β -oxidation is exceptionally active in brown fat mitochondria [15].

The inner mitochondrial membrane contains a high proportion of proteins (75%). This membrane also contains highly unsaturated lipids, probably aiming to facilitate ubiquinone lateral diffusion during respiration (Table 1) [16].

Table 1. Typical fatty acid composition of mitochondrial inner membranes (modified from Colbeau et al, 1971).

Fatty acid	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	Other*
Fraction mol (%)	22	3	20	10.5	13	17.5	9

*Mainly as linolenic, arachidonic, eicosapentanoic and docosahexanoic acid.

In addition, the inner mitochondrial membrane contains a high amount of cardiolipin (CL) (Table II). CL is a biphospholipid (biphosphatidylglycerol), which has a high affinity for proteins, e.g. it is known that the adenine-nucleotide translocator and the cytochrome c oxidase require cardiolipin [16].

Table II. Typical lipid composition of inner membrane in liver mitochondria (modified from Colbeau et al, 1971).

Lipid	PC	PE	PI	Other*	CL
Fraction mol (%)	40.5	39	1.5	2	17

PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; CL, cardiolipin; PI, phosphatidylinositol; *Other lipids such as lysophosphatidylcholine and sphingomyelin.

Cardiolipin is composed by unsaturated fatty acids, mainly oleic and linoleic acid; the pairs oleic-oleic and linoleic-linoleic are the main species of cardiolipin both in the bulk of the bilayer or bound to ANT (Table III) [7]. CL is probably responsible for the basal rate of respiration (state 4) through the creation of proton "antennae" which produce a water wire in the inner membrane, allowing the translocation of protons [8].

Table III. Molecular species of cardiolipin in bovine heart mitochondria. (modified from Schlame et al, 1991).

FA pair in CL	ANT bound	Total CL
C _{18:2} - C _{18:3}	14.9	5.6
C _{18:2} - C _{18:2}	80.4	80.5
C _{18:2} - C _{18:1}	2.9	8.0
C _{18:2} - C _{16:0}	0.8	2.0
C _{18:2} - C _{18:0}	0.4	Traces
Unknown	0.7	3.9

4. Proton motive force

The exceedingly high metabolic rate of mitochondria, which can only be possible through the high concentration and activity of mitochondrial primary and secondary transporters which coordinate to use the redox energy extracted from NADH and FADH₂, produce a primary proton gradient which is used to synthesize ATP through an inverted primary pump, the F₁F₀-ATPase. In addition, other transporters need to import substrates and expel products, both for oxidative phosphorylation and for the other mitochondrial metabolic pathways. These are not the only pumps; there are also diverse secondary transporters which also use the primary proton gradient to move molecules such as phosphate and ATP across the inner mitochondrial membrane [17].

According to Mitchell's chemiosmotic theory, the proton motive force is a component of forces produced by the respiratory chain: a chemical component produced by the proton pumping mediated by the respiratory chain plus an electrical component produced by the translocation of charges in response to the proton gradient [18]. Thermodynamically, the protonmotive force represents a sum of two components: a

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = -2.3RT\Delta pH + F\Delta\psi \dots \dots \dots (6)$$

$$\left(\frac{\Delta\tilde{\mu}_{H^+}}{F}\right) = \Delta p = -\frac{2.3RT}{F}\Delta pH + \Delta\psi \dots \dots \dots (7)$$

Where Δp is the proton motive force, ΔpH is the chemical gradient of protons and $\Delta\psi$ is the transmembrane potential. The main difference between equations 6 and 7 is the unity system, for equation 6 protonmotive force is given in energy units (KJ/mol) while equation 7 is expressed in potency units (mV).

5. Mitochondrial six-transmembrane segment transport proteins

5.1. Structure

According to their physiological function, the six transmembrane segment transporters may be classified as: a) those involved in the oxidative phosphorylation process (ANC, PiC, and UCP) and b) those linked to the metabolism of carbon units (DiC, GluC, etc.) [19]. As an example of the structure of the six transmembrane helix transporters, an scheme highlighting the conserved residues in UCPs is shown in Fig. 1.

Genetic analysis indicate that there could exist between 35 and 55 protein transporters in the cell; all of them codified by nuclear genes. These carriers are inserted in the inner membrane without a leader sequence and they do not suffer posttranslational modifications. The absence of orthologous proteins in prokaryotes indicates that these carriers evolved exclusively in eukaryotes [20-21].

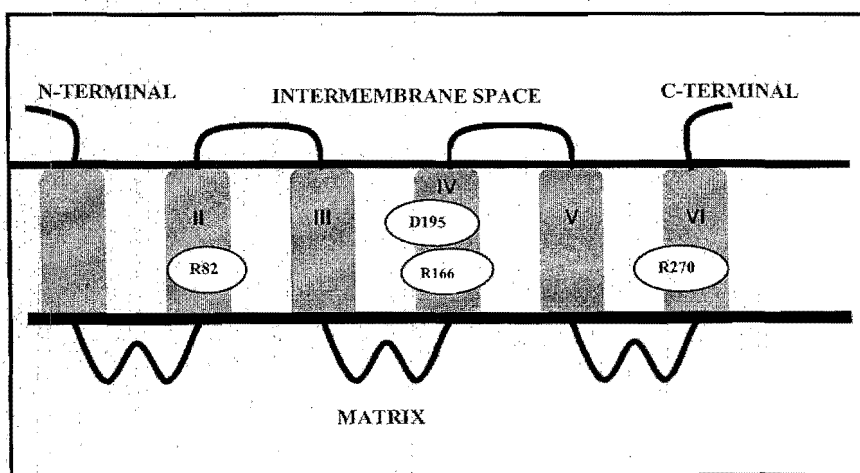


Figure 1. Uncoupling protein structure. The conserved residues along the subfamily are highlighted. Residues represent the possible aminoacids involved in purine nucleotide inhibition in the putative uncoupling protein in *Y. lipolytica*. These residues correspond to R83, R182, R276 and E190 in UCPI in brown fat mitochondria.

In these transporters, the stoichiometry between the number of translocation pores and units of six transmembrane helices (6TMHT) varies widely, e.g. in cytochrome c oxidase there are twelve helices which form three pores; the lactose transporter has one pore in twelve helices; by contrast, the mitochondrial carrier family contains one pore and only 6 helices, making the members of this family the smallest transport proteins [22]. A model of the possible structure of the UCP from *Y lipolytica* is shown to illustrate the tertiary conformation of 6TMHTs (Fig 2).

Several biophysical and biochemical studies have demonstrated that the functional 6TMHT unity is a dimer [23]. However, Bamber [24-25] demonstrated that the adenine nucleotide transporter (ANT) can function as a monomer; if this is correct, the question remains about the mechanism by which a monomer can exhibit cooperative kinetics.

The six transmembrane helix transporters derive from a structure repeated three times in tandem. Each of these structures is composed of two transmembrane helices, a matrixial loop and a small helix in the C-terminus of the loop. Each structural domain contains around 100 aminoacids. Between two domains there is a linker loop in the intermembranal space, the same as the C and N- terminus of the carrier [26] (Figs 1 and 2).



A



B

Figure 2. Tertiary structure of a possible mitochondrial uncoupling protein in *Y. lipolytica*. A) Position of the transporter inserted in the inner membrane orientated toward the intermembranal space (position a). B) 90° view of the same transporter. Modeled in Pdb Swiss model program using Adenine nucleotide translocator (ANT) as a template.

It is believed that the small matricial helices are involved in gating. The N-terminal region of the transmembrane helices 1, 3 and 5 contain the signature sequence of the mitochondrial carriers: P-X-[D/E]-X-X-[K/R] (Fig 2) [26]. The six transmembrane helix transporters have a large percentage of polar, basic and acidic residues, which result in a net positive charge. As a result of the positive charge, these proteins tend to translocate anionic molecules [19].

5.2. Induced transition fit

In the SBGP or single binding gated-pore mechanism, the substrate-transporter interaction produces conformational changes in the protein leading to opening of gates in the opposite matrix (m) side. According to Klingenberg [27-28], the transported substrate is translocated by a concerted mechanism. That is, the substrate is bound to the translocator at a cytosolic (c) side through complementary functional groups.

In regard to the induced transition fit model, the same concerted mechanism is proposed, although some variants are introduced: 1) the substrate is bound weakly to the transporter on the C side, leading to a conformational change in the protein which stabilizes binding. 2) binding stabilization leads to the transition state; at this point gates are closed. 3) the binding energy produces a third conformational change in the protein, i.e. opening of the gate at the m side and allowing the vectorial movement of metabolites. 4) The empty carrier returns to its basal state, ready to receive a second metabolite. In this process, the rate-limiting step is the return of the transporter from an m to a c state, because the activation energy for this transition is higher when the transporter is empty. This is where homodimers may have a critical role; it would not be necessary to return to the basal state if the binding site in each monomer were lying in opposite sides of the membrane; when a carrier would bind a substrate from the c side and then local conformational changes in an monomer would produce a conformational change in the other monomer, i.e. this would be a concerted mechanism.

The concerted mechanism model may also explain the difference between unidirectional (symporter and uniporter) and bidirectional (antiporter) transport. In both unidirectional mechanisms, an empty carrier in the m position has to overcome a high energetic barrier in order to return to the initial basal state. For this reason, this kind of transporter is used for small metabolites (e.g. phosphate in phosphate carrier, fatty acids in UCP, pyruvate in PyrC, glutamate in GluC) which produce a minor energetic barrier in the transition state. An antiporter mechanism would use the concerted homodimer mechanism described above.

Independently of the mechanism of transport (unidirectional or bidirectional), the same mechanism of reaction is shared: 1) A metabolite interacts with a common binding site in the centre of the carrier. 2) The metabolite then interacts with residues in helices 2, 4 and 6 at the bottom of the cavity. 3) Such interaction produces a conformational change in helices 1, 3 and 5, leading to opening of the gate (possibly the matricial helices) and to translocation of the metabolite. The binding sites depend on the kind of metabolite being translocated, e.g. all the ketoacid translocators have a consensus sequence R-[QHNT]; the aminoacid translocators present the motif R-[DE]; and the adenin nucleotide translocators contain the motif G-[IVLM]. These sequences are used to differentiate between aminoacids, ketoacids and adenin nucleotides; a second site inside the protein discriminates between different aminoacids, ketoacids or adenin

nucleotides (e.g. glutamate vs aspartate; ATP vs ADP). These sequences also explain the specificity of inhibitors (e.g., carboxyatractyloside for ANT) [29].

5.3. Inhibitors

The presence of two basal translocator conformations and a low affinity for their substrates in these basal states allows the existence of two kinds of specific inhibitors for antiporters, while there is only one in unidirectional transporters. Inhibitors exhibit a certain chemical similarity to the substrate, although they have a higher molecular weight. The inhibitor interacts with a greater surface of the protein (more contact points between protein and inhibitor), thus arriving to more stable binding and freezing of a configuration in the translocator. The interaction with the inhibitor releases the energy necessary for translocation and produces a non-physiological configuration or abortive basal state. This interaction explains why inhibitors affect only the binding of substrates to a transporter and not the transition state (where the binary complex substrate-protein exist) [27].

6. Thermodynamics of secondary transport

The mitochondrial six helix transporters are secondary translocators (their function depends on a gradient produced by a primary translocator). Therefore, substrate accumulation depends on the proton motive force produced by the respiratory chain.

The energy balance in equilibrium for the transport of a metabolite from the *cis* side of the membrane to the *trans* side coupled to proton motive force can be expressed by equation 8, this equation represents the accumulation ratio of the metabolite transported in a process dependent on the protonmotive force. (For an extensive treatment see Kramer ref. [1]):

$$\Delta G_{total} = n\Delta\mu_{H^+} + \Delta\mu_s = 0 \dots \dots \dots (8)$$

Where $\Delta\mu_{H^+}$ represents the thermodynamical expression as stated above, $\Delta\mu_s$ represents the movement of a metabolite of charge z down its electrochemical potential. Thus, if z is 1, we get Eq 9 whereas for a z different to 1 we get Eq 10: Both equations are expressed in mV:

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = -2.3RT\Delta pH + F\Delta\psi \dots \dots \dots (9)$$

$$\Delta\tilde{\mu}_s = -2.3RT \log \frac{a_i^z}{a_o^z} + zF\Delta\psi \dots \dots \dots (10)$$

Substituting equations 9-10 in equation 8 and solving for the accumulation ratio a_i^z / a_o^z we get Eq 11:

$$\log \frac{a_i^z}{a_o^z} = n\Delta pH - (n+z) \frac{\Delta\psi}{2.3RT} \dots \dots \dots (11)$$

This equation expresses the accumulation ratio for a symport mechanism coupled to the movements of n protons. For the special case where we have a uniport mechanism, $n = 0$, (Eq 12):

$$\log \frac{a_i^z}{a_0^z} = -z \frac{\Delta\psi}{2.3RT} \dots \dots \dots (12)$$

In the antiport mechanism where the initial and final states are reversed of the symport mechanism, we get by substituting equation 13 and 9 in equation 8 and again, solving for the accumulation ratio we get equation 14:

$$\Delta\mu_s = 2.3RT \log \frac{a_i^z}{a_0^z} - zF\Delta\psi \dots \dots \dots (13)$$

$$\log \frac{a_i^z}{a_0^z} = (n-z) \frac{\Delta\psi}{2.3RT} - n\Delta pH \dots \dots \dots (14)$$

For the special case of an electroneutral antiporter where $n = z$:

$$\log \frac{a_i^z}{a_0^z} = -n\Delta pH \dots \dots \dots (15)$$

In summary, both for a symport (e.g. the pyruvate carrier) or an electrophoretic antiporter mechanism (e.g. the adenine nucleotide translocator), transport are energized by both components of the proton motive force. By contrast, for a uniport mechanism (e.g. the uncoupling protein) only the membrane potential is the driving force, while for an electroneutral antiporter (e.g. the phosphate carrier, considering phosphate is exchanged for OH⁻) only the proton chemical gradient drives the accumulation ratio of phosphate.

6.1. Effect of the electric potential on the transport of charged molecules

As stated above, the proton motive force results from two components: an electric charge difference and a proton chemical gradient; of these, the electric field imposed by proton pumping is the major contributor. Membrane proteins are also influenced by the transmembranal electric field; these effects are depicted in equations 4-6. All the transport kinetic mechanisms must take into account that metabolite accumulation is regulated not only by substrates, inhibitors or regulators, but also by the membrane potential, which in fact is the larger driving force. But, how does the membrane potential produce rheogenic transitions in membrane proteins? There are two possibilities. The first, stated by Slayman and Sanders [30], establishes that an electric field may influence conformational changes without having to involve bulk movements of the protein; simply by moving the field instead of the charge. The second possibility takes into account the protein electrical properties (i.e. net charge, charged aminoacids in the well)

and could occur by 3 different mechanisms; a) the positive region in the N-terminus could orientate in the field, and then all helices would suffer conformational changes such as shortening or stretching, resulting in modifications of the transport properties of the carrier [31] or b) the uneven distribution of native saline bonds in the protein may change, c) or the loss of charge in aminoacid side-chains would modify the partition properties of helices.

6.2. Slippage and leakage

Equation 4-7 establishes the theoretical substrate accumulation ratio for a given translocator. If the metabolite is moving through a pathway different to the translocator under consideration, this is referred as leakage. Metabolites might be transported by simple diffusion through the bilayer or through another translocator. For example, the passage of protons through a pathway different to the F_1F_0 ATPase is considered a leakage pathway. Such is the case of the uncoupling proteins or the intrinsic permeability of the inner membrane.

In contrast to leakage, in slippage all transport occurs through the same translocator, except that the movement of metabolites in an antiporter is not coupled, or the accumulation ratio is dissipated because of translocator modifications such as phosphorylation, reorientation, cross linking, etc.

Both slippage and leakage diminish the efficiency of transport and could be used by the cell as a mechanism to control gradient buildups. It is important to consider that equation 4-6 represent the maximum and theoretical steady-state concentration ratio of metabolites transported in absence of leakage and slippage which have to be taken into account in a real system [33].

7. The adenine nucleotide translocator

The adenine nucleotide translocator (ANT) is the most abundant transporter in most kinds of mitochondria (the exception being brown fat mitochondria). ANT catalyzes the electrogenic translocation of ADP and ATP. It was the first mitochondrial carrier crystallized, which represented a great advance in our understanding of mitochondrial carriers, including the possible tertiary structure of all the members of the mitochondrial anionic transporter family.

ANT, the phosphate carrier and the uncoupling protein are linked to energetic processes. ANT translocates ATP/ADP by an active transport process driven by the membrane potential. The phosphate carrier cotransports phosphate and OH^- in a ΔpH dependent fashion. Uncoupling proteins are H^+ uniporters which dissipate the proton transmembrane potential but are dependent on the electrical gradient for activity.

As postulated by the SBGP model, the ANT exhibits two conformations the cytoplasmic (c) and the matrix (m) conformations: The ANT c- conformation is specific for ADP, while the m- conformation binds ATP. Also, each conformation has specific inhibitors: the c conformation is inhibited by carboxyatractyloside and atractyloside while the m conformation is sensitive to bongkreic acid. It has been proposed that both kinds of inhibitors compete for their binding sites with the substrate (nucleotides).

Adenine nucleotides have more functional groups and more flexibility than other substrates for transport proteins, thus the ANT needs to stabilize both the adenosine moiety and the phosphate groups. The ANT has a hydrophobic pocket formed by G182,

I183 and Y186, near the bottom of the well where the adenine ring interacts. The phosphate groups in ATP/ADP interact with three basic residues (K22, R79 and R279) [30]. ANT share high homology and a similar sequence pattern with a second carrier involved in phosphorylating efficiency: the uncoupling protein (UCP) [1].

8. Uncoupling proteins

Hibernating mammals possess a specialized adipose tissue characterized by its abundance of blood vessels which lend it a dark color. This is the brown fat tissue. Brown fat tissue is rich in mitochondria that become uncoupled and thus they dissipate energy as heat at the expense of ATP production [34-35].

Brown fat mitochondria contain a protonophoric protein, the Uncoupling Protein (UCP). The activity of UCP is modulated both by free fatty acids and by purin-nucleotides (specifically ATP, ADP, GDP and GTP). Fatty acids are positive modulators, while purin nucleotides are negative modulators [35-36]. In order to activate UCPS, fatty acids must have a free carboxyl with a pKa near the physiological pH. The hydrocarbon chain affects the degree of activation as a result of physicochemical effects (low solubility in water, high pKa); activation efficiency increases with the insaturation number, but there is a limit given by the length of the hydrocarbon chain. Activation strength decreases as chains grow larger than myristic acid [37].

