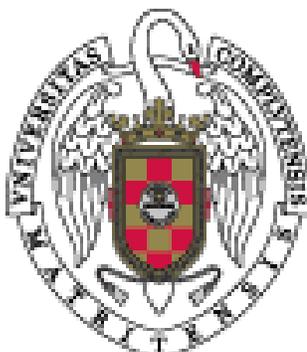




UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**BASES MOLECULARES DE LA ESPECIFICIDAD DE
LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP1 POR SU
LIGANDO ACTIVADOR**

TESIS DOCTORAL

JESÚS JIMÉNEZ JIMÉNEZ
Madrid, 2004





TESIS DOCTORAL

**BASES MOLECULARES DE LA ESPECIFICIDAD DE
LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP1 POR SU
LIGANDO ACTIVADOR**

Memoria Presentada por JESÚS JIMÉNEZ JIMÉNEZ
para optar al grado de Doctor en Biología

EDUARDO RIAL ZUECO, Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del C.S.I.C. en el Centro de Investigaciones Biológicas CERTIFICA que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada bajo mi dirección por el Licenciado Jesús Jiménez Jiménez, en el Departamento de Estructura y Función de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. (Madrid), durante los años 2000-2004.

Madrid a 26 de Mayo del 2004,

El Director del trabajo

VºBº, el Tutor

Dr. Eduardo Rial Zueco

Dr. Teresa Portolés Pérez

A mis padres y en especial a mi Abuela....



AGRADECIMIENTOS

"Sentir gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo"
William Arthur Ward

Me siento una persona muy afortunada. Muy afortunada por estar rodeado de un grupo de amigos y compañeros que siempre han tratado entenderme y ofrecerme su apoyo. Afortunado por haber tenido la oportunidad de adentrarme y conocer este "apasionante mundo" de la investigación, pero sobre todo... especialmente afortunado por tener la maravillosa familia que tengo. Sólo gracias a ellos he podido llegar hasta aquí, gracias a su eterno cariño, a sus esfuerzos y sacrificios, a su comprensión, a su saber empujarme cuando se inclinaba la vida, a la educación que me han dado, a su apoyo continuo y a mil cosas más....Por eso, millones de gracias Mamá y millones de gracias Papá, sois los mejores padres del mundo. Otro millón de gracias a ti hermanito, porque eres el prototipo de hermano que toda persona desearía tener, y a tí Abuelita, por ser el sustento de toda la familia y de miles de personas más. A vosotros, Tita y Tito otro millón de gracias por ser mis segundos padres y por demostrarme que la unión hace la fuerza. Y a mis otros hermanos Johny y María, otro millón de gracias por derrochar siempre palabras de ánimo y hacer mis inquietudes las vuestras. También gracias a ti Sofía, por tu consejo constante y como no...millones de gracias a tí mi Reina, por intentar comprenderme, por quererme tanto, por soportar todos esos malos momentos que estos últimos tiempos de agobio te han hecho pasar y por darme todo lo que me das. Os quiero muchísimo. Este trabajo os lo debo y va por vosotros...

Pero en estas líneas tengo mucho más que agradecer. Mis agradecimientos se remontan a aquel ya lejano mayo en el que "atterricé" en el laboratorio. Almudena, Susana y Ángeles, me llevaron de la mano al CIB y son las primeras personas de las que debo acordarme en este momento. Después, mi "instrucción" comenzó gracias a la paciencia, ayuda y consejos de Sonia Bañuelos, que me inició en "ésto" de la investigación. De ahí hasta ahora muchas personas han acompañado mi aventura y seguro que me dejaré alguna en el tintero. En primer lugar tengo bastante que agradecer a la gente del CIB. Gracias a ellos consiguieron que mi estancia aquí fuese de lo más agradable, y que en muchos momentos llegara a sentirme como en mi casa. Desde las vecinitas de enfrente del antiguo CIB (Anita, Leo, Eva, Marta, Maria José, Leti, Ali), pasando por otros compis de pasillo como Ana, Raúl, Tobi o Chus, o del departamento (Jose, Mariam, Sonia...), hasta la gente de los diversos servicios del centro como el comedor, limpieza, acceso, secretaría, electrónica, química de proteínas, administración, dirección, informática, biblioteca, compras...A todos ellos debo agradecerles el que en este momento de mi vida me de pena pasar la página correspondiente a estos cinco años. También debo y quiero agradecerle a Javier Rey y a la gente de su grupo (Susana, Merche, Ele, Paloma y Fernando) todas las molestias que se han tomado conmigo y porque sin ellos la impresión de esta memoria hubiese sido bastante más traumática y desde luego menos amena, de verdad, que pena no haberos tenido tan cerca antes. Mención aparte merecen tipos "curiosos" como Luis, siempre dispuesto a ayudar, pero que por mucho que lo ha intentado no ha conseguido que nos hagamos millonarios durante este tiempo. Gracias a todos.



Un agradecimiento especial tengo que tener con la gente de Luis Rivas. La cercanía a veces sí que hace el cariño y ellos desde un primer momento siempre han sido unos miembros más de nuestro laboratorio. Gracias a Esther por su eterna sonrisa y valioso apoyo en los momentos difíciles, a Jose por su compañía y consejos sobre todo en estos últimos tiempos de agobio y a Luque porque es un gran tipo y porque me ha ayudado a entender que el sentido del humor, a veces, no es tan universal. No me puedo olvidar de Luis, al que también tengo mucho que agradecer aparte de su directa colaboración en el soporte informático. De hecho, si no le hubiese conocido a él probablemente no estaría escribiendo estas líneas. Gracias Luis. Tampoco quisiera olvidarme de otras personas que pasaron por su labo y que también tienen su parcelita en mi corazón: Elena, Cristina, Inés, Rosario, María, Ana...Gracias.

¡¡Y que voy a decir de mis compañeros de viaje!! Todo lo que diga se quedaría bastante corto. Durante todos estos años, pero sobre todo en esta última etapa me han demostrado muchas cosas que pocas veces se sienten y que muchas menos se dicen o se exteriorizan. Me llevo tantos buenos recuerdos de vosotros...En primer lugar desde estas líneas quiero agradecer a Eduardo Rial toda la confianza que depositó en mí desde un primer momento. Su empatía, sus valiosos consejos científicos y su predisposición en todo momento para que la armonía y el ambiente familiar reinasen en el grupo, son una experiencia que me llevaré siempre conmigo. Gracias también a ti Paulita por haber estado ahí cuando más lo he necesitado, por dar glamour al laboratorio y por hacerme ver que en esta vida en muchas ocasiones el mejor camino es el más recto. Y a ti, Ama, otro millón de gracias. Tu inestimable ayuda en el diseño de este trabajo, tu complicidad y consejos, y lo agradable que era tu compañía han hecho que en esta última etapa se te haya echado mucho de menos. No me quiero tampoco olvidar de ti Susanita, porque independientemente del tiempo que estuviste, sólo las personas interesantes pueden dejar huella, y tú, la has dejado. Tú también Simone, tú también... Y para ti el final Pilar. Gracias por tus manos, que han sido las mías durante estos cinco años, por cuidarme tan bien, por "hacerme tu niño", por tener siempre un detalle conmigo, por tus consejos y gracias de verdad porque sin tu ayuda este trabajo no hubiese podido ser realizado. Ojalá sea cierto lo que hemos hablado varias veces y que por muchos años que pasen, la memoria de esta etapa nunca nos quede en el olvido. A todos, de corazón...MUCHAS GRACIAS.