8.1. Uncoupling protein isoforms

In humans, there are five UCP isoforms widely distributed in all kinds of tissues: UCP1 is the most abundant protein in brown fat mitochondria; UCP2 is present in skeletal muscle and kidney; UCP3 in skeletal muscle, whereas both UCP4 and BMCP (UCP5) are detected in brain mitochondria. The protonophoric mechanism is thought to be similar in all isoforms; however, their physiological function is not clear. The only isoform with a consensus function is UCP1.

UCP1 has a thermogenic role in cold-adapted animals or during hibernation. The other isoforms perhaps function as proton motive force controllers or even might be thermogenic. Supporting the thermogenic role of UCPS, there are reports showing a higher expression of mUCP2 in skeletal muscle mitochondria of cold acclimated animals. Besides, UCP1 knockout animals present obesity phenotypes, suggesting a role of UCP1 in fatty acid catabolism. As a consequence of uncoupling, there is a net diminution in reactive oxygen species (ROS) [38-39].

UCP's function as uniporters and it is not the proton but the purin nucleotide-mediated inhibition which has a cooperative behavior. When considering the induced transition fit model (ITF), it is indicated that protons are too small to produce a large conformational change in the homodimer [40-41].

8.2. Activation by fatty acids

Two mechanisms have been proposed to explain the mechanistic role of fatty acids in UCP: In the first one, proposed by Skulachev [42], ionized fatty acids are protonated in the intermembrane space and adsorbed into the inner membrane and are able to flip-flop. Once in the internal face of the inner membrane, fatty acids are ionized freeing the proton into the matrix. Then, ionized fatty acids are taken by uncoupling proteins (or

even ANT or the dicarboxylate transporter, DiC) and returned to the inner membrane outer face, where they protonate again, completing the uncoupling cycle (Fig 3A) [42].

In the second mechanism, a non-ionized fatty acid acts as a cofactor. In the carrier well there are many charged aminoacids (both acid and basic) that establish a pKa gradient that can transport a proton down a chemical potential; however, a non-ionized fatty acid acts like a bridge between the charged side-chains of these aminoacids (Fig 3B). In both models both the free carboxyl protonable group of fatty acids and a certain degree of hydrophobicity provided by the fatty acid hydrocarbon chain are a requisite for activation [43-44].

The flip-flop mechanism may be possible because fatty acids have a high pKa; this pKa is lowered when fatty acids interact with membranes, allowing fatty acid to dissolve in the membrane and perform a transmembrane movement (flip-flop), and then ionize releasing the H^+ . A second property of fatty acids explains the stronger uncoupling effect of unsaturated fatty acids compared with saturated fatty acids, namely, transmembrane movements are greater with unsaturated fatty acids, probably because the membranes that contain them become more fluid; also, unsaturated fatty acids are more acidic than saturated acids [44]. All these characteristics are in accordance with the fact that ANT, DiC and UCP uncouple mitochondria in a fatty acid-dependent way. Also, the low pKa of alkyl sulfonates renders them unable to flip-flop and thus unable to activate UCPs; however, sulfonates do inhibit fatty acids UCP activation, probably by competing for the same binding site [43].

Evidence against the flip-flop model came from the use of fatty acid analogs which cannot perform transmembrane movements and thus activate UCPs. Such is the case of ω -glucopyranoside palmitate which cannot flip-flop due to its sugar residue but nonetheless activates UCPs [45]. In addition, site-directed mutagenesis of charged aminoacids can abolish H^+ transport, which suggests that protons are transported by a pKa gradient and not by a fatty acid [46]. By contrast, a recent report by Breen [47] suggests that UCP activation could be caused by impurities or even instability of these compounds. In their hands, a hydrophilic palmitate derivative with 93% purity is not a

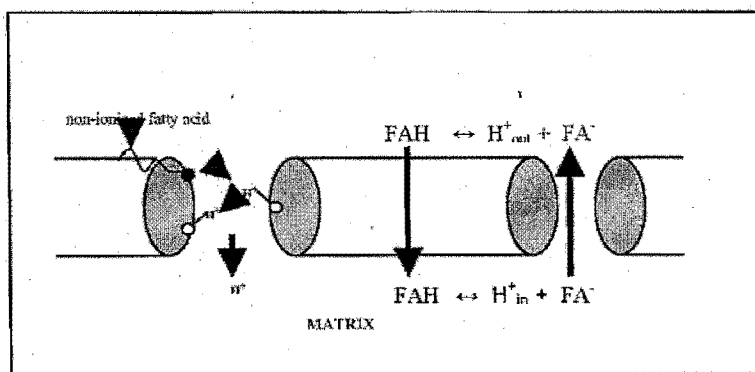


Figure 3. UCP Fatty acid-mediated activation mechanisms. A) Fatty acids as cofactors. B) Cycling (flip-flop) model. FAH and FA^- represent a protonated and a ionized fatty acid respectively.

UCP activator and is not sensitive to GDP neither in proteoliposomes nor in brown fat mitochondria [47].

In the flip-flop mechanism, an anion is transported, in accordance with a uniporter thermodynamic model in which only the electric potential is the driving force; besides, it must be borne in mind that mitochondrial carriers are thought to be anion transporters. This is not impossible, as other transporters in the family may transport other anions such as chloride, nitrate or bromide [33]. By contrast, in the model where aminoacids mediate transport, a proton is moved across the membrane, i.e. a positive charge. If the flip-flop model is correct, the thermodynamics of the process should depend on both the chemical and electrical proton gradients. However, when the pH gradient is abolished by nigericin or phosphate [51], uncoupling by fatty acids is still observed, which suggests that, rather than both proton motive components, the electrical potential is the only driving force and protons are the only transported species [35].

8.3. Inhibition by purine nucleotides

Uncoupling proteins and the ANT are the only transporters that bind purine nucleotides. Both proteins are only able to bind non-chelated nucleotides (i.e. nucleotide without Mg^{+2}), as compared with other kinds of nucleotide-binding proteins, which require magnesium. With regard to nucleotide specificity, ANTs are highly specific for adenine nucleotides, whereas UCP bind both adenine and guanine nucleotides. ADP, ATP, GDP and GTP are capable of interacting with the UCPs, while purine monophosphates are poorly bound by these proteins [48].

Mitochondrial carriers have a high amount of basic (28) and acid (19) residues inserted in the transporter well. Most arginines are inside this well, which favours the binding of purine nucleotides to a specific site within the well. This region presents four conserved aminoacids: three arginines (R83, R182, and R273) and a glutamic acid (E190). Glu acts as an interaction barrier between the three arginines and acid groups of the nucleotide as a result of the formation of saline bonds between E190 and R83. Once glutamic acid is protonated, the phosphate groups in the nucleotide are able to interact with these three arginines, producing a tight complex, where inhibition by nucleotides is more important (Fig 4). In a complex where fatty acids have modified the UCP (loose conformation) there is not a complete interaction between the nucleotide and charged residues, thus it was proposed that this interaction is pH dependent [49] (Fig. 4).

As a consequence, it was proposed that when thermogenesis (and consequently lipolysis in brown fat mitochondria) begins, a cell membrane Na^+/H^+ antiporter is activated increasing cytosolic pH [50]. This results in protonation of the Glu residue within the transporter well, lowering the affinity for the nucleotide and then allowing the entrance of a fatty acid and activating the UCP. At the end of lipolysis, the pH is decreased again (by lowering the activity of the Na^+/H^+ antiporter) and the UCP returns to the inhibited basal state. To date however, there is no clear experimental evidence of a significant lipolysis-mediated increase in pH.

The pH dependence was shown to be important in reconstituted systems, but in mitochondria UCP is activated even in absence of a pH gradient (ΔpH is collapsed by nigericin) or in externally buffered media. Thus, it is proposed that the interaction between the mitochondrial transmembrane potential and the abundant polar groups in UCP could induce a loose conformation reverting the nucleotide-mediated inhibition. As

a result, when the transmembrane potential is lowered (in state 3, or under limiting substrate), the protein would acquire the tight conformation necessary to maintain the proton motive force; then at high proton motive force (in state 4) the loose conformation would be acquired; because both ADP and ATP inhibit UCP to a similar extent, this model could explain the activation observed at high membrane potential, even in the presence of nucleotides [51] (Fig. 4)

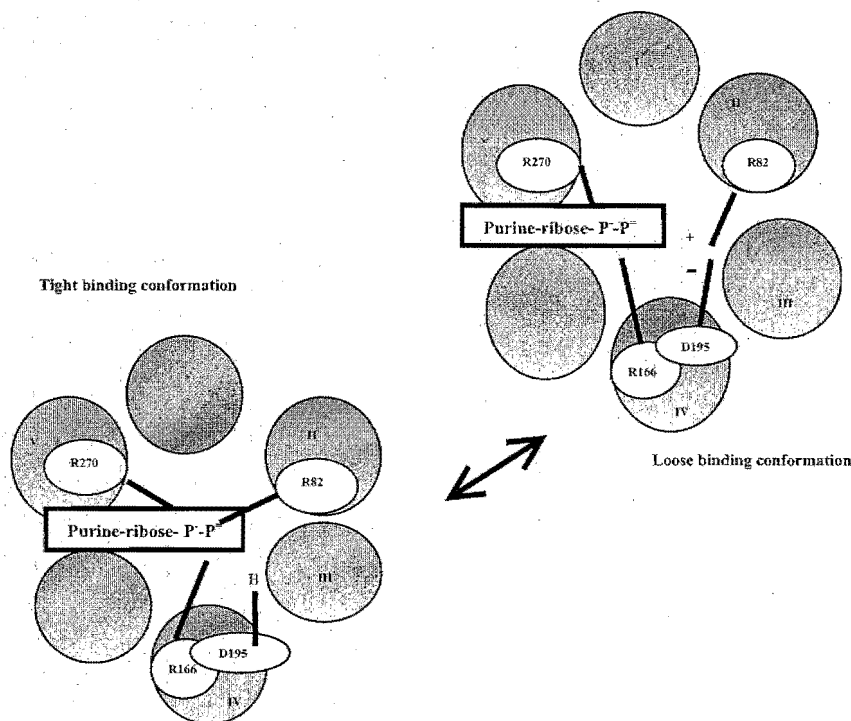


Figure 4. Inhibition mechanism by purine nucleotides. Four possible residues involved in interaction between phosphate groups and charged aminoacids of the possible uncoupling protein in *Y. lipolytica* mitochondria are shown.

8.4. Membrane potential modulation ($\Delta\psi$)

Both models of the mechanism of action of UCP and its associated fatty acid propose that UCP is a uniporter. Therefore, the transmembrane potential is the sole driving force for UCP. In the mitochondrial inner membrane, the proton leak mediated by F_0F_1 -ATP synthase-independent mechanism exhibits a non-ohmic behavior, i.e. as the membrane potential rises, the proton basal leak increases and viceversa, at low membrane potentials, inner membrane became impermeable to protons [52-53]. In other words, the relationship between proton leak and proton motive force is not lineal but hyperbolic. This behavior allows protons to permeate the inner membrane, avoiding an infinite increase in the transmembrane potential (Fig 5). As shown in figure 5, the

hyperbola may be divided in two zones; first, a low conductance zone is observed at low membrane potentials, and a second, high conductance zone is observed at high transmembrane potentials. Between these zones, there is a conductance transition zone. In mitochondria with a constitutive UCP, fatty acids decrease the values at which this conductance transition zone is observed, and as expected, purine nucleotides increase this transition.

8.5. Uncoupling proteins in non-mammalian mitochondria

For a long time, it was believed that UCP1 was a unique protein, found only in mammals. However, in the early 90's an isoform in plants named PUMP (for Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) was discovered. PUMP presents the same regulatory mechanism as UCP1. Later, four isoforms were discovered in mammalian tissues. Their physiological function is still under discussion, possibly, their role is in proton motive force control [54].

It is known that UCP1 expression increases during non-shivering thermogenesis in animals. In the same way, in some fruits, PUMP activity depends on the ripening stage. This could be a thermogenic mechanism designed to increase the metabolic rate of the fruit, and perhaps other parts of the plant. The produced heat would enable volatile compound dissemination from both, fruits and flowers.

In 2000, Vercesi's group reported the presence of a functional protein similar to UCP's in *Candida parapsilopsis* [55]. Subsequently, there were reports of this same activity in other fungi (*Aspergillus flavus* and *Candida albicans*) [56-57], in amoeboids: (*Acanthamoeba castellanii*) [58], in protozoa: (*Plasmodium berghei*) [59], and recently we have detected a possible UCP in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*.

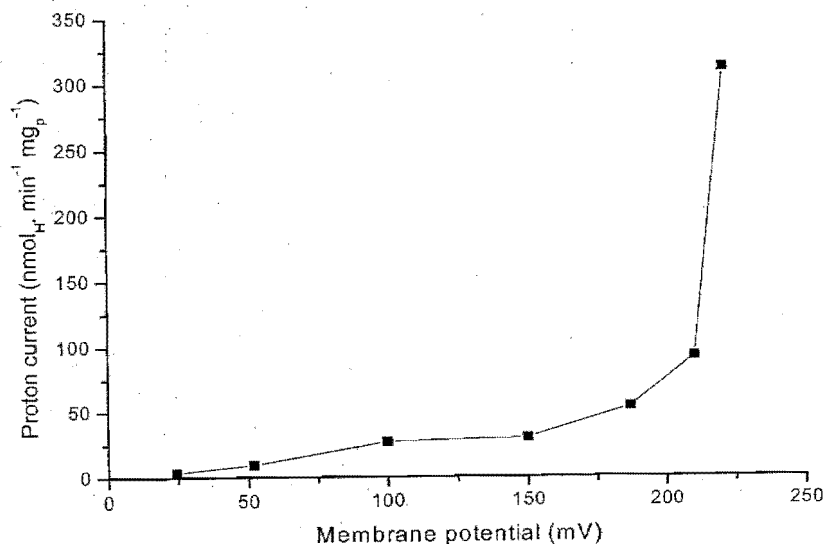


Figure 5. Proton motive force dependence on proton leak in *Yarrowia lipolytica* mitochondria.

The physiological role of non-mammalian UCP's is unknown. Jarmuszkiewicks [60] reports that *Acanthamoeba castellanii* cells grown at 4°C exhibited an increased expression level of UCP, much as happens in mammalian tissues. However, this is probably not the main function of this UCP, because the protein concentration is too low as compared to brown fat mitochondria. Also, in unicellular organisms, a thermal gradient between the cytosol and the extracellular medium is impossible to maintain. This same group suggested that the UCP in *A. castellanii* is needed to control the production of ROS. This was further suggested by the GDP-mediated increase in ROS production (Measured as peroxide) while fatty acids decreased the rate of peroxide production. Probably this modulation in ROS production could be a consequence of a control exerted by UCP on the proton motive force. Additionally, it has been proposed that ROS control is the physiological role of UCPs in lower eukaryotes when the energy charge and proton motive force are high [61].

UCPs modulate ROS production probably through a controlled uncoupling of the respiratory chain. It is known that ROS production increases at high proton motive force. ROS production is dependent of complex III, but it decreases when UCP is activated. In these conditions, UCPs produce an uncoupling which is highly regulated by $\Delta\psi$ and purine nucleotides. An interesting feature of mitochondria from organisms other than mammals is the interaction between two dissipating mechanisms: the recently characterized UCP in unicellular organisms and an alternative oxidase (AOX). This interaction is well characterized in plant mitochondria: UCP acts in a different ripening stage than AOX [62]. The sequential mechanism is mediated by fatty acids which activate UCP at the same time as they inhibit AOX, probably by competition with ubiquinol in the active site of AOX [63]; however, the mechanism of this competition is still unknown. In unicellular organisms the possible interaction of UCP and AOX is still under discussion. A recent report shows that in plants the expression level of both proteins varies with the growth stage. However, in plants the AOX activity is poorly inhibited by fatty acids, opening the possibility that UCP and AOX are simultaneously active. In our group we have seen that in mitochondria from *Yarrowia lipolytica* both UCP and AOX are present, but linoleic acid inhibits AOX while it activates UCP, suggesting that this yeast may be capable of using both energy dissipating mechanisms at different growing stages, much like plants do. In *Y. lipolytica*, fatty acids are good candidates to regulate AOX due to their high concentration in this "oleaginous" organism. Whether this is a general feature of high energy-containing cells (fruits, seeds, oleaginous yeast) is an interesting possibility [63-67].

Phylogenetically, there is no consensus on how the UCP family evolved. Comparing UCP gene sequences from the invertebrates *D. discoideum*, *D. melanogaster* y *A. castellanii*, Jezek proposed that unicellular and plant UCPs are evolutive ancestors of mammalian UCP's. In all these sequences there are conserved regions similar to the mammalian UCP4. A second possibility proposed by Sokolova is that UCP2 is the evolutive ancestor. This conclusion was drawn from comparing the five UCP isoforms to the oyster protein; however, the alignment is limited to this species, without taking into account other invertebrate or unicellular isoforms [61-62].

9. Concluding remarks

Mitochondrial six- transmembrane segments transport proteins arose from an ancestral protein from which the mitochondrial carrier family evolved. The eukaryotic cell takes these carriers as an evolutive adaptation for transport of metabolites through mitochondria. In this family, uncoupling protein 1 (UCP1) was believed to be a further adaptation for non-shivering thermogenesis. With the recent discovery of UCP1 analogs in plant and unicellular mitochondria the hypothesis of exclusive distribution in brown fat mitochondria of UCP was torn down. UCPs are broadly distributed in eukaryotic kingdoms, however, their possible function is far from being established. Maybe their real function is to control the phosphorylating efficiency, but, other possibilities are being considered (such as the thermogenic role of UCP1), representing an unresolved paradigm in bioenergetics.