I.- ÍNDICE	1
II.- ABREVIATURAS	7
III.- INTRODUCCIÓN	9
1.- GENERALIDADES	9
1.1.- LA TEORÍA QUIMIOSMÓTICA	9
1.2.- EL TEJIDO ADIPOSO PARDO	10
1.2.1.- FUNCIÓN	10
1.2.2.- LOCALIZACIÓN Y MORFOLOGÍA	11
1.2.3.- REGULACIÓN DE SU FUNCIÓN: LA TERMOGÉNESIS	11
2.- TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES	12
2.1.- MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DE LOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES	12
2.2.- SIMILITUD ESTRUCTURAL	15
2.3.- SIMILITUD FUNCIONAL	16
3.- LA UCP1	19
3.1.- DESCUBRIMIENTO DE LA UCP1	19
3.2.- TOPOLOGÍA DE LA UCP1	21
3.2.1.- ESTRUCTURA PRIMARIA Y SECUNDARIA DE LA UCP1	21
3.2.2.- EL GEN DE LA UCP1	22
3.2.3.- CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA UCP1	23
3.3.- ASPECTOS FUNCIONALES DE LA UCP1	24
3.3.1.- ESPECIES TRANSPORTADAS POR LA UCP1	24
3.3.2.- LOS NUCLEÓTIDOS DE PURINA INHIBEN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1	25
3.3.3.- LOS ÁCIDOS GRASOS ACTIVAN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1	26
3.3.3.1.- Mecanismo de activación del transporte mediado por ácidos grasos	28
3.3.4.- LOS RETINOIDES COMO REGULADORES DE LA UCP1	29
3.3.5.- LA UBIQUINONA (COQ ₁₀) ES UN COFACTOR IMPRESCINDIBLE PARA EL TRANSPORTE	30
3.4.- MODELOS DE TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1	30
3.5.- RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA UCP1	32
3.5.1.- RESIDUOS IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1	33
3.5.1.1.- Papel de los grupos SH	33
3.5.1.2.- Otros residuos implicados en el transporte	34
3.5.2.- LA UNIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS A LA UCP1	34
3.5.2.1.- Localización del dominio de unión del nucleótido	35



3.5.2.2.- Dependencia del pH de la unión del nucleótido	37
3.6.- MODELOS ESTRUCTURALES DE ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA UCP1	38
3.6.1.- ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LOS MONÓMEROS DE LA UCP1	40
3.6.2.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL SITIO DE UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO DE LA UCP1	42
3.6.3.- LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL AAC BOVINO Y DE SU DOMINIO DE UNIÓN DE NUCLEÓTIDOS	43
4.- PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A LA UCP1	45
4.1.- DESCUBRIMIENTO DE LAS NUEVAS UCPS	45
4.2.- ESTRUCTURA GÉNICA DE LAS NUEVAS UCPS	47
4.3.- ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS NUEVAS UCPS	51
4.4.- FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS NUEVAS UCPS	52
4.4.1.- LA UCP2	52
4.4.1.1.- La UCP2 como reguladora del metabolismo	52
4.4.1.2.- Control de las especies reactivas del oxígeno (ROS)	54
4.4.1.3.- Control del metabolismo de los ácidos grasos libres	55
4.4.1.4.- Control de la relación ATP:ADP e influencia en la diabetes tipo II	56
4.4.1.5.- Regulación a nivel molecular de la UCP2	57
4.4.2.- LA UCP3	58
4.4.2.1.- La UCP3 como reguladora de la termogénesis	59
4.4.2.2.- Posibles funciones fisiológicas de la UCP3	60
4.4.2.3.- Regulación a nivel molecular de la UCP3	61
4.4.3.- LA UCP4 Y BMCP1 (o UCP5)	62
4.4.4.- LAS UCPS DE PLANTAS	62
IV.- OBJETIVOS	63
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	65
1.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	65
1.1.- MICROORGANISMOS EMPLEADOS PARA LA MANIPULACIÓN DE LOS ADNc DE LA UCP1, UCP2 Y FORMAS MUTADAS	65
1.2.- VECTORES UTILIZADOS EN LA MANIPULACIÓN DE LOS ADNc DE LA UCP1, UCP2 Y FORMAS MUTADAS	65
1.2.1.- VECTOR DE CLONACIÓN	65
1.2.2.- VECTOR DE EXPRESIÓN EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	66
1.3.- MANIPULACIÓN DE LOS ADNc	67
1.3.1.- LIGACIONES	67
1.3.2.- DESFOSFORILACIONES	67
1.3.3.- DIGESTIONES	67
1.3.4.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	68



1.3.5.- PURIFICACIONES DE LOS FRAGMENTOS DE ADN	68
1.4.- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	69
1.4.1.- CEPA TG1 α	69
1.4.2.- CEPAS EPICURIAN COLI [®] <i>XL1-BLUE SUPERCOMPETENTE Y SCS110</i>	69
1.4.3.- SELECCIÓN DE CLONES POSITIVOS	70
1.4.4.- AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS OBTENIDOS	70
1.4.5.- ALMACENAMIENTO DE LOS CLONES BACTERIANOS OBTENIDOS	71
1.5.- TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS	71
1.5.1.- TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN	71
1.5.2.- TRANSFORMACIÓN POR ACETATO DE LITIO	72
1.5.3.- SELECCIÓN DE CLONES POSITIVOS. INMUNODETECCIÓN DE LA UCP1, UCP2 Y FORMAS MUTADAS: WESTERN-BLOTTING	73
1.5.4.- AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE PYEDP EN LEVADURAS	74
1.5.5.- ALMACENAMIENTO DE LOS CLONES DE LEVADURAS TRANSFORMADOS	75
1.6.- MUTAGÉNESIS	75
1.6.1.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	75
1.6.1.1.- Mutantes realizados a partir de pUC19	76
1.6.1.2.- Mutantes realizados a partir de pYeDP	79
1.6.2.- CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES Q-121 Y Q-212	81
1.6.3.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE LP1_A	82
1.6.4.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE LP2_C	83
1.6.5.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE LP1_A/LP2_C	84
1.6.6.- SECUENCIACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN Y CLONACIÓN	84
2.- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES	85
2.1.- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA UCP1, UCP2 Y DE SUS FORMAS MUTADAS EN LEVADURAS RECOMBINANTES. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE GENERACIÓN INSTANTÁNEO DE LAS LEVADURAS	85
2.2.- OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE LEVADURAS DE <i>S.CEREVISIAE</i>	86
2.3.-OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE TEJIDO ADIPOSEO PARDO	87
2.4.-VALORACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL	88
2.5.- MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN EN MITOCONDRIAS	88
3.- MEDIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS	88
VI.- RESULTADOS EXPERIMENTALES	91
1.- REGULACIÓN FISIOLÓGICA DEL TRANSPORTE DE PROTONES MEDIADO POR LA UCP1	91
1.1.- INFLUENCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS ENDÓGENOS EN LOS EXPERIMENTOS DE RESPIRACIÓN	91