References

1. Kramer, W.A., Knaff, D.B., (1991). "Energy Transduction in biological membranes". Springer-Verlag, pp: 78-86, 120-123.
2. Saier, M.H. (2000) *Microbiol & Molec Biol Rev.* **64** (2), 354.
3. Van Winkle, L.J.(1995) "*Biomembrane Transport*" Academic Press, Orlando Fl. pp.45-49.
4. Nicholls, D., Ferguson, S.J. (1992) "Bioenergetics 3" Academic Press, Orlando Fl. pp. 7-8.
5. Shoshan-Barmatz, V., Israelson A., Brdiczka D., Sheu SS. (2006) *Curr Pharm.***12**(18),2249.
6. Brdiczka, D. *Biochim Biophys Acta.* (1994);**1187**(2),264.
7. Schlame, M., Beyer, K., Hayer-Hartl, M., Klingenberg, M. (1991) *Eur. J. Biochem.* **199**, 459.
8. Hoch, F.L. J. (1998) *J. Bioenerg Biomembr.*, **30** (6), 511.
9. Ostermeier C, Iwata S, Michel H. (1996) *FEMS Microbiol Rev.***18**(2-3):173.
10. Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM. (2001) *Biochim Biophys Acta*;**1504**(2-3):179.
11. Schafer G, Pürschke W, Schmidt CL. (1996) *FEMS Microbiol Rev.*;**18**(2-3):173.
12. Kadenbach B, Schneyder B, Mell O, Stroh S, Reimann A. (1991),*Rev Neurol (Paris)*;**147** (6-7):436.
13. Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD. (2006) *Nature*; **443**(7111):586.
14. Tuckey RC. (2005)*Placenta*; **26**(4):273.
15. Rafael J. (1978) *Experientia Suppl.*;**32**:75
16. Colbeau A, Nachbaur J, Vignais PM. (1971) *Biochim Biophys Acta*; **249**(2):462.
17. Mitchell P, Moyle J. (1967) *Nature*; **213**(5072):137
18. Mitchell P, Moyle J. *Nature.* 1965;**208**(5016):1205.
19. Heinrich Aquila, H., Link, T.A. Klingenberg, M.(1987) *FEBS lett.* **212**,(1), 1.
20. Zimmermann, R., Pahrch, U., Sprinzi, M., Neupert, W. (1978) *Eur. J. Biochem.* **99**, 247.
21. Hackenberg, H., Riccio, P. Klingenberg, M.(1978) *Eur. J. Biochem.* **88**, 373.
22. West, I. (1997) *Biochim Biophys Acta*;**1331**,213.
23. Trezeguet V, Le Saux A, David C, Gourdet C, Fiore C, Dianoux A, Brandolin G, Lauquin GJ.(2000) *Biochim Biophys Acta*;**1457**(1-2):81
24. Bamber L, Harding M, Monne M, Slotboom DJ, Kunji ER. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA*; **104**(26):10830.
25. Bamber L, Slotboom DJ, Kunji ER. (2007) *J Mol Biol.* ;**371**(2):388-95.
26. Kunji, E.R.S (2004) *FEBS lett.*; **564**:239.
27. Klingenberg, M. (2005) *Biochemistry*; **44**(24):8563.
28. Klingenberg, M. (2007) *Biochimie*; *In press*.
29. Robinson, A.J., Kunji, E.R.S (2006) *Proc Natl Acad Sci USA*; **103**(8):2617.
30. Slayman C.L., Sanders, D. (1985) *Biochem. Soc. Symp.* ;**50**: 11.

31. Robinson, C.R. Sligar, S.G. (1993) *Protein Sci.* ; 2 : 826
32. Stein, W.D. (1990) « Channels, carriers and pumps » Academic Press, Orlando Fl.pp. 180.
33. Nicholls D.G., (1976) *Eur. J. Biochem.* 62: 223
34. Lin C.S., Klingenberg, M.(1980) *FEBS Lett.* ;113: 299
35. Rial, E., A. Poustie and D.G. Nicholls (1983) *Eur. J. Biochem.* 137: 197.
36. Locke, R.M., Rial,E, Nicholls, D.G (1982) *Eur. J. Biochem.* 129: 381.
37. Winkler E., Klingenberg, M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:2508.
38. Riquier. D (2005) *Proc.Nutr. Soc.*; 64(1):47.
39. Krauss, S., Zhang C.Y., Lowell, B.B. (2005) *Nat. Rev. Mol Cell Biol* ;6(3):248.
40. Palmieri, F., Bisaccia, F., Iacobazzi, V., Indiveri, C., Zara, V. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1101: 223.
41. Klingenberg, M. (1993). *J Bioener Biomembr*; 25(5): 447.
42. Skulachev, V.P., (1991) *FEBS Lett.* 294, 158
43. Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Bouillaud, F., Nicholls, D.G., Rial, E. (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 15528.
44. Rial, E., Aguirregoitia, E., Jimenez-Jimenez, J., Ledesma, A., (2004), *Biochim Biophys Acta*, 1608, 122.
45. Hamilton, J.A., (1998), *J. Lip. Res.* 39, 467.
46. Kozak, L.P., Britton J.H., Kozak U.C., Wells J.M., (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 12274
47. Breen EP, Gouin SG, Murphy AF, Haines LR, Jackson AM, Pearson TW, Murphy PV, Porter RK. (2006) *J Biol Chem.*; 281(4):2114.
48. Huang S.G., Klingenberg, M., *Biochemistry*, (1995), 34, 349.
49. Klingenberg, M., Huang, S.G., (1999) *Biochim Biophys Acta.*; 1415 (2):271.
50. Chinet A, Friedli C, Seydoux J, Girardier L. (1978) *Experientia Suppl.*; 32: 25.
51. Nicholls. D.G., (1997) *Bioscience Reports*, 17(3), 251.
52. Winkler, E., Klingenberg, M., (1992) *Eur. J. Biochem.* 207, 135.
53. Vercési, A.E., Borecký, J., Godoy Maia, I., Arruda, P., Midea Cuccovia, I., Chaimovich, H. (2006) *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:383.
54. Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A., Sluse, F., Vercesi, A., (2000) *FEBS Letters* 467, 145
55. Tudella, V., Curti, C., Soriani, F., Santos, A., Uyemura, S., (2003) *Int. J. Biochem & Cell Biol.* 36: 162.
57. Cavalleiro, R.A., Fortes, F., Borecký, J., Faustinoni, V.C., Schreiber, A.Z., Vercesi, A.E. (2004) *Braz J. Med Biol Res* 37: 1455.
58. Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, c., Hryniewiecka, L., Sluse, F., (1999) *J. Biol Chem.* 274(33), 23198.
59. Uyemura, S., Luo, S., Moreno, S., Docampo, R., (2000), *J. Biol Chem* 275(13), 9709.
60. Jarmuszkiewicz, W., Antos, N., Swida, A., Czarna, M., Sluse, F.E., (2004), *FEBS Lett.* 569: 178.
61. Czarna, M., Jarmuszkiewicz, W., (2005) *FEBS Lett.* 579: 3136.
62. Sokólova, I.M., Sokolov, E.P., (2005) *FEBS lett.* ; 579(2):313.
63. Hanak, P., Jezek, P., (2001) *FEBS lett*; 495(3):137.
64. Ito K., Seymour R. S., (2005) *Biol Lett.*; 1(4):427.
65. Almeida A.M, Navet R, Jarmuszkiewicz W, Vercesi AE, Sluse-Goffart C.M, Sluse F.E., (2002) *J. Bioenerg Biomembr.*; 34(6): 487.
66. Hourton-Cabassa C, Mesneau A, Miroux B, Roussaux J, Ricquier D, Zachowski A, Moreau F., (2002); *J Biol Chem.*; 277(44):41533.
67. Kay, C.J., Palmer, J.M., *Biochem J.* (1985); 228(2):309
68. Sluse, F.E., Almeida, A.M., Jarmuszkiewicz, W, Vercesi, A.E., (1998) *FEBS Lett.* 433(3): 237.

Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?)

Alfredo Cabrera-Orefice · Sergio Guerrero-Castillo ·
Luis A. Luévano-Martínez · Antonio Peña ·
Salvador Uribe-Carvajal

Received: 3 September 2009 / Accepted: 4 December 2009 / Published online: 21 January 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract The yeast *Debaryomyces hansenii* is considered a marine organism. Sea water contains 0.6 M Na⁺ and 10 mM K⁺; these cations permeate into the cytoplasm of *D. hansenii* where proteins and organelles have to adapt to high salt concentrations. The effect of high concentrations of monovalent and divalent cations on isolated mitochondria from *D. hansenii* was explored. As in *S. cerevisiae*, these mitochondria underwent a phosphate-sensitive permeability transition (PT) which was inhibited by Ca²⁺ or Mg²⁺. However, *D. hansenii* mitochondria require higher phosphate concentrations to inhibit PT. In regard to K⁺ and Na⁺, and at variance with mitochondria from all other sources known, these monovalent cations promoted closure of the putative mitochondrial unspecific channel. This was evidenced by the K⁺/Na⁺-promoted increase in: respiratory control, transmembrane potential and synthesis of ATP. PT was equally sensitive to either Na⁺ or K⁺. In the presence of propyl-gallate PT was still observed while in the presence of cyanide the alternative pathway was not active enough to

generate a $\Delta\Psi$ due to a low AOX activity. In *D. hansenii* mitochondria K⁺ and Na⁺ optimize oxidative phosphorylation, providing an explanation for the higher growth efficiency in saline environments exhibited by this yeast.

Keywords Branched respiratory chain · Divalent cations · Monovalent cations · *Debaryomyces hansenii* · Isolated mitochondria · Permeability transition

Introduction

Debaryomyces hansenii is normally found among the microorganisms populating sea waters and other habitats with low water activity where its halotolerance is an advantage (Norkrans 1966; Norkrans and Kylin 1969). This yeast has found diverse biotechnological applications in recent years, such as production of dairy products and of lytic enzymes of commercial interest (Breuer and Harms 2006). In cheese manufacturing, *D. hansenii* is a choice for starter cultures as it catalyzes proteolysis and lipolysis without fermenting sugars (Fadda et al. 2004). This yeast is also attractive for study due to its ability to grow under extreme conditions such as very low temperatures (Norkrans 1966), widely different pHs (Norkrans 1966; Hobot and Jennings 1981) and high salt concentrations (Norkrans 1966, Norkrans and Kylin 1969; Prista et al. 2005; Ramos 2006). The genome of *D. hansenii* was reported by the génolevure project (Sherman et al. 2004).

At least part of the halotolerance of *D. hansenii* may be due to its potent monovalent cation transporters, present both in the plasma membrane (Hobot and Jennings 1981; Prista et al. 1997; Thomé-Ortiz et al. 1998) and in the vacuole (Montiel and Ramos 2007). However, its proteins and enzymes have to be resistant to salts, because in the

A. Cabrera-Orefice · S. Guerrero-Castillo ·
L. A. Luévano-Martínez · S. Uribe-Carvajal
Department of Biochemistry, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico City, México

A. Peña
Department of Molecular Genetics, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico City, México

S. Uribe-Carvajal (✉)
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal 70-242, Ciudad Universitaria, Coyoacán,
Mexico City, Mexico
e-mail: suribe@ifc.unam.mx

presence of high (0.5–1.0 M) external NaCl the cytoplasmic concentrations of monovalent cations (Na^+ and K^+) reach the hundred mM range (González-Hernández et al. 2004). Given the choice, *D. hansenii* accumulates KCl instead of NaCl (Norkrans and Kylin 1969; Thomé-Ortiz et al. 1998) but both cations seem to have the same effects on *D. hansenii*, e.g. the expression of NADP-glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase is modified by either Na^+ or K^+ ; this regulation has not been observed in *Saccharomyces cerevisiae* (Alba-Lois et al. 2004). The Na^+/K^+ effect provides an explanation for the increase in biomass obtained when *D. hansenii* is grown in the presence of high salt concentrations (Prista et al. 1997) and fuels the notion that *D. hansenii* is halophilic and not just osmotolerant (González-Hernández et al. 2004).

In the cytoplasm of *D. hansenii*, enzymes are not the only structures exposed to high salts. Organelles also have to deal with concentrations around 0.4 M NaCl/KCl (Neves et al. 1997; González-Hernández et al. 2004). Thus, it would be interesting to analyze the physiology and salt adaptability of each organelle. To do this, we decided to characterize the effect of high salt concentrations on the isolated mitochondria from *D. hansenii*. We theorized that the mitochondrial adaptation to high salt concentrations would have to include strict regulation of cation permeability; otherwise, an electrophoretic cycling of the monovalent cation across the inner mitochondrial membrane would result in the depletion of the transmembrane potential ($\Delta\Psi$) and in uncoupling (Garlid 1988). Indeed, in mitochondria isolated from the yeast *S. cerevisiae* addition of increasing concentrations of K^+ or Na^+ in the presence of low phosphate results in depletion of the $\Delta\Psi$ and a decrease in the synthesis of ATP (Castrejón et al. 1997). By contrast, at high phosphate concentrations monovalent cations do not affect the $\Delta\Psi$, and in these conditions a Mg^{2+} - and quinine-sensitive uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ is observed (Castrejón et al. 2002).

The permeability transition (PT) occurs when a large mitochondrial unspecific channel (MUC) opens in the inner mitochondrial membrane allowing ions to flow freely into and out from the matrix depleting chemical and electrical gradients (Bernardi et al. 1994; Zoratti and Szabo 1995). The most studied MUCs are those from mammals and from *S. cerevisiae* (Manon et al. 1998). The mammalian MUC is open by Ca^{2+} in the presence of high phosphate and is closed by ATP and the cyclophilin-D inhibitor cyclosporine-A (Halestrap and Davidson 1990). In *S. cerevisiae* mitochondria, both phosphate (Guérin et al. 1994) and Ca^{2+} (Pérez-Vázquez et al. 2003) prevent the PT. Thus, it was of interest to determine whether Ca^{2+} opens or closes the *D. hansenii* MUC. The structure, properties and regulating factors of the MUCs vary between different species (Pavlovskaya et al. 2007; Brustovetsky et

al. 2002; Kusano et al. 2009). However, an organelle normally exposed to high monovalent cation concentrations should be able to block its own conductance to the salts found in high concentrations.

The mitochondria from at least two salinity-adapted yeast species, *Endomyces magnusii* and *Yarrowia lipolytica*, do not seem to undergo PT unless a high concentration of Ca^{2+} plus the Ca^{2+} ionophore ETH129 are added (Deryabina et al. 2004; Kovaleva et al. 2009).

We characterized the PT in isolated mitochondria from *D. hansenii*. We detected a MUC which exhibits a sensitivity to Ca^{2+} and Mg^{2+} which was similar to the *S. cerevisiae* channel. Also, the *D. hansenii* MUC was closed by phosphate, although at higher concentrations than the *S. cerevisiae* channel. In addition, we observed that this channel was different to the MUCs from *S. cerevisiae*, plants or mammals, in that it was regulated by monovalent cations, i.e. increasing concentrations of Na^+ or K^+ closed the *D. hansenii* mitochondrial channel. It is becoming increasingly evident that the physiological role and the control mechanisms of mitochondrial unspecific channels may be different depending of the species under study.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals were reagent grade. Sorbitol, Trizma[®] base, maleic acid, pyruvic acid, malic acid, NADH, NADP, antifoam emulsion, ADP, safranin-O, hexokinase and bovine serum albumin (BSA) type V were from Sigma Chem Co. (St Louis, MO). Lyophilized glucose-6-phosphate dehydrogenase was from Boehringer-Mannheim.

Yeast strains The yeast *Debaryomyces hansenii* strain Y7426 (US Dept. of Agriculture) was used throughout this work. The strain was maintained in Na-YPGal (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% galactose, 1 M NaCl and 2% bacto-agar) plate cultures.

Yeast growth media for mitochondrial isolation

Cells were grown as follows: three 100 mL pre-cultures were prepared immersing a loop of yeast into 100 mL of Na-YPLac (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% lactate, pH 5.5 adjusted with NaOH plus NaCl to reach a final 0.6 M Na^+ concentration). Antifoam emulsion 50 $\mu\text{L}/\text{L}$ was added to the medium. Flasks were incubated for 36 hours under continuous agitation in an orbital shaker at 250 rpm in a constant-temperature room (30°C). Then,

each 100 mL flask was used to inoculate 750 mL of fresh medium. Incubation was continued for 24 h under the same conditions. At a final optical density of 1.6–2.0, the culture was in the mid to late logarithmic growth phase; the cells were harvested at this stage, before they became resistant to disruption.

Isolation of coupled mitochondria from *Debaryomyces hansenii*

D. hansenii cells were collected and washed by centrifugation and suspended in distilled water. After a second centrifugation, the cells were suspended in ice-cold isolating medium containing 1 M sorbitol, 10 mM maleate, 0.2% bovine serum albumin, pH 6.8 (Tris). The cells were poured into a Bead-Beater 300 mL flask containing 70% v/v 0.5-mm-diameter glass beads. The container was introduced in an ice-jacketed chamber and cells were subjected to four 20 s pulses at 2 min intervals. After homogenization, mitochondria were isolated by differential centrifugation following a protocol described for *S. cerevisiae* mitochondria (Peña et al. 1977). The final mitochondrial pellet was resuspended in 500 μ L ice-cold isolation medium.

Some details on the isolation of mitochondria seem pertinent as the procedure is slightly different to the usual procedures (Uribe et al. 1985). Sorbitol was deionized before use (Averet et al. 1998). Osmolarity was 1 OsM; lower osmolarities resulted in uncoupled mitochondria. The same osmolarity was used during all experiments. We did not use zymolyase and/or lyticase to disrupt the membrane due to the rapid inactivation of mitochondria that ensues during the isolation procedure. Instead, we used a Bead-Beater with a large amount (70% v/v) of glass beads. The speed of the Bead-Beater was maintained at half maximum by means of a rheostat, to avoid disruption and uncoupling of mitochondria.

Protein quantification

The concentration of mitochondrial protein was determined by the biuret method (Gornal et al. 1949). Optical absorbance was determined at 540 nm in a Beckman DU-50 spectrophotometer. Protein was determined using BSA as a standard.

Oxygen consumption

The rate of oxygen consumption was measured in the resting state (State IV) and in the phosphorylating state (State III), using an YSI-5300 Oxygraph equipped with a Clark-Type electrode (Yellow Springs Instruments Inc. OH) interfaced to a chart recorder. The reaction vessel was a water-jacketed chamber maintained at 30°C. Mitochondria,

0.5 mg protein·(mL)⁻¹. The reaction mixture was 1 M sorbitol, 10 mM maleate, pH 6.8 (Tris); 10 mM pyruvate-malate was added as a substrate. Final volume was 1.5 mL. The concentrations of phosphate (Pi) and K⁺ used are indicated in the legends of each illustration. Stock solutions were 2 M KCl or NaCl and 1 or 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 (Tris).

Transmembrane potential ($\Delta\Psi$)

The transmembrane potential was determined using safranin-O, following the absorbance changes at 511–533 nm in a DW2000 Aminco spectrophotometer in dual-wavelength mode (Akerman and Wikström 1976). We used a final concentration of 0.5 mg protein/mL of mitochondria. Yeast mitochondria were assayed in the respiration medium plus 10 μ M safranin-O. The concentrations of K⁺ and Pi are indicated under each figure. Where indicated, the uncoupler *p*-chloromethoxycarbonylcyamide phenylhydrazone (CCCP) was added to a final concentration of 5 μ M.

ATP synthesis

An enzyme-coupled assay system containing 162.5 μ g/mL hexokinase, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM glucose, 1.4 mM NADP⁺, 200 μ M MgCl₂ and 10 mM pyruvate-malate, was used to measure the rate of ATP synthesis. The reaction was started by adding 200 μ M ADP. The reduction of NADP⁺ was followed in a DW2C Aminco/Olis spectrophotometer in dual mode at 340–390 nm (Cortés et al. 2000). The NADPH extinction coefficient used was 6.22×10^3 (M·cm)⁻¹. The lyophilized enzymes were suspended prior to each experiment as follows: hexokinase was suspended in water to 13 mg/mL and glucose-6-phosphate dehydrogenase was suspended in a 5 mM citrate buffer pH 7 to a final concentration of 200 U/mL. Oligomycin (10 μ g/mg prot) was used to determine the basal ATP synthesis; which was subtracted from the experimental data. The concentrations of Pi are indicated in the legend to the figure.