1.2.- ELIMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ENDÓGENOS	92
1.3.- LA IMPORTANCIA DE LA ALBÚMINA EN LOS EXPERIMENTOS DE RESPIRACIÓN	94
2.- ACTIVACIÓN DE LA UCP1 POR ÁCIDO RETINOICO Y OTROS ÁCIDOS ORGÁNICOS	96
2.1.- SINERGISMO ENTRE LOS ÁCIDOS RETINOICO Y PALMÍTICO	99
2.2.- ACTIVACIÓN DE LA UCP2 POR ÁCIDO RETINOICO	100
3.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA UCP1	101
3.1.- ELECCIÓN DE LOS MUTANTES DE LA UCP1	101
3.2.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	108
3.2.1.- MUTANTES REALIZADOS A PARTIR DE PUC19	108
3.2.2.- MUTANTES REALIZADOS A PARTIR DE PYEDP	110
3.2.3.- CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES Q-121 Y Q-212	111
3.2.4.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE LP1_A	112
3.2.5.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE LP2_C	113
3.2.6.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE LP1_A/LP2_C	115
4.- ESTUDIOS IN SITU CON LEVADURAS	117
4.1.- ESTANDARIZACIÓN DE VALORES DE LAS CEPAS REFERENCIA	117
4.1.1.- COMPORTAMIENTO BAJO CONDICIONES RESPIRATORIAS DE MITOCONDRIAS REFERENCIA	117
4.1.2.- EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EXÓGENAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS	120
4.2.- ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS QUIMERAS MAYORES	121
4.2.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS	121
4.2.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS MAYORES	122
4.2.2.1.- Definición de los fenotipos bioenergéticos posibles	124
4.2.2.2.- Clasificación del fenotipo de las quimeras mayores	125
4.3.- ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS MUTANTES DEL <i>LOOP</i>II DE LA UCP1 Y UCP2	127
4.3.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS	127
4.3.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS DEL <i>LOOP</i> II DE LA UCP1 Y UCP2	130
4.3.2.1. Clasificación del fenotipo de las quimeras del <i>loop</i> II	130
4.4.- ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS MUTANTES TRANSMEMBRANA DE LA UCP1	133
4.4.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS	133
4.4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS TRANSMEMBRANA DE LA UCP1	135
4.4.2.1.- Clasificación del fenotipo de las quimeras transmembrana	135
4.5.- ESTUDIO FUNCIONAL DE MUTANTES ESTRUCTURALES Y QUIMERAS DE LOS DOMINIOS I Y III DE LA UCP1	137
4.5.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS	138



4.5.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES ESTRUCTURALES Y DE LAS QUIMERAS DEL <i>LOOP</i> I Y III DE LA UCP1	140
4.5.2.1.- Clasificación del fenotipo de las quimeras de la UCP1	140
VII.- DISCUSIÓN	143
1.- LA ACTIVIDAD DE LA UCP1 EN AUSENCIA DE ÁCIDOS GRASOS	143
2.- NATURALEZA DEL SITIO DE UNIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA UCP1	147
3.- REGIONES DE LA UCP1 IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE SU ACTIVIDAD TRANSPORTADORA	149
3.1.- RESIDUOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA UCP1 POR NUCLEÓTIDOS	150
3.1.1.- ARGININAS Y UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO	151
3.1.2.- LAS TRES REPETICIONES LA UCP1 Y SU IMPORTANCIA EN LA REGULACIÓN POR NUCLEÓTIDOS	151
3.1.3.- EL DOMINIO II DE LA UCP1 ES ESENCIAL PARA LA INHIBICIÓN POR NUCLEÓTIDOS	152
3.1.4.- PAPEL DE LOS <i>LOOPS</i> MATRICIALES EN LA UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO Y LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE EN LA UCP1	155
3.2.- MODELO ESTRUCTURAL PARA LA UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO A LA UCP1	156
3.3.- RESIDUOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSPORTADORA DE LA UCP1 POR ÁCIDOS GRASOS	157
3.4.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSPORTADORA DE LA UCP1 POR ÁCIDO RETINOICO	161
VIII.- CONCLUSIONES	163
IX.- BIBLIOGRAFÍA	165
XX.- ANEXO PUBLICACIONES	185



**ABREVIATURAS**

$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$	Gradiente de potencial electroquímico de protones
ΔpH	Gradiente de pH
$\Delta\psi$	Potencial de membrana
AAC	Translocasa de adenín nucleótidos (ADT o ANT).
AGC	Transportador de glutamato/aspartato
BMCP1	Proteína desacoplante cerebro 1
CAC	Transportador de carnitina/acilcarnitina
CoQ₁₀	Ubiquinona
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico (<i>c-AMP Response Element Binding</i>)
CTC	Transportador tricarboxilatos
DIC	Transportador de dicarboxilatos
EDTA	Ácido etilendiamín-tetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(aminoetil)-N,N,N',N'-tetracético
FCCP	Carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona
FDNP-ATP	3'-O-(5-fluoro-2,4-dinitrofenil)-ATP
GC	Transportador de glutamato
GNC	Transportador de glutamina
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactósido
OAC	Transportador de oxalacetato
ODC	Transportador de oxodicarboxilatos
OGC	Transportador de oxoglutarato
ORC	Transportador de ornitina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
PiC	Transportador de fosfato
PMSF	Fenil-metilsulonilfluoruro
PPAR	Receptores Activadores de la Producción de Peroxisomas (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
PTP	Poro de transición de la permeabilidad (<i>permeability transition pore</i>)
PYC	Transportador de piruvato
RARE	Elemento de respuesta a ácido retinoico (<i>retinoic acid response element</i>)



RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	Resonancia paramagnética electrónica
SAB	Seroalbúmina bovina
SDS	Lauril sulfato sódico
SFC	Transportador de succinato/fumarato
TAB	Tejido adiposo blanco
TAP	Tejido adiposo pardo
TNFα	Factor α de necrosis tumoral
UCP1	Proteína desacoplante 1 (<i>uncoupling protein</i>)
UCP2	Proteína desacoplante 2
UCP3	Proteína desacoplante 3
UCP4	Proteína desacoplante 4
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1.- GENERALIDADES

1.1.- LA TEORÍA QUIMIOSMÓTICA

En 1961, en tiempos en los cuales se buscaba un intermediario químico para explicar el acoplamiento entre la oxidación de los sustratos y la producción de energía, Peter Mitchell formuló la denominada hipótesis quimiosmótica de la fosforilación oxidativa [Mitchell, 1961]. Esta teoría establece que la cadena transportadora de electrones está acoplada a la síntesis de ATP mediante un gradiente de potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) que se crea a través de las membranas transductoras de energía [Mitchell, 1976].

Durante la respiración mitocondrial, la oxidación de sustratos genera un flujo de electrones a través de la cadena respiratoria que se encuentra estrechamente acoplado al bombeo de protones fuera de la matriz (figura 1). La membrana interna mitocondrial es impermeable a los protones, por lo que su exclusión de la matriz genera un $\Delta\mu_{H^+}$ que estará compuesto de dos componentes, la diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) y la diferencia de potencial químico (ΔpH). La energía de este gradiente se utilizará para la producción de ATP a través de la ATPsintasa o para el transporte de metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial.

En estado estacionario, el bombeo de protones a través de la cadena respiratoria tiene que estar estrechamente compensado por la reentrada de éstos en la matriz. La principal vía de reentrada de los protones en la matriz es la ATPsintasa, aunque también parte del gradiente de potencial electroquímico de protones es usado para el transporte de iones y metabolitos. Se puede decir entonces, que el flujo de protones se encuentra acoplado a la síntesis de ATP, y que por lo tanto, la velocidad de la respiración está controlada principalmente por la demanda de ATP en la célula [revisión Nicholls & Ferguson, 2002].