Results and discussion

In *D. hansenii* mitochondria oxygen consumption is coupled by phosphate and by monovalent cations

In all cases, the isolated mitochondria from *D. hansenii* exhibited the same sensitivity to KCl or NaCl. Thus, we are presenting mainly the results obtained with KCl. We chose to show the K⁺ effect because in the presence of both cations *D. hansenii* prefers to concentrate K⁺; faster and with more affinity than Na⁺ (Thomé-Ortiz et al. 1998; González-Hernández et al. 2004). The isolated mitochon-

dria from *D. hansenii* exhibited a slow rate of oxygen consumption both in state IV and in state III, suggesting that the respiratory chain needed the presence of a monovalent cation in order to work at full speed (Table 1). The role of K^+ as an activator of the respiratory chain of mitochondria from yeast (Uribe et al. 1991) and mammals (Peña et al. 1964; Gómez-Puyou et al. 1969; Gómez-Puyou and Tuena de Gómez Puyou 1977) has been described. The respiratory control (RC) is a measure of the 'integrity' of mitochondria preparation and coupling efficiency between the respiratory chain and the F_1F_0 -ATP synthase (Nicholls and Ferguson 2001). In *D. hansenii* it was observed that at 0.4 mM Pi mitochondria were uncoupled as evidenced by a RC of 1.0 (Table 1). Then, addition of different concentrations of K^+ led to higher rates of oxygen consumption and to an increased RC (Table 1) as follows: At 0 to 20 mM K^+ , RC was 1.0. However, at 50 mM K^+ RC was 1.33 and increased to 1.73 at the maximum K^+ concentration tested (75 mM) (Table 1). When the phosphate concentration was raised to 4.0 mM, the rates of oxygen consumption were higher (Table 1) and a RC of 1.27 was observed in the absence of K^+ (Table 1). Then, as different K^+ concentrations were added, the RC increased such that at 75 mM K^+ , RC=2.29 (Table 1). In the presence of 10 mM Pi, the rates of oxygen consumption were similar to those obtained at 4 mM Pi (Table 1) and the RC was 2.14 in the absence of K^+ , and increased only slightly at the K^+ concentrations tested (Table 1), i.e. 10 mM Pi closed the channel without K^+ . Even though Pi has the same coupling effect in *D. hansenii* mitochondria as in those from *S. cerevisiae* (Manon and Guérin 1997), the *D. hansenii* organelles need ten times more Pi to close the unspecific channel. In isolated mitochondria from *S. cerevisiae* (Gutiérrez-Aguilar et al. 2010) or mammals (Leung and Halestrap 2008) the Pi site has been located in the inner membrane and it has been tentatively identified as the phosphate carrier.

In *D. hansenii* mitochondria, opening of a Pi/K^+ -sensitive unspecific channel results in depletion of the transmembrane potential ($\Delta\Psi$)

The oxygen consumption data suggested that there is a MUC in *D. hansenii*. Another yeast species, *S. cerevisiae* contains a MUC which is closed by 1–2 mM phosphate (Manon and Guérin 1997). Thus, in order to further explore the sensitivity of the putative MUC from *D. hansenii* mitochondria to Pi, the electric transmembrane potential ($\Delta\Psi$) was measured in the presence of 0.4, 4.0 and 10 mM Pi (Fig. 1). At 0.4 mM Pi, the $\Delta\Psi$ was low and unstable (Fig. 1a, trace a). Then in the presence of 4.0 mM Pi the $\Delta\Psi$ became higher and gained stability (Fig. 1b, trace a) and it reached a high, stable $\Delta\Psi$ at 10 mM Pi (Fig. 1c, trace a) or higher (Result not shown). These results suggested that *D. hansenii* contain a permeability transition pore similar to that observed in *S. cerevisiae* mitochondria, although the organelle from *D. hansenii* requires a higher Pi concentration to close. The oxygen consumption effects reported in Table 1 also suggested that Pi and monovalent cations exhibit synergistic effects. Thus, to further explore the monovalent cation effect, the $\Delta\Psi$ was measured at each of the Pi concentrations tested and in the presence of increasing K^+ . At 0.4 mM Pi where the $\Delta\Psi$ was unstable, increasing concentrations of K^+ resulted in higher, more stable $\Delta\Psi$, indicating that at the low Pi concentrations the monovalent cation aided to seal the unspecific channel (Fig. 1a, traces b to e). At 4 mM Pi, the $\Delta\Psi$ was low in the absence of K^+ and increased with K^+ concentrations. This result probably indicates that Pi was able to partially close the channel, although K^+ was still needed to achieve full closure (Fig. 1b). At 10 mM Pi, the highest concentration tested, MUC was completely closed and the monovalent cation did not have further effects (Fig. 1c).

Table 1 Effect of phosphate (Pi) and K^+ on the rate of oxygen consumption and respiratory control of isolated mitochondria from *Debaryomyces hansenii*

[K^+] (mM)	0.4 mM Pi			4.0 mM Pi			10.0 mM Pi		
	IV	III	RC	IV	III	RC	IV	III	RC
0	75±6	75.0±6	1.0	130±9	165±8	1.27	129±6	277±9	2.14
10	79±3	79.0±3	1.0	127±10	191±13	1.51	127±6	273±14	2.16
20	79±3	79.0±3	1.0	128±8	220±16	1.72	129±6	281±12	2.18
50	127±3	168±5	1.33	122±6	249±4	2.05	124±5	285±3	2.31
75	127±3	219±1	1.73	114±9	261±9	2.29	131±7	293±5	2.24

The rates of oxygen consumption in resting state (IV) and phosphorylating state (III) are expressed in $\text{natgO}_2(\text{min}\cdot\text{mg prot})^{-1}$. The respiratory control (RC) is the III/IV quotient. Reaction mixture: 1 M sorbitol, 10 mM maleate, pH 6.8 (Tris). The substrate was always 10 mM pyruvate-malate. Three different phosphate (Pi) concentrations and five different KCl concentrations were used as indicated. State III was initiated by adding 500 μM ADP. Mitochondria 0.5 mg prot·(mL) $^{-1}$. Temp 30°C, final vol 1.5 mL. Data from 3 different experiments.

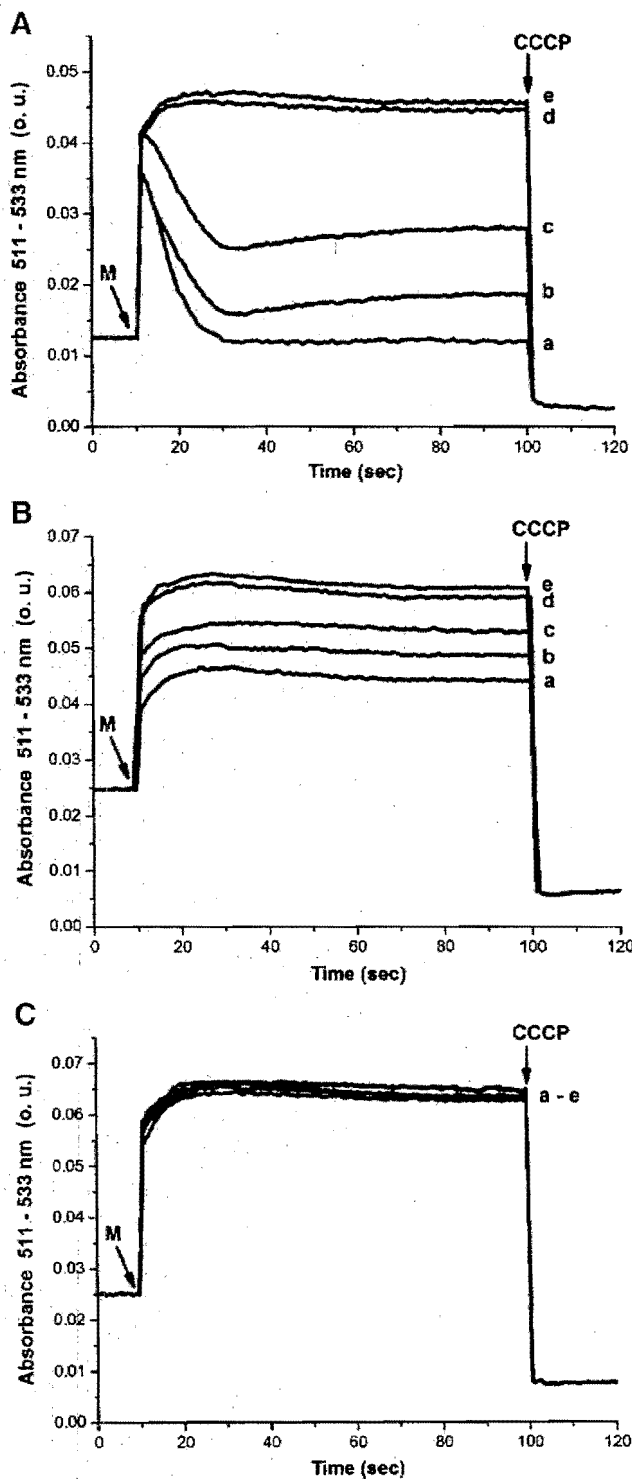


Fig. 1 Effect of K^+ and phosphate on the transmembrane potential ($\Delta\Psi$) of isolated mitochondria from *D. hansenii*. Reaction mixture as in Table 1 except $10\mu\text{M}$ safranine-O was added. Final vol. 2 mL; room temperature. P_i concentrations were A 0.4 mM; B 4.0 mM and C 10.0 mM. K^+ concentrations were: a, 0; b, 10 mM; c, 20 mM; d, 50 mM; e, 75 mM. Where indicated, mitochondria (M) $0.5\text{ mg prot (ml)}^{-1}$ and CCCP $5\mu\text{M}$ were added. Representative traces from three independent experiments

The $\Delta\Psi$ sensitivity to monovalent cations does not discriminate between Na^+ or K^+

The possibility that K^+ or Na^+ exhibited different effects was explored by measuring the $\Delta\Psi$ in the presence of three different cation concentrations and in the presence of 0.4 mM P_i . In the absence of cations (Fig. 2 trace a), no increase in $\Delta\Psi$ was observed. In the presence of 18.75 mM Na^+ (Fig. 2 trace b) or K^+ (Fig. 2 trace c), a partial $\Delta\Psi$ was observed. Then, at 37.5 mM monovalent cation, the $\Delta\Psi$ increased to a higher extent regardless of whether the cation was Na^+ (Fig. 2 trace d), K^+ (Fig. 2 trace e), or a mixture of 18.75 mM Na^+ plus 18.75 mM K^+ (Fig. 2 trace f). At 75 mM monovalent cation, a still higher $\Delta\Psi$ was obtained, which again was the same regardless of whether the cation was Na^+ (Fig. 2 trace g), K^+ (Fig. 2 trace h) or a mixture of 37.5 mM Na^+ plus 37.5 mM K^+ (Fig. 2 trace i). Thus, the opening of the MUC seemed to be equally sensitive to Na^+ or to K^+ .

The mitochondrial permeability transition results in decreased synthesis of ATP

In *D. hansenii* mitochondria, PT was triggered by lowering P_i or K^+ and resulted in lower CR and decreased $\Delta\Psi$, leading us to propose that oxidative phosphorylation might be optimized in the presence of increasing concentrations of P_i and K^+ . When we tested the synthesis of ATP at three different P_i concentrations and in the presence of different concentrations of K^+ , we observed that the rate of synthesis

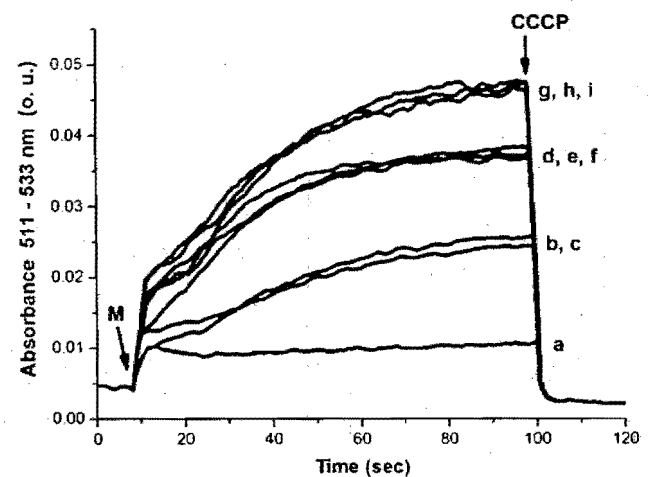


Fig. 2 Effect of Na^+ and K^+ mixtures on the transmembrane potential ($\Delta\Psi$) of isolated mitochondria from *D. hansenii*. Reaction mixture as in Fig. 1. Final volume 2 mL; room temperature. 0.4 mM P_i . Na^+ and/or K^+ concentrations were: a, 0; b, 18.75 mM Na^+ ; c, 18.75 mM K^+ ; d, 37.5 mM Na^+ ; 18.75 mM Na^+ plus 18.75 mM K^+ ; e, f, 37.5 mM K^+ ; g, 37.5 mM Na^+ plus 37.5 mM K^+ ; h, 75 mM Na^+ ; i, 75 mM K^+ . Where indicated, mitochondria (M) $0.5\text{ mg prot (ml)}^{-1}$ and CCCP $5\mu\text{M}$ were added. Representative traces from three independent experiments

of ATP increased proportionally to Pi and/or K^+ , i.e. at 0.4 mM Pi a slow rate of ATP synthesis was observed which increased as the K^+ concentration was raised (Fig. 3). At 4 mM Pi higher rates of ATP synthesis were obtained and a slight optimization of this rate by K^+ was still observed (Fig 3). At the highest concentration of Pi tested, a high rate of synthesis of ATP was observed which was not further increased by the presence of different concentrations of K^+ . Thus, the effect on the synthesis of ATP provide further support to the notion that there is an unspecific channel in *D. hanseni* mitochondria which is closed by high concentrations of Pi and by intermediate concentrations of monovalent cations.

The *D. hanseni* MUC is regulated by Ca^{2+} and by Mg^{2+}

Divalent cations modulate the opening of the MUC from different species. However, the effects are opposite as in mammals Ca^{2+} opens the MUC (Halestrap and Davidson 1990) while in *S. cerevisiae* Ca^{2+} closes the MUC (Pérez-Vázquez et al. 2003) probably acting at the level of the porine (Gutiérrez-Aguilar et al. 2007). By contrast, Mg^{2+} seems to close all known MUCs (Bernardi 1999; Kowaltowski et al. 1998; Pérez-Vázquez et al. 2003). Thus, we decided to characterize the effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the $\Delta\Psi$ in the presence of 0.4 mM Pi. In the absence of cations (Fig. 4a trace a; Fig. 4b trace a), a low $\Delta\Psi$ was observed. In the presence of increasing Ca^{2+} concentrations, $\Delta\Psi$ increased (Fig. 4a traces a-f); reaching a maximum at 1 mM Ca^{2+} . [Ca^{2+}] above 1 mM did not promote further changes in $\Delta\Psi$ (data not shown). In regard

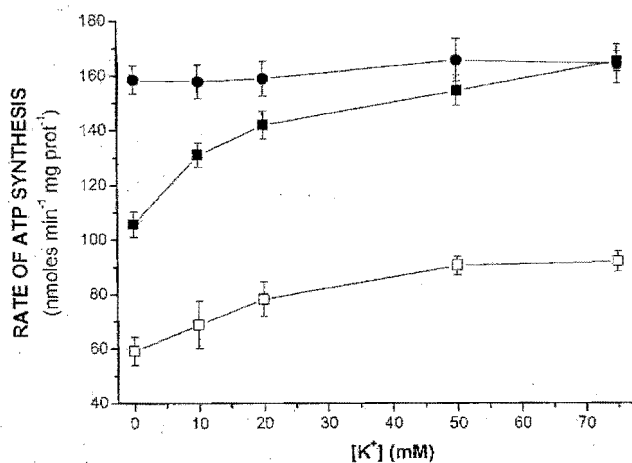


Fig. 3 Effect of K^+ and phosphate on the rate of ATP synthesis mediated by isolated mitochondria from *D. hanseni*. Experimental conditions as in Table 1, 200 μ M ADP. In addition, an enzyme coupled ATP assay system was included: 200 μ M $MgCl_2$, 20 mM glucose, 1.4 mM $NADP^+$, hexokinase 162.5 μ g/mL and glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 U/mL. Pi concentrations were: 0.4 mM (\square), 4.0 mM (\blacksquare) and 10.0 mM (\bullet). The reaction was initiated with 200 μ M ADP. Each point is the mean of four independent experiments \pm SD

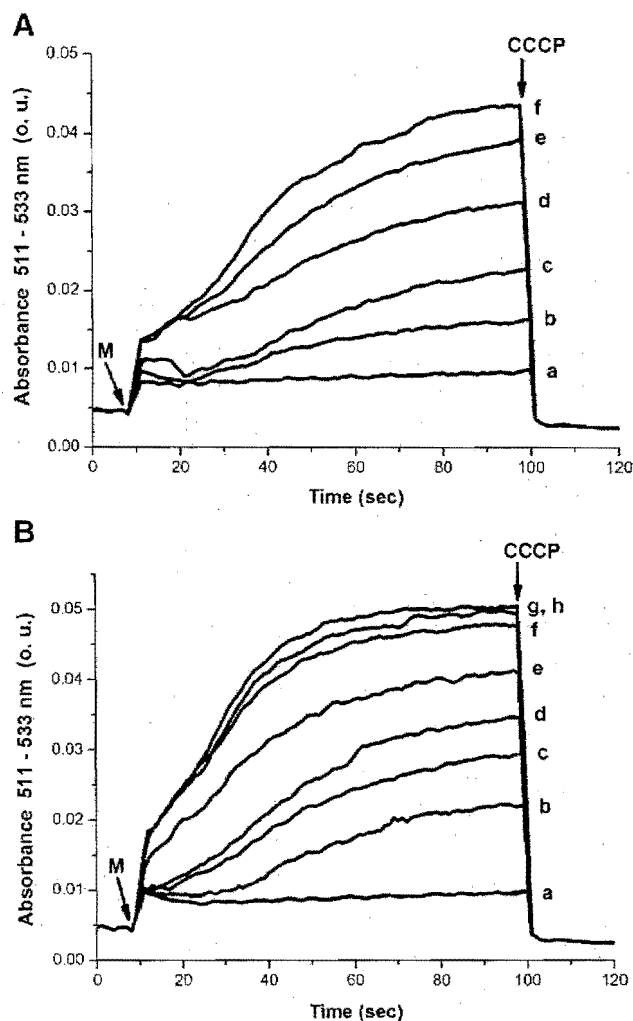


Fig. 4 Effect of divalent cations on the transmembrane potential ($\Delta\Psi$) of isolated mitochondria from *D. hanseni*. Reaction mixture as in Fig. 2, Pi concentration was 0.4 mM. A: Different Ca^{2+} concentrations were: a, 0; b, 100 μ M Ca^{2+} ; c, 200 μ M Ca^{2+} ; d, 500 μ M Ca^{2+} ; e, 750 μ M Ca^{2+} ; f, 1 mM Ca^{2+} . B: Different Mg^{2+} concentrations were: a, 0; b, 100 μ M Mg^{2+} ; c, 200 μ M Mg^{2+} ; d, 500 μ M Mg^{2+} ; e, 1 mM Mg^{2+} ; f, 2 mM Mg^{2+} ; g, 5 mM Mg^{2+} ; h, 10 mM Mg^{2+} . Where indicated, mitochondria (M) 0.5 mg prot (ml)⁻¹ and CCCP 5 μ M. Representative traces from three independent experiments

to Mg^{2+} , 100 μ M and 200 μ M resulted in a partial increase in $\Delta\Psi$ (Fig. 4b, traces a,b). At Mg^{2+} 500 μ M and 1 mM, $\Delta\Psi$ was increased to a value near the maximum obtainable (Fig. 4b, traces d,e). At and above 2 mM Mg^{2+} the maximum $\Delta\Psi$ was obtained (Fig. 4b, traces f,g,h). These results suggest that both divalent cations closed the MUC from *D. hanseni*, but this closure was promoted at lower [Ca^{2+}] than [Mg^{2+}].

Selective inhibition of each oxidase and its effect on PT

In *D. hanseni* mitochondria there are two terminal oxidases. In addition to cytochrome oxidase (COX), there

is an alternative oxidase (AOX) (Veiga et al. 2003). The presence of AOX allowed us to explore whether PT might depend on whether electrons were accepted by COX or AOX. Oxygen consumption experiments were conducted in the presence of cyanide (to block COX) or propyl-gallate (to block AOX) (Table 2). The rate of oxygen consumption was measured in state IV and in state III. In the presence of cyanide the rate of oxygen consumption was about one third of the non-inhibited rate (shown in Table 1), although increasing concentrations of K^+ did promote an increase in the rate of oxygen consumption both in state IV and state III, such that the CR remained low (Table 2). This effect suggests that under our conditions AOX expression was low and thus the lack of proton pumping activity by the blocked complexes III and IV failed to establish a high protonmotive force. By contrast, when AOX was blocked, the effect of K^+ on the rate of oxygen consumption did lead to an increase in RC (Table 1) to a similar extent as the increase obtained in the absence of propyl-gallate (see Table 1), indicating that in the absence of the (low) AOX activity PT still occurred.

The possible physiological meaning of the unusual sensitivity to monovalent cations observed in the *D. hansenii* MUC

The monovalent cation-mediated prevention of opening of the *D. hansenii* MUC has not been detected in mitochondria from any other species studied so far. It had always been considered that the permeability to these ions had to be closely controlled in order to avoid a recycling of the cation following a uniport mechanism for uptake and a H^+ antiport mechanism for export that would result in depletion of the electrical gradient and the consequent mitochondrial uncoupling and loss of ATP synthesis (Garlid 1988; Castrejón et al. 1997). This monovalent cation-mediated coupling makes sense when it is considered that

Table 2 Effect of cyanide and propyl-gallate on the rate of oxygen consumption and respiratory control of isolated mitochondria from *Debaryomyces hansenii*

[K^+] (mM)	Cyanide			Propyl Gallate		
	IV	III	RC	IV	III	RC
0	18±0.7	19±0.8	1.02	145±9	162±11	1.12
10	24.7±0.4	26.8±1.2	1.08	151±5	193±10	1.27
20	25.5±0.3	26.8±0.3	1.05	136±3	203±4	1.50
50	28.6±1.7	29.7±2	1.04	144±5	221±7	1.53
75	34±6	36±8	1.06	138±8	240±13	1.73

Experimental conditions and data as in Table 1 except 100 μ M Cyanide or 25 μ M propyl gallate were indicated. Data from 4–5 independent experiments.

in situ, *D. hansenii* mitochondria are exposed to high K^+ or Na^+ concentrations. It should be noted that the monovalent cation-promoted increase in the efficiency of the oxidative phosphorylation by *D. hansenii* mitochondria may explain, at least partially the increase in the growth rate of the *D. hansenii* cells when these are exposed to high concentrations of monovalent cations (González-Hernández et al. 2004; Sánchez et al. 2008).

As more mitochondria are isolated from different species, it is becoming obvious that these organelles are evolving together with the cell to adapt to the environment. As a result, there are variations in the protein composition of the organelle, e.g. the proteins in the respiratory chain vary widely specially in species with branched respiratory chains. It is noteworthy that the components of the respiratory chain do not seem to vary at random, e.g., from 21 yeast species analyzed, 12 contain both an alternative oxidase and complex I (Veiga et al. 2003), while there is only one species, *Pichia anomala*, that contains an alternative oxidase but no complex I (Nosek and Fukuhara 1994).

The effectors regulating the activity of the mitochondrial unspecific channels from different species may vary widely. In many cases, a given molecule has opposite effects in MUCs from different species (Manon and Guérin 1998). This could be an indication of the different functions the MUC might have depending on the species. The mammalian MUC, widely known as the permeability transition pore (PTP) and the *S. cerevisiae* MUC (YMUC) are the best characterized systems. Both channels have a molecule cutoff size of 1.5 kDa (Zoratti and Szabó 1995; Jung et al. 1997) and some cations such as Mg^{2+} and alkylamines close both MUCs (Chávez et al. 2000; Castrejón et al. 2002; Pérez-Vázquez et al. 2003). Here we demonstrated that the *D. hansenii* MUC is also closed by Mg^{2+} . Differences in sensitivity for MUCs from different species to cyclosporin A (CsA) have been reported (Tanveer et al. 1996; Jung et al. 1997). CsA is a potent PT inhibitor in mammalian (Halestrap and Davidson 1990), potato (Fortes et al. 2001) and wheat mitochondria (Pavlovskaya et al. 2007) but has no effect on yeast (Jung et al. 1997) or brine shrimp mitochondria (Menze et al. 2005). In the mammalian PTP, Pi is needed for Ca^{2+} -mediated opening, but it is also required by CsA to inhibit opening (Halestrap and Davidson 1990). In mitochondria from the yeast species *S. cerevisiae* (Velours et al. 1977; Roucou et al. 1997) and *D. hansenii* (this work), Pi always inhibits PT. Ca^{2+} opens the MUC in mammals (Crompton et al. 1988; Bernardi et al. 1994), potato (Fortes et al. 2001) and *N. crassa* (Brustovetsky et al. 2002) but it is inhibitory in *S. cerevisiae* (Jung et al. 1997) and in *D. hansenii* (this work). A Ca^{2+} -porin interaction site has been located both in *S. cerevisiae* (Gutiérrez-Aguilar et al. 2007) and mammals (Israelson et al. 2007). The inability of Ca^{2+} to

open the *S. cerevisiae* MUC might be explained if it is considered that there is no specific carrier for Ca^{2+} in these mitochondria and thus the Ca^{2+} uptake is slow (Uribe et al. 1992). Furthermore, addition of a Ca^{2+} ionophore to *S. cerevisiae* mitochondria enables Ca^{2+} to induce PT (Jung et al. 1997). It would be interesting to analyze the Ca^{2+} transport activity of the isolated mitochondria from *D. hansenii*. Adding to the wide variability in the pattern of PT in mitochondria from different species, recently it was reported that the yeast species *Yarrowia lipolytica* (Deryabina et al. 2004) and *Endomyces magnusii* (Kovaleva et al. 2009) fail to undergo PT unless a high concentration of Ca^{2+} plus the Ca^{2+} ionophore ETH129 are added. Remarkably, *D. hansenii* and *Y. lipolytica* are closely related (Dujon et al. 2004), but the first undergoes PT while the second does so only under very specific conditions (Kovaleva et al. 2009). A comparison between the proteins that have been proposed to constitute the channel might yield abundant information on the mechanisms that lead to PT and on the control mechanisms.

Acknowledgements The authors thank Martha Calahorra, Sergio Couoh, Ramón Méndez, Rocio Romualdo and Norma S. Sánchez for technical assistance. Partially funded by grants from: CONACYT-79989 and UNAM/DGAPA-PAPIIT-IN217109-3. ACO is recipient of a CONACYT undergraduate fellowship 102803.

References

- Akerman KEO, Wikström MK (1976) FEBS Lett 68:191–197
- Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdés-López V, De Luna A, Cárdenas R (2004) Curr Microbiol 48:68–72
- Averet N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guerin B (1998) Mol Cell Biochem 184:67–79
- Bernardi P (1999) Physiol Rev 79:1127–1155
- Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1994) J Bioenerg Biomembr 26:509–517
- Breuer U, Harnis H (2006) Yeast 23:415–437
- Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heidkämper D, Klingenberg M (2002) Biochemistry 41:11804–11811
- Castrejón V, Parra MC, Moreno R, Peña A, Uribe S (1997) Arch Biochem Biophys 346:37–44
- Castrejón V, Peña A, Uribe S (2002) J Bioenerg Biomembr 34:299–306
- Chávez E, Peña A, Zazueta C, Ramírez J, García N, Carrillo R (2000) J Bioenerg Biomembr 32:193–198
- Cortés P, Castrejón V, Sampedro JG, Uribe S (2000) Biochim Biophys Acta 1456:67–76
- Crompton M, Ellinger H, Costi A (1988) Biochem J 255:357–360
- Deryabina YI, Isakova EP, Shurubor EI, Zvyagil'skaya RA (2004) Biochemistry (Mosc) 69:1025–1033
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confaniolero F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004) Nature 430:35–44
- Fadda ME, Mossa V, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S (2004) Int J Food Microbiol 95:51–59
- Fortes F, Castilho RF, Catisti R, Carnieri EG, Vercesi AE (2001) J Bioenerg Biomembr 33:43–51
- Garlid KD (1988) In: Lemasters JJ, Hackenbrock CR, Thurman RG, Westerhoff HV (eds) Integration of Mitochondrial Function. Mitochondrial volume control. Plenum Publishing Corp, New York, pp 259–278
- Gómez-Puyou A, Sandoval F, Peña A, Chávez E, Tuena M (1969) J Biol Chem 244:5339–5345
- Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez Puyou M (1977) J Bioenerg Biomembr 9:91–102
- González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, Peña A (2004) Yeast 21:403–412
- Gornal AG, Bardavill CJ, David MM (1949) J Biol Chem 177:751–760
- Guérin B, Bunoust O, Rouqueys V, Rigoulet M (1994) J Biol Chem 269:25406–25410
- Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Vázquez V, Bunoust O, Manon S, Rigoulet M, Uribe S (2007) Biochim Biophys Acta 1767:1245–1251
- Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Martínez X, Chávez E, Uribe S (2010) Arch Biochem Biophys (in press)
- Halestrap AP, Davidson AM (1990) Biochem J 268:153–160
- Hobot JA, Jennings DH (1981) Exp Mycol 5:217–228
- Israelson A, Abu-Hamad S, Zaid H, Nahon E, Shoshan-Barmatz V (2007) Cell Calcium 41:235–244
- Jung DW, Bradshaw P, Pfeiffer DR (1997) J Biol Chem 272:21104–21112
- Kovaleva MV, Sukhanova EI, Trendeleva TA, Zyl'kova MV, Ural'skaya LA, Popova KM, Saris NE, Zvyagil'skaya RA (2009) J Bioenerg Biomembr 41:239–249
- Kowaltowski AJ, Naia-Da-Silva ZS, Castilho RF, Vercesi AE (1998) Arch Biochem Biophys 359:77–81
- Kusano T, Tateda C, Berberich T, Takahashi Y (2009) Plant Cell Rep 28(9):1301–1308
- Leung AW, Halestrap AP (2008) Biochim Biophys Acta 1777:946–952
- Manon S, Guerin M (1997) Biochem Biophys Acta 1318:317–321
- Manon S, Guerin M (1998) Biochem Mol Biol Int 44:565–575
- Manon S, Roucou X, Guerin M, Rigoulet M, Guerin B (1998) J Bioenerg Biomembr 30:419–429
- Menze MA, Hutchinson K, Laborde SM, Hand SC (2005) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289:R68–R76
- Montiel V, Ramos J (2007) FEMS Yeast Res 7:102–109
- Neves ML, Oliveira RP, Lucas CM (1997) Microbiol 143:1133–1139
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2001). In Bioenergetics 3. Chapter IV, The chemiosmotic proton circuit. Academic Press, pp. 57–87
- Norkrans B (1966) Mikrobiol 54:374–392
- Norkrans B, Kylin A (1969) J Bacteriol 100:836–845
- Nosek J, Fukuhara H (1994) J Bacteriol 176:5622–5630
- Pavlovskaya NS, Savinova OV, Gabel'nykh OI, Pobezhimova TP, Koroleva NA, Voinikov VK (2007) Dokl Biol Sci 417:446–448
- Peña A, Campillo Serrano C, de Gómez T, Puyou M (1964) Arch Biochem Biophys 106:461–466
- Peña MZ, Piña E, Escamilla E, Piña A (1977) FEBS Lett 80:209–213
- Pérez-Vázquez V, Saavedra-Molina A, Uribe S (2003) J Bioenerg Biomembr 35:231–241
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Appl Environ Microbiol 63:4005–4009
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, Garcia R, Ramos J (2005) FEMS Yeast Res 5:693–701

- Ramos J (2006) In: Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitas A (eds) *Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast. Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya*. Springer, Berlin, pp 443–451
- Roucou X, Manon S, Guerin M (1997) *Biochem Mol Biol Int* 43:53–61
- Sánchez NS, Arreguin R, Calahorra M, Peña A (2008) *FEMS Yeast Res* 8:1303–1312
- Sherman D, Durrens P, Beyne E, Nikolski MJ-L (2004) *Nucleic Acids Res* 32:D315–D318
- Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM, Crompton M (1996) *Eur J Biochem* 238:166–172
- Thomé-Ortiz P, Peña A, Ramírez J (1998) *Yeast* 14:1355–1371
- Uribe S, Ramírez J, Peña A (1985) *J Bacteriol* 161:1195–1200
- Uribe S, Sánchez N, Peña A (1991) *Biochem Int* 24:615–624
- Uribe S, Rangel P, Pardo JP (1992) *Cell Calcium* 13:211–217
- Veiga A, Arabaca JD, Loureiro-Días MC (2003) *FEMS Yeast Res* 3:239–245
- Velours J, Rigoulet M, Guerin B (1977) *FEBS Lett* 81:18–22
- Zoratti M, Szabo I (1995) *Biochim Biophys Acta* 1241:139–176

Hipótesis

(Análisis *in silico* de la estructura del acarreador de oxaloacetato)

Método:

Se obtuvieron las secuencias de las proteínas homólogas a la proteína XP_503525 que corresponden a los diversos acarreadores mitocondriales de oxaloacetato encontrados a través de la base de datos del NCBI; se corrió un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW2 y posteriormente una inspección manual de las secuencias con el programa JalView. Se muestran los archivos de salida tanto del alineamiento como del árbol filogenético arrojado con dicho análisis. La secuencia del acarreador de oxaloacetato de *S. cerevisiae* y la proteína XP_503525 se modelaron con el programa PyMOL con el fin de visualizar dominios específicos de esta subfamilia de proteínas de acuerdo a los modelos de unión a sustratos para acarreadores mitocondriales establecidos por Kunji (Kunji y Robinson, 2006; Robinson y cols, 2008)

En esta parte del trabajo se muestra la estructura del acarreador de oxaloacetato así como de sus posibles motivos estructurales que lo hagan poseer dos propiedades de transporte. Para esto se analizó la topología de esta proteína, algunos motivos estructurales conservados en proteínas de membrana así como de la familia de acarreadores mitocondriales; posteriormente se comparó con el acarreador de oxaloacetato de *S. cerevisiae*, el cual se encuentra caracterizado estructural y funcionalmente (Palmieri y cols, 1999; Kunji y Robinson, 2006; Robinson y cols, 2008)

Un primer paso para el análisis es demostrar si nuestra proteína presentaba la misma topología predicha para la familia de acarreadores mitocondriales, con este fin se utilizó el programa Octopus. En la figura 1 se muestra la estructura y topología consenso. Se puede observar que este programa predice 6 cruces transmembranales, con las regiones N y C terminales orientadas al espacio transmembranales de acuerdo con la regla positivo adentro; así mismo se puede establecer que la estructura propuesta consta de seis hélices transmembranales, 3 loops matriciales, dos citosólicos, así como las regiones N y C hacia el citosol. Estos datos concuerdan con la

estructura cristalográfica del translocador de adenín nucleótidos el cual es el único miembro de esta familia con una estructura cristalográfica definida.

Una vez corroborador que nuestra proteína presentaba las características propias de esta familia de acarreadores se modelo con el programa PyMOL y se refinó al analizar la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (triptofano y tirosina) en los extremos de las hélices para poder delimitar la sección de las hélices inmersas en la bicapa lipídica; al observar el modelo de regiones hidrofóbicas se puede notar la zona que delimita la membrana interna mitocondrial y es de notar que las hélices transmembranales se encuentran completamente inmersas en la bicapa y solo las regiones de unión de las hélices 1, 3 y 5 así como las hélices matriciales se encuentran fuera de ella lo que indica que son regiones muy móviles y que probablemente funcionen como las compuertas del poro de translocación (Fig. 2), así mismo se puede identificar una región o bolso hidrofóbico presente en la región media e interna de la hélice transmembranal 2 (H2) la cual podría servir para estabilizar alguna región hidrofóbica del sustrato.

```
MAVILDKQKKQPPKQISTLGGFVAGAIACGAVTVTNPIELVKTRMQLQGEL
AARGEAKVYTSPLQALVKIYKSEGIKGLQSGLFSAYVYQIGLNGCRLGLYEP
TRKVIANVCNIDLNKENPVGLNVASGAISGIMGAVAGSPFYLIKTRQQSYSPA
FKVGAQTYYSIGDGFRIYGAEGFKGLYRGVDAAILRTGAGSSVQLPIYNW
AKELLLKHHITDPGASTHLVASAMSGLVAVVMNPWDVLMTRMYNQKGNM
YKNPFDCLMKTVSIIEGPFALYKGFGAHLLRIAPHTILTLMFMEQTMKWVKWF
EGVPP
```

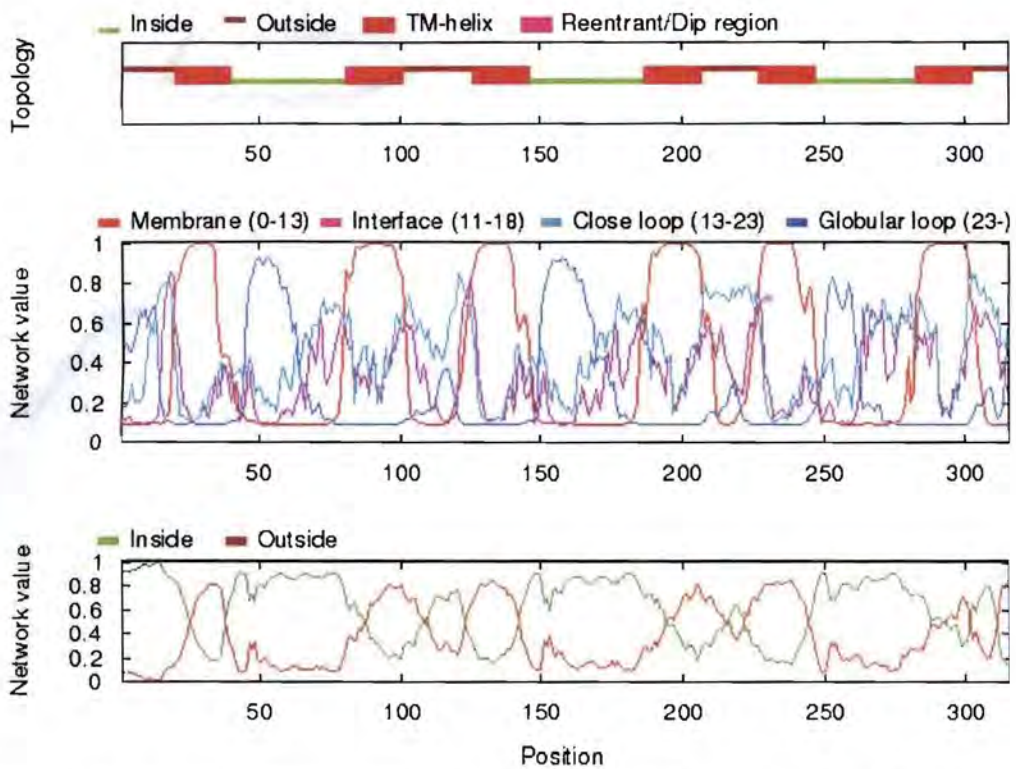


Fig. 1. Estructura primaria y topología del acarreador de oxaloacetato de *Y. lipolytica* predicha por el programa Octopus. En rojo se muestra el motivo firma de la familia de acarreadores mitocondriales.

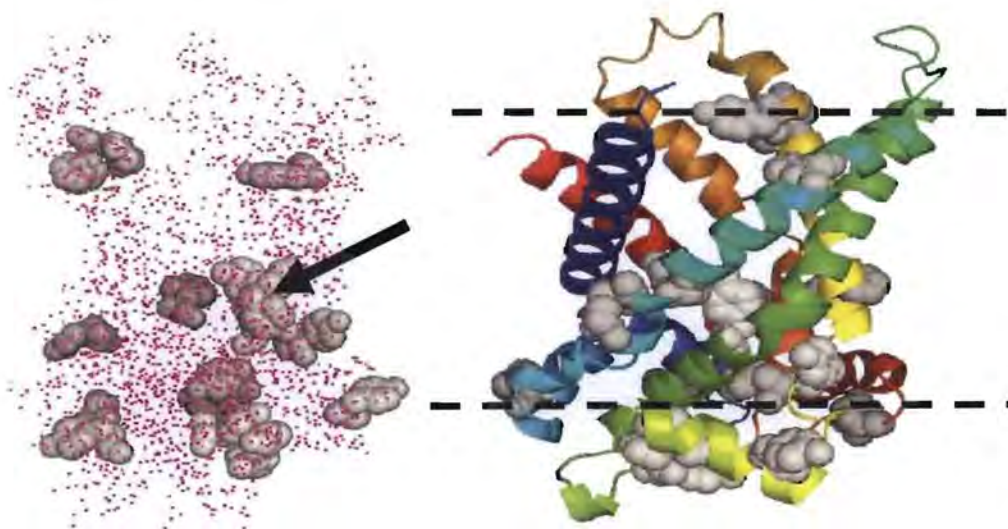


Figura 2. Localización de aminoácidos hidrofóbicos (principalmente tirosina y triptofano) en las hélices transmembranales. La línea punteada delimita la cabeza de los fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial. La flecha el bolso hidrofóbico presente en la hélice 2.

Una característica de estas proteínas es que las hélices se agrupan en tandem de dos hélices unidas por un asa matricial de aproximadamente 100 aminoácidos, en la figura 21 se presentan las hélices 1-2, 3-4 y 5-6 unidas por las asas matriciales 1, 2 y 3 compuestas por tres pequeñas hélices paralelas al plano de la membrana lipídica. Un punto a notar es la presencia de prolinas en el punto marcado por la flecha de la figura 3, en ese punto la hélice cambia de dirección aunque no se ve interrumpida como en el caso de la hélice 5 donde se ve claramente que la presencia de esa prolina produce una discontinuidad en la hélice. Es esta región de prolinas donde se encuentra el motivo firma de los acarreadores mitocondriales P-X-[E/D]-XX-[K/R] el cual sirve como una red de puentes salinos utilizado para la posterior apertura de las hélices matriciales y la consiguiente translocación del sustrato a la matriz mitocondrial.

Otro punto a considerar son los motivos G-X-X-X-G conocidos como zippers de glicina presentes únicamente en las hélices 1, 2 y 3 (Fig 4). Los cuales ayudan a estabilizar las hélices transmembranales. De manera interesante es en las hélices 2 y 3 donde se encuentra el bolso hidrofóbico localizado previamente.

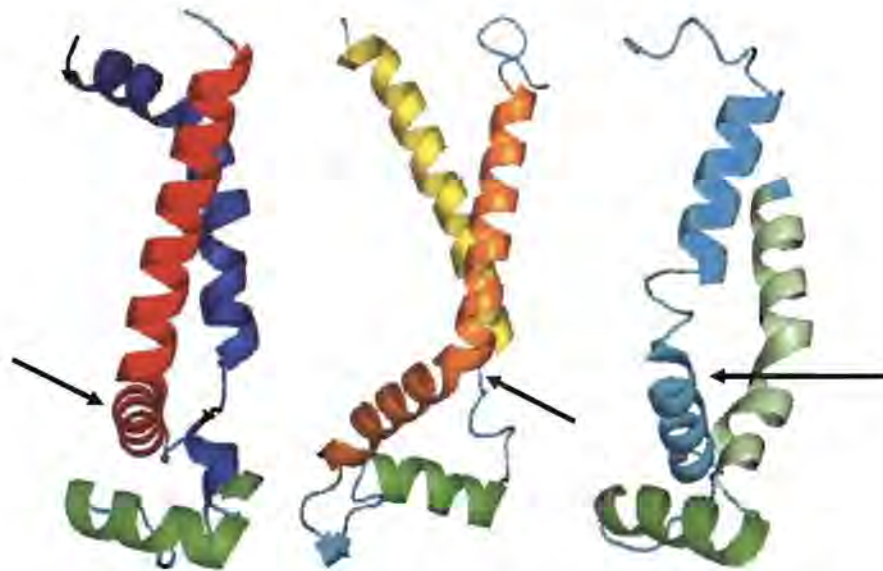


Figura 3. Modelo tridimensional de cada una de las repeticiones de la proteína en estudio. Las hélices al frente de la imagen se encuentran las hélices 1, 3 y 5 indicando la interrupción provocada por el motivo estructural P-X-[E/D]-XX-[K/R].

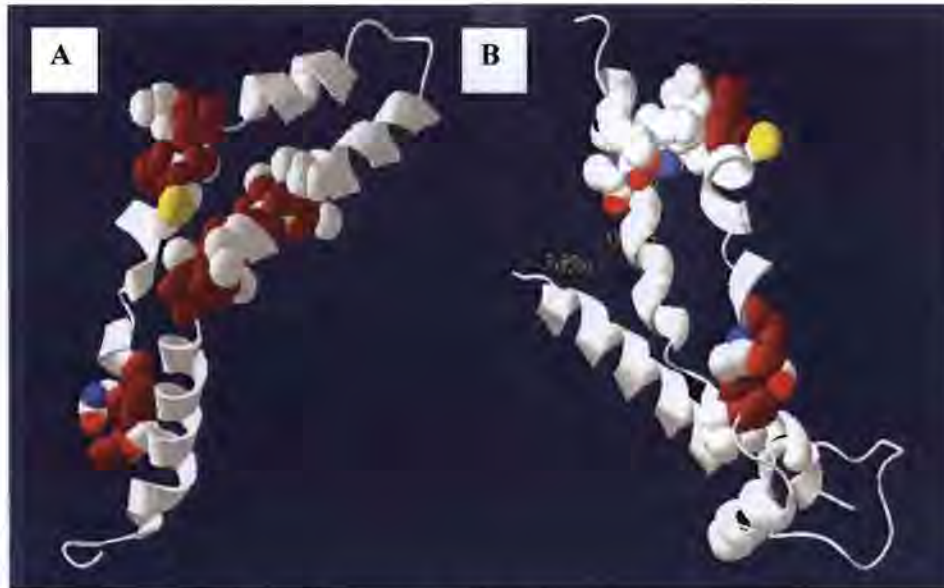


Fig. 4. Localización de los motivos G-X-X-X-G de las hélices A) H2-H3 y B) H1-H2. En café se muestran los residuos de glicina flanqueando a los residuos no conservados.

Una vez localizados los motivos estructurales más importantes en nuestra proteína se realizó una búsqueda de los sitios de unión a sustrato así como las posibles diferencias estructurales con el acarreador de *S. cerevisiae* con el fin de explicar las diferencias en sus características de transporte.

Los acarreadores mitocondriales en general presentan un sitio de unión a sustrato formado por los puntos de contacto I, II y III los cuales presentan una serie de aminoácidos encontrados en las hélices transmembranales 2, 4 y 6 respectivamente. El sitio de contacto II (CII) define el tipo de sustrato a transportar (aminoácidos, cetoácidos, o nucleótidos); el sitio de contacto I (CI) da especificidad entre una misma familia de sustratos (e. g. discrimina entre oxaloacetato y succinato) (Kunji y Robinson, 2006; Robinson y cols, 2008).

Todos los sitios de contacto se encuentran en la región media del poro orientados hacia la fase acuosa. En la figura anexa 3 se puede observar un alineamiento múltiple de todas las secuencias de acarreadores de oxaloacetato de hongos indicando los sitios de contacto I, II y III, así como los motivos estructurales que forman los puentes salinos de las compuertas matriciales y citosólicas. Como se observa en las secuencias prácticamente todos los aminoácidos claves en la función de este transportador se encuentran conservados.

Hay varias regiones que merecen atención:

- 1) Los aminoácidos de CI están representados por los aminoácidos Y79, L83, N84 y R101 reconocen el grupo carboxilato del oxaloacetato.
- 2) El sitio CII se encuentra representado por el motivo RT, este discrimina entre ácidos orgánicos.
- 3) El sitio CIII formado por los residuos R e H. El conjunto de argininas de los sitios I, II y III, forman el sitio de unión de polifosfato en el acarreador de adenín nucleótidos.
- 4) Un bolso hidrofóbico formado por el zipper de glicina de la hélice 3 (G-A-I-S-G) junto con Y79 y L97 de la hélice 2.
- 5) Los motivo firma (P-X-[D/E] -X-X- [D/E]) de la hélice 3 y 5 del acarreador de *Y. lipolytica* son los únicos que presentan aminoácidos no conservados en toda la familia de OAC.

La figura 5 muestra una vista desde el espacio intermembranal del sitio de unión a oxaloacetato tanto del acarreador de *Y. lipolytica* como del de *S. cerevisiae*. Como se puede apreciar en esta figura el punto de contacto I presenta algunos residuos conservados como tirosina, arginina, asparagina y glutamina además de una región hidrofóbica variable la cual ayuda a estabilizar tanto al carboxilato del sustrato como al α C del oxaloacetato. Se ha visto que este transportador es capaz de unir sustratos de naturaleza hidrofóbica como el isopropilmalato (Marobbio y cols, 2008) el cual presenta una unidad isopropilo sustituida en el α C en lugar del metileno del oxaloacetato. Este sitio presenta aminoácidos con dos orientaciones: 1) Los residuos de arginina y glutamina orientados hacia la matriz y 2) los residuos de tirosina y asparagina hacia el espacio intermembranal. Esto implicaría que el acarreador es capaz de reconocer un carboxilato y una región hidrofóbica del sustrato desde las conformaciones citosólica y matricial de la proteína.

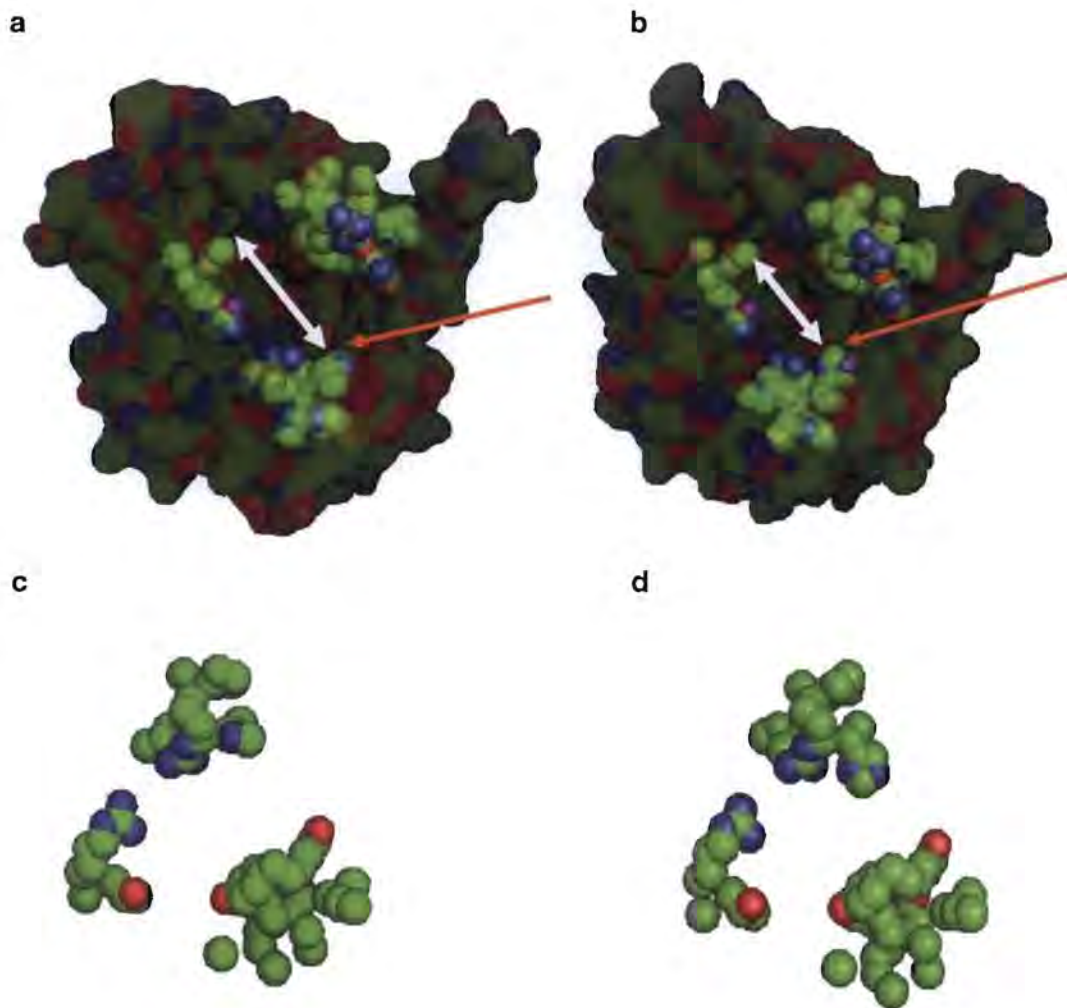


Fig. 5. Vista desde el espacio intermembranal del sitio de unión al sustrato en el poro del acarreador de oxaloacetato de *Yarrowia lipolytica* (a y c) y de *Saccharomyces cerevisiae* (b y d). Los residuos en rojo representan aminoácidos ácidos; en azul residuos básicos capaces de formar enlaces electrostáticos con el sustrato. La flecha naranja indica la histidina presente en el punto de contacto III presente en la hélice 5. La flecha blanca representa la longitud del poro de ambos acarreadores. En a y b se indica la posición del sitio de unión dentro del poro de la proteína; en c y d únicamente se muestra la disposición espacial de los aminoácidos del sitio de unión a sustrato.

En sitio de contacto II, el cual está formado únicamente por los residuos conservados R- T, representa el sitio de reconocimiento del β C del sustrato (ya sea el carbonilo del oxaloacetato o el hidroxilo del isopropilmalato). Al igual que el sitio I, los dos aminoácidos se encuentran orientados en distintas posiciones dentro del poro: mientras que el hidroxilo del β C de la treonina se orienta hacia

el espacio intermembranal, el grupo guanidinio de la arginina se encuentra perpendicular al poro de translocación.

Tanto el sitio I y II no presentan diferencias en ambos acarreadores. En el sitio III (formado por una arginina y una histidina conservados) se presenta una diferencia. En la orientación de la histidina de este sitio se puede observar que en el acarreador de *Y. lipolytica* este residuo se encuentra de forma axial al poro mientras que en el de *S. cerevisiae* se encuentra ecuatorialmente (flecha naranja de la figura 24). En el caso de *Y. lipolytica*, la posición de esta histidina implicaría que cuando el acarreador se encuentra en su conformación C (con el poro abierto hacia el espacio intermembranal), el poro tendría un diámetro mayor que su contraparte en *S. cerevisiae* (la flecha blanca en la figura 5 representa: $D_{Yl} = 12 \text{ \AA}$ vs $D_{Sc} = 10$). Debido a la distancia entre el sitio III y II (aproximadamente 3.5 \AA) probablemente este sitio estabilice al carboxilo γ del sustrato por medio de un puente salino. Al analizar el acarreador de oxaloacetato de *Candida albicans* se pudo observar que esta misma histidina se encuentra en la misma orientación que el de *Y. lipolytica*, es decir de forma axial. Resulta interesante ver que también en *C. albicans* se ha caracterizado una proteína tipo UCP (Cavalheiro y cols, 2004), además de que al analizar el genoma de esta levadura se encontró que la proteína con mayor similitud a una UCP es un acarreador de oxaloacetato como sucede en *Y. lipolytica*.

Otra diferencia que se puede encontrar entre los acarreadores de *Y. lipolytica* y el de *S. cerevisiae* son los motivos firma de las hélices 3 y 5 (Fig. 6). En el caso de la hélice 3, la secuencia consenso entre los acarreadores de oxaloacetato es P-X-F-X-X-K; sin embargo el acarreador de *Y. lipolytica* presenta una sustitución de la fenilalanina por una tirosina. En la hélice 5, la secuencia consenso es P-X-D-X-X-L, en este caso el acarreador de *Y. lipolytica* presenta una sustitución de leucina por metionina. A simple vista están podrían representar sustituciones conservadas; sin embargo la posición de los aminoácidos 3 y 6 de estos motivos representa los sitios de unión al sustrato en la compuerta matricial de todos los acarreadores mitocondriales. Como se puede observar en la figura 6, la tirosina en el acarreador de *Y. lipolytica* podría interactuar con un ácido carboxílico (ya sea ácido graso u oxaloacetato) formando un puente de hidrógeno; la ausencia de este residuo en el caso de *S.*

cerevisiae podría explicar porque no hay efecto del ácido graso en las mitocondrias de *S. cerevisiae* cuando un ácido graso está presente.

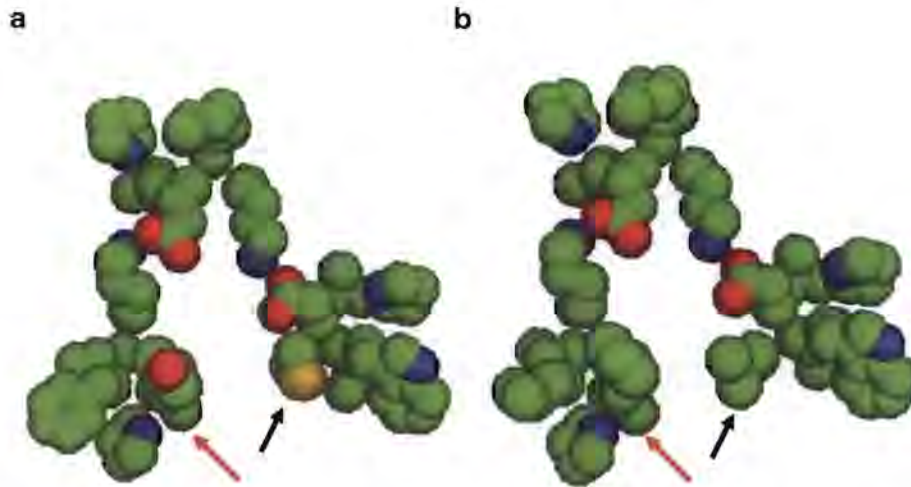


Fig. 6. Vista de la compuerta matricial vista desde la matriz mitocondrial. En a) se muestra la compuerta del acarreador de oxaloacetato de *Y. lipolytica* y en b) el de *S. cerevisiae*. Las flechas indican los aminoácidos donde se presentan diferencias entre ambos acarreadores. En el caso de la flecha roja se encuentra una tirosina para *Y. lipolytica* y en *S. cerevisiae* en esta misma posición se encuentra una fenilalanina. La flecha negra indica la posición de la metionina para *Y. lipolytica* y una leucina para *S. cerevisiae*.

Discusión.

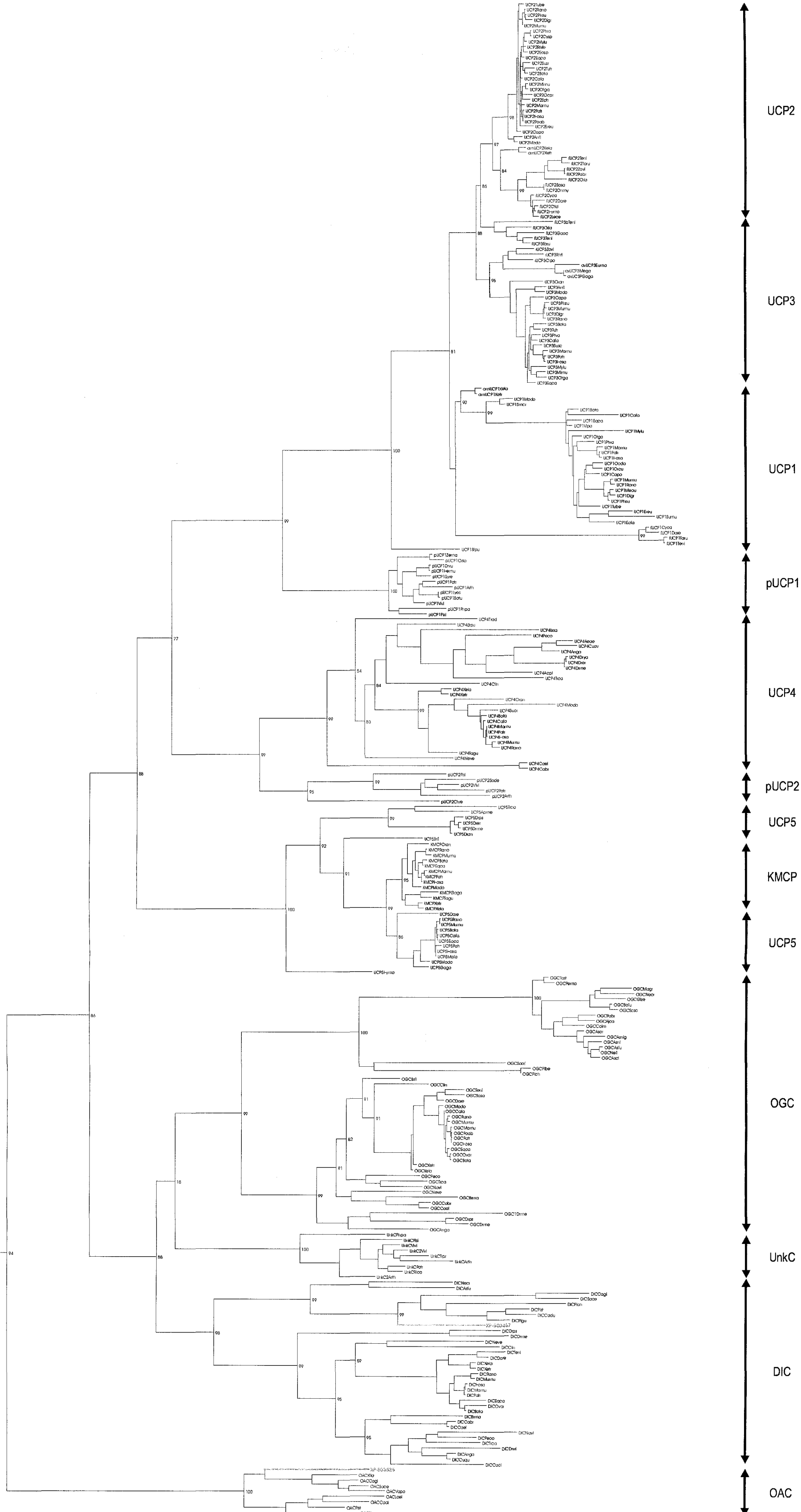
En este trabajo se trató de explicar las diferencias en comportamiento de un mismo acarreador mitocondrial en dos levaduras diferentes. Por un lado en *Y. lipolytica* se encuentra que este transportador presenta dos sistemas de transporte (tipo UCP y tipo OAC) mientras que en *S. cerevisiae* solo el sistema de transporte tipo OAC se encuentra presente. Explicar este comportamiento basado en diferencias en la secuencia de aminoácidos resulta casi imposible puesto que ambas proteínas tienen una similitud muy alta; sin embargo al analizar la estructura terciaria y ver la orientación de residuos claves en la unión al sustrato se pudieron observar dos diferencias principales: 1) la orientación de la histidina presente en el sitio de reconocimiento al sustrato es diferente en ambas levaduras, esta posición permitiría explicar el efecto inhibitorio de los purín nucleótidos sobre el transporte tipo UCP, así mismo explicaría el efecto del ácido graso sobre la conductancia de protones. En otras

palabras, es la orientación de este residuo el que probablemente fue modificado durante la evolución, permitiendo así que el acarreador de *S. cerevisiae* ganara especificidad y perdiera su transporte tipo UCP, mientras que en *Y. lipolytica* y muy probablemente en *C. albicans*, es esta orientación la que permite un comportamiento dual en dicho acarreador.

Del mismo modo, las diferencias en la compuerta matricial, aunque menos visibles, podrían explicar la interacción del ácido graso con la proteína, ya que es factible que se forme un puente de hidrógeno entre la tirosina del motivo firma de la hélice 3 con el carboxilato del ácido graso.

Referencias.

- [1] Cavalheiro RA, Fortes F, Borecký J, Faustino VC, Schreiber AZ, Vercesi AE. Respiration, oxidative phosphorylation and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz J. Med Biol Res* 2004; 37: 1455-1461
- [2] Kunji ER, Robinson A, The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 1237-1248.
- [3] Marobbio CMT, Giannuzzi G, Paradies E, Pierri CL, Palmieri F, α -Isopropylmalate, a leucine biosynthesis intermediate in yeast, is transported by the mitochondrial oxaloacetate carrier, *J. Biol. Chem.* **283** (2008), pp. 28445–28453.
- [4] Palmieri L, Voza A, Agrimi G, De Marco V, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE. Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate, *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 22184-22190.
- [5] Robinson AJ, Overy C, Kunji E, The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008); 105(46):17766-71.



Carrier code	Accession number	Species
UCP2 Tube	ENSTBEP00000001274	<i>Tupaia belangeri</i>
UCP2 Rano	NP_062227	<i>Rattus norvegicus</i>
UCP2 Phsu	AAG33984	<i>Phodopus sungorus</i>
UCP2 Digr	AAR30171	<i>Dicrostonyx groenlandicus</i>
UCP2 Mumu	AAD17199	<i>Mus musculus</i>
UCP2 Ptva	ENSPVAP00000006293	<i>Pteropus vampyrus</i>
UCP2 Cysp	ACL36298	<i>Cynopterus sphinx</i>
UCP2 Mylu	ENSMLUP00000011033	<i>Myotis lucifugus</i>
UCP2 Rhfe	ACL36297	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>
UCP2 Eosp	ACL36296	<i>Eonycteris spelaea</i>
UCP2 Eqca	XP_001498530	<i>Equus caballus</i>
UCP2 Susr	NP_999454	<i>Sus scrofa</i>
UCP2 Tutr	ENSTTRP00000005141	<i>Tursiops truncatus</i>
UCP2 Bota	NP_001028783	<i>Bos taurus</i>
UCP2 Cafa	NP_001003048	<i>Canis lupus familiaris</i>
UCP2 Mimu	ENSMICP00000012697	<i>Microcebus murinus</i>
UCP2 Otga	ENSOGAP00000001516	<i>Otolemur garnettii</i>
UCP2 Ocpr	ENSOPRP00000009520	<i>Ochotona princeps</i>
UCP2 Sprt	ENSSTOP00000009617	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>
UCP2 Mamu	XP_001115559	<i>Macaca mulatta</i>
UCP2 Patr	XP_508635	<i>Pan troglodytes</i>
UCP2 Hosa	NP_003346	<i>Homo sapiens</i>
UCP2 Poab	NP_001126811	<i>Pongo abelii</i>
UCP2 Ereu	ENSEEUP00000007261	<i>Erinacaeus europaeus</i>
UCP2 Capo	ENSCPOP00000009598	<i>Cavia porcellus</i>
UCP2 Anfi	AAP44414	<i>Antechinus flavipes</i>
UCP2 Modo	XP_001362966	<i>Monodelphis domestica</i>
amUCP2 Xela	NP_001084847	<i>Xenopus laevis</i>
amUCP2 Xetr	NP_989179	<i>Xenopus tropicalis</i>
fUCP2 Teni	ENSTNIP00000014758	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
fUCP2 Taru	ENSTRUP00000037074	<i>Takifugu rubripes</i>
fUCP2 Zovi	AAT99594	<i>Zoarcetes viviparus</i>
fUCP2 Pabr	AAT99593	<i>Pachycara brachycephalum</i>
fUCP2 Orla	ENSORLP00000011390	<i>Oryzias latipes</i>
fUCP2 Sasa	ACI66881	<i>Salmo salar</i>
fUCP2 Onmy	ABC00182	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
fUCP2 Cyca	Q9W725	<i>Cyprinus carpio</i>
fUCP2 Dare	Q9W720	<i>Danio rerio</i>
fUCP2 Ctid	AAX49553	<i>Ctenopharyngodon idella</i>
fUCP2 Hymo	ABK96971	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>
fUCP2 Lece	AAR10978	<i>Leuciscus cephalus</i>
fUCP3b Teni	ENSTNIP00000019332	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
fUCP3 Orla	ENSORLP00000011391	<i>Oryzias latipes</i>
fUCP3 Gaac	BT027074	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
fUCP3 Teni	ENSTNIP00000014759	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
fUCP3 Taru	ENSTRUP00000037001	<i>Takifugu rubripes</i>
rUCP3 Zovi	ACD03812	<i>Zootoca vivipara</i>

rUCP3 Rhti	ABX60139	<i>Rhabdophis tigrinus</i>
rUCP3 Crpo	ABU95646	<i>Crocodylus porosus</i>
avUCP3 Euma	AAK16829	<i>Eupetomena macroura</i>
avUCP3 Mega	AAL28138	<i>Meleagris gallopavo</i>
avUCP3 Gaga	NP_989438	<i>Gallus gallus</i>
UCP3 Oran	XP_001512822	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>
UCP3 Anfla	AAS45212	<i>Antechinus flavipes</i>
UCP3 Modo	XP_001368096	<i>Monodelphis domestica</i>
UCP3 Capo	ENSCPOP00000004660	<i>Cavia porcellus</i>
UCP3 Phsu	AAG33985	<i>Phodopus sungorus</i>
UCP3 Mumu	NP_033490	<i>Mus musculus</i>
UCP3 Digr	AAP94991	<i>Dicrostonyx groenlandicus</i>
UCP3 Rano	NP_037299	<i>Rattus norvegicus</i>
UCP3 Bota	NP_776635	<i>Bos taurus</i>
UCP3 Tutr	ENSTTRP00000005154	<i>Tursiops truncatus</i>
UCP3 Ptva	ENSSPVAP00000006296	<i>Pteropus vampyrus</i>
UCP3 Cafa	NP_001003047	<i>Canis lupus familiaris</i>
UCP3 Susc	AAD33396	<i>Sus scrofa</i>
UCP3 Mamu	XP_001115599	<i>Macaca mulatta</i>
UCP3 Patr	XP_001174871	<i>Pan troglodytes</i>
UCP3 Hosa	NP_003347	<i>Homo sapiens</i>
UCP3 Mylu	ENSMMLUP00000011039	<i>Myotis lucifugus</i>
UCP3 Mimu	ENSMICP00000011572	<i>Microcebus murinus</i>
UCP3 Otga	ENSOGAP00000002603	<i>Otolemur garnettii</i>
UCP3 Eqca	XP_001498467	<i>Equus caballus</i>
amUCP1 Xela	NP_001088647	<i>Xenopus laevis</i>
amUCP1 Xetr	NP_001107354	<i>Xenopus tropicalis</i>
UCP1 Modo	XP_001377555	<i>Monodelphis domestica</i>
UCP1 Smcr	ABR32188	<i>Sminthopsis crassicaudata</i>
UCP1 Bota	XP_616977	<i>Bos taurus</i>
UCP1 Cafa	NP_001003046	<i>Canis lupus familiaris</i>
UCP1 Eqca	NP_001915566	<i>Equus caballus</i>
UCP1 Vipa	ENSVPAP00000004864	<i>Vicugna pacos</i>
UCP1 Mylu	ENSMMLUP00000008720	<i>Myotis lucifugus</i>
UCP1 Otga	ENSOGAP00000006089	<i>Otolemur garnettii</i>
UCP1 Ptva	ENSPVAP00000015831	<i>Pteropus vampyrus</i>
UCP1 Mamu	XP_001090457	<i>Macaca mulatta</i>
UCP1 Patr	XP_517450	<i>Pan troglodytes</i>
UCP1 Hosa	NP_068605	<i>Homo sapiens</i>
UCP1 Ocda	A0PC02	<i>Ochotona dauurica</i>
UCP1 Orcu	P14271	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
UCP1 Capo	ENSCPOP00000001776	<i>Cavia porcellus</i>
UCP1 Mumu	EDL10899	<i>Mus musculus</i>
UCP1 Rano	NP_036814	<i>Rattus norvegicus</i>
UCP1 Meau	P04575	<i>Mesocricetus auratus</i>
UCP1 Digr	Q8K404	<i>Dicrostonyx groenlandicus</i>
UCP1 Phsu	Q9ER18	<i>Phodopus sungorus</i>
UCP1 Tube	ENSTBEP00000000042	<i>Tupaia belangeri</i>
UCP1 Ereu	ENSEEUP000000004711	<i>Erinaceus europaeus</i>

UCP1 Sumu	Q18P97	<i>Suncus marinus</i>
UCP1 Ecte	ENSETEP00000008864	<i>Echinops telfairi</i>
fUCP1 Teni	ENSTNIP00000009630	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
fUCP1 Taru	ENSTRUP00000033443	<i>Takifugu rubripes</i>
fUCP1 Dare	NP_955817	<i>Danio rerio</i>
fUCP1 Cyca	AAS10175	<i>Cyprinus carpio</i>
UCP1 Stpu	XP_001185598	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
pUCP1 Zema	NP_001105727	<i>Zea mays</i>
pUCP1 Orsa	ABA95530	<i>Oryza sativa</i>
pUCP1 Drvu	BAD51464	<i>Dracunculus vulgaris</i>
pUCP1 Hemu	BAC06495	<i>Helicodiceros muscivorus</i>
pUCP1 Syre	BAA92172	<i>Symlocarpus renifolius</i>
pUCP1 Potr	ABK93493	<i>Populus trichocarpa</i>
pUCP1 Arth	NP_190979	<i>Arabidopsis thaliana</i>
pUCP1 Lyes	AAL82482	<i>Lycopersicon esculentum</i>
pUCP1 Sotu	CAA72107	<i>Solanum tuberosum</i>
pUCP1 Vivi	CAN64198	<i>Vitis vinifera</i>
pUCP1 Phpa	XP_001762319	<i>Physcomitrella patens</i>
pUCP1 Pisi	ABK26343	<i>Picea sitchensis</i>
UCP4 Trad	XP_002116169	<i>Trichoplax adherens</i>
UCP4 Stpu	XP_785257	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
UCP4 Ixsc	EEC00189	<i>Ixodes scapularis</i>
UCP4 Peco	EEB16439	<i>Pediculus corporis</i>
UCP4 Aeae	XP_001658263	<i>Aedes aegypti</i>
UCP4 Cuqu	XP_001846101	<i>Culex quinquefasciatus</i>
UCP4 Anga	XP_318630	<i>Anopheles gambiae</i>
UCP4 Drya	XP_002101541	<i>Drosophila yakuba</i>
UCP4 Drer	XP_001977601	<i>Drosophila erecta</i>
UCP4 Drme	NP_573246	<i>Drosophila melanogaster</i>
UCP4 Acpi	XP_001944640	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
UCP4 Trca	XP_969929	<i>Tribolium castaneum</i>
UCP4 Ciin	XP_002125994	<i>Ciona intestinalis</i>
UCP4 Xela	XP_001085259	<i>Xenopus laevis</i>
UCP4 Xetr	NP_001011241	<i>Xenopus tropicalis</i>
UCP4 Oran	XP_001511667	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>
UCP4 Modo	XP_001368742	<i>Monodelphis domestica</i>
UCP4 Susc	XP_001928208	<i>Sus scrofa</i>
UCP4 Bota	XP_871807	<i>Bos taurus</i>
UCP4 Cafa	XP_852329	<i>Canis familiaris</i>
UCP4 Mamu	XP_001103050	<i>Macaca mulatta</i>
UCP4 Patr	XP_527398	<i>Pan troglodytes</i>
UCP4 Hosa	NP_004268	<i>Homo sapiens</i>
UCP4 Mumu	NP_082987	<i>Mus musculus</i>
UCP4 Rano	NP_445952	<i>Rattus norvegicus</i>
UCP4 Tagu	ACH43727	<i>Taeniopygia guttata</i>
UCP4 Neve	XP_001624985	<i>Nematostella vectensis</i>
UCP4 Cael	NP_505414	<i>Caenorhabditis elegans</i>
UCP4 Cabr	XP_001674616	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
pUCP2 Pisi	ABK27159	<i>Picea sitchensis</i>

pUCP2 Sode	AAT66766	<i>Solanum demissum</i>
pUCP2 Vivi	CAO48352	<i>Vitis vinifera</i>
pUCP2 Potr	EEF02294	<i>Populus trichocarpa</i>
pUCP2 Arth	NP_172866	<i>Arabidopsis thaliana</i>
pUCP2 Chre	XP_001692254	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
UCP5 Trca	XP_969628	<i>Tribolium castaneum</i>
UCP5 Apme	XP_397152	<i>Apis mellifera</i>
UCP5 Drps	EAL30290	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
UCP5 Drer	XP_001972429	<i>Drosophila erecta</i>
UCP5 Drme	NP_729738	<i>Drosophila melanogaster</i>
UCP5 Dran	XP_001956581	<i>Drosophila ananassae</i>
UCP5 Brfl	XP_002208215	<i>Branchiostoma floridae</i>
KMCP Oran	XP_001514476	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>
KMCP Rano	NP_001013205	<i>Rattus norvegicus</i>
KMCP Mumu	NP_080508	<i>Mus musculus</i>
KMCP Bota	NP_001092365	<i>Bos taurus</i>
KMCP Eqca	XP_001491327	<i>Equus caballus</i>
KMCP Mamu	XP_001094879	<i>Macaca mulatta</i>
KMCP Patr	XP_509663	<i>Pan troglodytes</i>
KMCP Hosa	BAG52822	<i>Homo sapiens</i>
KMCP Modo	XP_001364135	<i>Monodelphis domestica</i>
KMCP Gaga	XP_417040	<i>Gallus gallus</i>
KMCP Tagu	XP_002195861	<i>Taeniopygia guttata</i>
KMCP Xetr	Q5XGI1	<i>Xenopus tropicalis</i>
KMCP Xela	NP_001085558	<i>Xenopus laevis</i>
UCP5 Dare	NP_956458	<i>Danio rerio</i>
UCP5 Rano	NP_445953	<i>Rattus norvegicus</i>
UCP5 Mumu	Q9Z2B2	<i>Mus musculus</i>
UCP5 Bota	NP_001039610	<i>Bos taurus</i>
UCP5 Cafa	XP_852497	<i>Canis familiaris</i>
UCP5 Eqca	XP_001500183	<i>Equus caballus</i>
UCP5 Patr	XP_529152	<i>Pan troglodytes</i>
UCP5 Hosa	O95258	<i>Homo sapiens</i>
UCP5 Mafa	BAE90272	<i>Macaca fascicularis</i>
UCP5 Modo	XP_001364135	<i>Monodelphis domestica</i>
UCP5 Gaga	NP_001012901	<i>Gallus gallus</i>
UCP5	XP_002164719	<i>Hydra magnipapillata</i>
OGC Tast	EED23072	<i>Talaromyces stipitatus</i>
OGC Pema	XP_002144937	<i>Penicillium marneffeii</i>
OGC Magr	XP_368781	<i>Magnaporthe grisea</i>
OGC Necr	XP_001728298	<i>Neurospora crassa</i>
OGC Gize	XP_388551.	<i>Gibberella zeae</i>
OGC Bofu	XP_001556408	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
OGC Scsc	XP_001596217	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
OGC Pabr	EEH38473	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
OGC Ajca	EEH09530	<i>Ajellomyces capsulatus</i>
OGC Coim	XP_001247492	<i>Coccidioides immitis</i>
OGC Asor	XP_001819396	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
OGC Asnig	XP_001394255	<i>Aspergillus niger</i>

OGC Asni	EAA65082	<i>Aspergillus nidulans</i>
OGC Asfu	XP_750662	<i>Aspergillus fumigatus</i>
OGC Nefi	XP_001257889	<i>Neosartorya fischeri</i>
OGC Ascl	XP_001267922	<i>Aspergillus clavatus</i>
OGC Saof	AAU11471	<i>Saccharum officinarum</i>
OGC Plbe	CAI04585	<i>Plasmodium berghei</i>
OGC Plch	CAH81078	<i>Plasmodium chabaudi</i>
OGC Brfl	XP_002232329	<i>Branchiostoma floridae</i>
OGC Ciin	XP_002128286	<i>Ciona intestinalis</i>
OGC Teni	CAF90256	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
OGC Sasa	ACI69984	<i>Salmo salar</i>
OGC Dare	AAH71521	<i>Danio rerio</i>
OGC Modo	XP_001371003	<i>Monodelphis domestica</i>
OGC Cani	XP_536607	<i>Canis familiaris</i>
OGC Rano	NP_071793	<i>Rattus norvegicus</i>
OGC Mumu	NP_077173	<i>Mus musculus</i>
OGC Mamu	XP_001097514	<i>Macaca mulatta</i>
OGC Poab	NP_001124629	<i>Pongo abelii</i>
OGC Patr	XP_523558	<i>Pan troglodytes</i>
OGC Hosa	CAA46905	<i>Homo sapiens</i>
OGC Eqca	XP_001504800	<i>Equus caballus</i>
OGC Ovar	NP_001120745	<i>Ovis aries</i>
OGC Bota	AAX08823	<i>Bos taurus</i>
OGC Xetr	AAH93472	<i>Xenopus tropicalis</i>
OGC Xela	AAH72308	<i>Xenopus laevis</i>
OGC Peco	EEB14865	<i>Pediculus humanus corporis</i>
OGC Trca	XP_975095	<i>Tribolium castaneum</i>
OGC Navi	XP_001605273	<i>Nasonia vitripennis</i>
OGC Neve	XP_001639936	<i>Nematostella vectensis</i>
OGC Brma	XP_001893008	<i>Brugia malayi</i>
OGC Cabr	CAE62839	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
OGC Cael	NP_493694	<i>Caenorhabditis elegans</i>
OGC 1 Drme	AAM11057	<i>Drosophila melanogaster</i>
OGC Drps	XP_001357756	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
OGC Drme	AAF56907	<i>Drosophila melanogaster</i>
OGC Anga	XP_552102.	<i>Anopheles gambiae</i>
UnkCPpha	XP_001782969	<i>Physcomitrella patens</i>
UnkCPisi	ABK24234	<i>Picea sitchensis</i>
UnkCVivi	XP_002285693	<i>Vitis vinifera</i>
UnkC2Vivi	XP_002274117	<i>Vitis vinifera</i>
UnkCTrpr	BAE71294	<i>Trifolium pratense</i>
UnkCARTH	AAN13106	<i>Arabidopsis thaliana</i>
UnkCPotr	XP_002306542	<i>Populus trichocarpa</i>
UnkCRico	EEF48606	<i>Ricinus communis</i>
UnkC2Arth	AAP42725	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DIC Necr	CAB91429	<i>Neurospora crassa</i>
DIC Asfu	EAL93595	<i>Aspergillus fumigatus</i>
DIC Cagl	CAG59339	<i>Candida glabrata</i>
DIC Sace	NP_013452	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

DIC Pian	CAE84416	<i>Pichia angusta</i>
DIC Pist	XP_001385868	<i>Pichia stipitis</i>
DIC Cadu	CAX41240	<i>Candida dubliniensis</i>
DIC Pigu	XP_001484058	<i>Pichia guilliermondii</i>
DIC Drps	EAL27531	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
DIC Drme	NP_610344	<i>Drosophila melanogaster</i>
DIC Neve	XP_001629043	<i>Nematostella vectensis</i>
DIC Ciin	XP_002126004	<i>Ciona intestinalis</i>
DIC Teni	CAG03725	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
DIC Dare	AAH49505	<i>Danio rerio</i>
DIC Xela	AAH70665	<i>Xenopus laevis</i>
DIC Xetr	NP_001017018	<i>Xenopus tropicalis</i>
DIC Rano	CAA11278	<i>Rattus norvegicus</i>
DIC Mumu	AAF03412	<i>Mus musculus</i>
DIC Hosa	CAB59892	<i>Homo sapiens</i>
DIC Mamu	XP_001111824	<i>Macaca mulatta</i>
DIC Patr	XP_001163658	<i>Pan troglodytes</i>
DIC Eqca	XP_001489670	<i>Equus caballus</i>
DIC Ovar	NP_001120763	<i>Ovis aries</i>
DIC Bota	XP_583360	<i>Bos taurus</i>
DIC Brma	XP_001901010.	<i>Brugia malayi</i>
DIC Cabr	CAE65781	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
DIC Cael	AAC46570	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DIC Navi	XP_001605171	<i>Nasonia vitripennis</i>
DIC Peco	EEB13332	<i>Pediculus corporis</i>
DIC Trca	XP_973010	<i>Tribolium castaneum</i>
DIC Drwi	XP_002073070	<i>Drosophila willistoni</i>
DIC Anga	XP_312758	<i>Anopheles gambiae</i>
DIC Cuqu	XP_001862945	<i>Culex quinquefasciatus</i>
DIC Cacl	ACO15396	<i>Caligus clemensi</i>
OAC Klla	XP_452102	<i>Kluyveromyces lactis</i>
OAC Cagl	XP_448721	<i>Candida glabrata</i>
OAC Sace	NP_012802	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
OAC Vapo	XP_001647483	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
OAC Loel	XP_001526155	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
OAC Caal	XP_716076	<i>Candida albicans</i>
OAC Pist	XP_001383163	<i>Pichia stipitis</i>
OAC Pigu	EDK40814	<i>Pichia guilliermondii</i>
ANT2 Klla	XP_454505	<i>Kluyveromyces lactis</i>
ANT2 Sakl	AAO32575	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
ANT2 Asgo	NP_985041	<i>Ashbya gossypii</i>
ANT2 Sace	NP_009523	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ANT2 Cagl	XP_446154	<i>Candida glabrata</i>
ANT2 Pija	CAB88027	<i>Pichia jadinii</i>
ANT2b Pist	XP_001384264	<i>Pichia stipitis</i>
ANT2 Pist	XP_001386347	<i>Pichia stipitis</i>
ANT2 Pigu	XP_001481936	<i>Pichia guilliermondii</i>
ANT2 Cadu	CAX41441	<i>Candida dubliniensis</i>
ANT2 Caal	XP_716829	<i>Candida albicans</i>

ANT2 Capa	AAC34595	<i>Candida parapsilosis</i>
ANT2 Deha	XP_459840	<i>Debaryomyces hansenii</i>
ANT1 Scpo	NP_595323	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ANT1 Magr	AAX07662	<i>Magnaporthe grisea</i>
ANT1 Gize	XP_386197	<i>Gibberella zeae</i>
ANT1 Necr	XP_963201	<i>Neurospora crassa</i>
ANT1 Poan	XP_001909827	<i>Podospora anserina</i>
ANT1b Asni	XP_001398880	<i>Aspergillus niger</i>
ANT1 Aste	XP_001212265	<i>Aspergillus terreus</i>
ANT1 Asor	XP_001816872	<i>Aspergillus oryzae</i>
ANT1 Asfu	XP_750288	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ANT1 Ascl	XP_001269624	<i>Aspergillus clavatus</i>
ANT1 Pech	CAP94466	<i>Penicillium chrysogenum</i>
ANT1 Asni	XP_661668	<i>Aspergillus nidulans</i>
ANT1 Phno	XP_001796004	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
ANT1 Tast	EED20116	<i>Talaromyces stipitatus</i>
ANT1 Pema	XP_002144143	<i>Penicillium marneffei</i>
ANT1 Sace	NP_013772	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ANT Yali	XP_505633	<i>Yarrowia lipolytica</i>
ANT3 Taru	BAD86711	<i>Takifugu rubripes</i>
ANT3 Dare	NP_775354	<i>Danio rerio</i>
ANT3 Xetr	NP_988913	<i>Xenopus tropicalis</i>
ANT3 Raru	BAA36507	<i>Rana rugosa</i>
ANT3 Xela	NP_001080495	<i>Xenopus laevis</i>
ANT3 Gaga	NP_989562	<i>Gallus gallus</i>
ANT3Tagu	ACH44055	<i>Taeniopygia guttata</i>
ANT1 Dare	NP_001122204.	<i>Danio rerio</i>
ANT1 Tagu	XP_002191653	<i>Taeniopygia guttata</i>
ANT1 Gaga	NP_001006443	<i>Gallus gallus</i>
ANT1 Xetr	NP_988909	<i>Xenopus tropicalis</i>
ANT1 Xela	NP_001085135	<i>Xenopus laevis</i>
ANT1 Eqca	XP_001491279	<i>Equus caballus</i>
ANT1 Ovar	NP_001120750	<i>Ovis aries</i>
ANT1 Bota	NP_777083	<i>Bos taurus</i>
ANT1 Orcu	NP_001076155	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
ANT1 Cafa	XP_532844	<i>Canis familiaris</i>
ANT1 Modo	XP_001363393	<i>Monodelphis domestica</i>
ANT1 Rano	AAH60533	<i>Rattus norvegicus]</i>
ANT1 Mumu	NP_031476	<i>Mus musculus</i>
ANT1 Hosa	NP_001142	<i>Homo sapiens</i>
ANT2 Tagu	ACH44053	<i>Taeniopygia guttata</i>
ANT2 Taac	Q000K2	<i>Tachyglossus aculeatus</i>
ANT2 Cafa	XP_851701	<i>Canis familiaris</i>
ANT2 Bota	NP_777084	<i>Bos taurus</i>
ANT2 Rano	NP_476443	<i>Rattus norvegicus</i>
ANT2 Poab	NP_001126815	<i>Pongo abelii</i>
ANT2 Hosa	P05141.6	<i>Homo sapiens</i>
ANT2 Mumu	NP_031477	<i>Mus musculus</i>
ANT3 Susc	NP_999583	<i>Sus scrofa</i>

ANT3 Ovar	NP_001120752	<i>Ovis aries</i>
ANT3 Bota	NP_777085	<i>Bos taurus</i>
ANT3 Hosa	NP_001627	<i>Homo sapiens</i>
ANT3 Modo	XP_001373505	<i>Monodelphis domestica</i>
PIC2 Sace	NP_010973	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PIC2 Tast	EED15520	<i>Talaromyces stipitatus</i>
PIC2 Pech	CAP86768	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PIC2 Asni	XP_001399552	<i>Aspergillus niger</i>
PIC2 Asfu	EAL93502	<i>Aspergillus fumigatus</i>
PIC Stpu	XP_783048	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
PIC Ciin	XP_002130023	<i>Ciona intestinalis</i>
PIC Dare	NP_957009	<i>Danio rerio</i>
PIC2 Dare	NP_998887	<i>Danio rerio</i>
PIC Sasa	ACN10336	<i>Salmo salar</i>
PIC Teni	CAF96756	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
PIC Osmo	ACO09144	<i>Osmerus mordax</i>
PIC Rasy	AAN04052	<i>Rana sylvatica</i>
PIC Xela	AAH46849	<i>Xenopus laevis</i>
PIC Xetr	NP_988928	<i>Xenopus tropicalis</i>
PIC Tagu	XP_002189725	<i>Taeniopygia guttata</i>
PIC Rano	NP_620800	<i>Rattus norvegicus</i>
PIC Mumu	NP_598429	<i>Mus musculus</i>
PIC Cafa	XP_532660	<i>Canis familiaris</i>
PIC Mafa	BAE91499	<i>Macaca fascicularis</i>
PIC Mamu	XP_001084021	<i>Macaca mulatta</i>
PIC Hosa	CAB56612	<i>Homo sapiens</i>
PIC Poab	NP_001126257	<i>Pongo abelii</i>
PIC Ovar	NP_001136367	<i>Ovis aries</i>
PIC Bota	AAI49997	<i>Bos taurus</i>
PIC Eqca	XP_001915632	<i>Equus caballus</i>
PIC Modo	XP_001371943	<i>Monodelphis domestica</i>
PIC Oran	XP_001506076	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>
PIC Chfu	O61703	<i>Choristoneura fumiferana</i>
PIC Anga	EAA08862	<i>Anopheles gambiae</i>
PIC Drme	AAF49734	<i>Drosophila melanogaster</i>
PIC Apme	XP_396960	<i>Apis mellifera</i>
PIC Neve	XP_001623906	<i>Nematostella vectensis</i>
PIC Cael	CAA53719	<i>Caenorhabditis elegans</i>
PIC Cabr	CAE75517	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
PIC Arth	BAB08283	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PIC Pasu	ABW74474	<i>Paeonia suffruticosa</i>
PIC Vivi	XP_002275325	<i>Vitis vinifera</i>
PIC Bepe	CAA69726	<i>Betula pendula</i>
PIC Potr	XP_002300143	<i>Populus trichocarpa</i>
PIC Rico	EEF49362	<i>Ricinus communis</i>
PIC Glma	BAA31582	<i>Glycine max</i>
PIC Metr	ABD32560	<i>Medicago truncatula</i>
PIC Loja	BAB83689	<i>Lotus japonicus</i>
PIC Orsa	XP_462662	<i>Oryza sativa</i>

PIC Zema	NP_001104842	<i>Zea mays</i>
PIC Chre	XP_001703470	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
PIC Pist	XP_001382539	<i>Pichia stipitis</i>
PIC Klla	XP_452174	<i>Kluyveromyces lactis</i>
PIC Sace	NP_012611	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PIC Cagl	XP_445984	<i>Candida glabrata</i>
PIC Pigu	XP_001486101	<i>Pichia guilliermondii</i>
PIC Deha	XP_457484	<i>Debaryomyces hansenii</i>
PIC Caal	EAL04873	<i>Candida albicans</i>
PIC Cadu	CAX45254	<i>Candida dubliniensis</i>