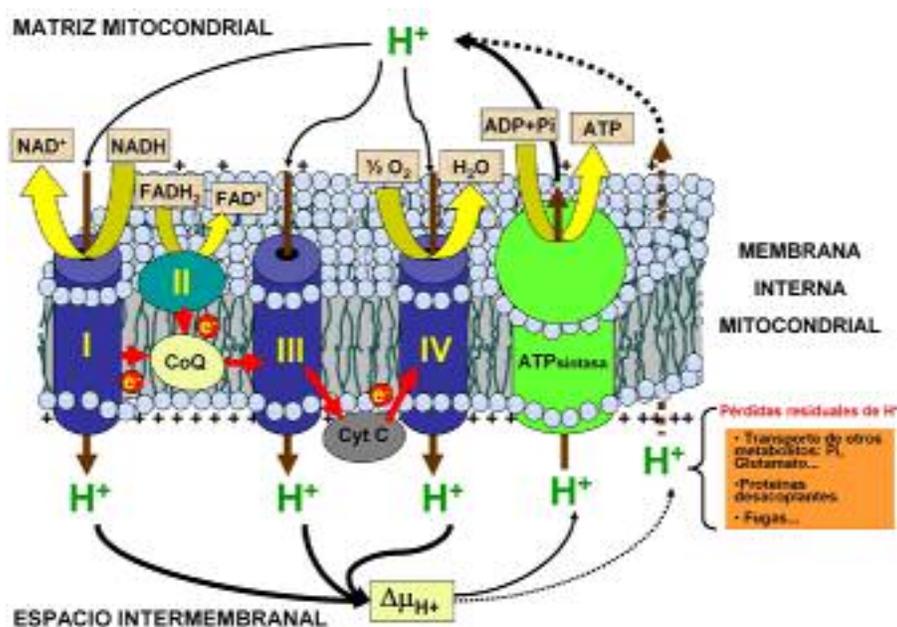


Figura 1 Esquema del proceso de generación del gradiente de potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). Se señalan los principales componentes de la cadena de transporte electrónico, la ATPsintasa y las distintas vías de reentrada de los protones en la matriz



Sin embargo en determinadas situaciones, como en la termogénesis, interesa eludir el control respiratorio para disipar la energía en forma de calor. Esto ocurre, por ejemplo, en las mitocondrias del tejido adiposo pardo (TAP), en un proceso que implica la existencia de una vía alternativa a la ATPsintasa para la reentrada de los protones en la matriz. Esta vía es la proteína desacoplante 1 o UCP1, del inglés *uncoupling protein* (figura 2) [revisiones Nicholls & Rial, 1999; Klingenberg & Huang, 1999; Nedergaard *et al.*, 2001].

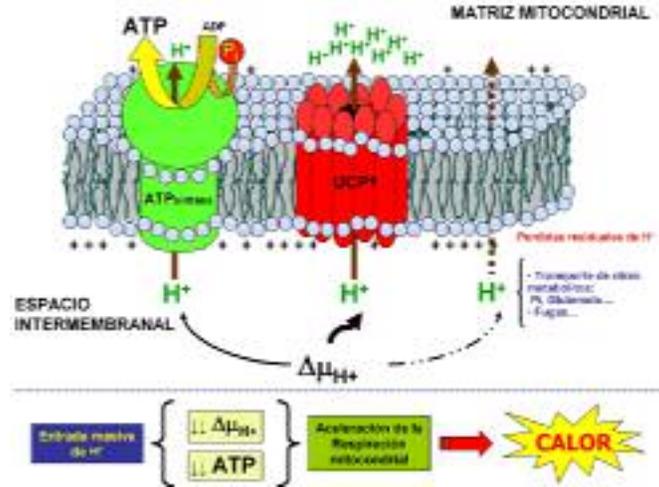


Figura 2 Esquema general de la ruta de protones durante la termogénesis en mitocondrias de tejido adiposo pardo. Durante la termogénesis, el acoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa se rompe debido a que se activa la UCP1 y se permite la reentrada de H⁺ a la matriz. Esto provoca una rápida disminución en el potencial de membrana mitocondrial que hace que la respiración se acelere y la energía generada se desprenda en forma de calor.

1.2.- EL TEJIDO ADIPOSO PARDO

En 1551 Conrad Gesner, al describir el tejido interescapular de marmota, observó que la grasa parda constituía un tejido distinto al tejido adiposo blanco (TAB) [Gesner *et al.*, 1551]. Si bien hasta 1817 se pensó que formaba parte del timo y que tenía una función endocrina, posteriormente se generalizó la idea de que era un tejido graso modificado cuya función se limitaba a ser un depósito de grasa. A principios de siglo se retomó la creencia de un papel endocrino del tejido, pero no fue hasta principios de los 60 cuando se demostró su función termogénica [revisión Trayhurn & Nicholls, 1986].

1.2.1.- FUNCIÓN

La principal función del TAP es la de generar calor en un proceso denominado termogénesis sin tiritación. Este proceso es vital para los animales hibernantes y para todos los mamíferos en el momento de nacer, ya que ayuda a compensar la pérdida de calor al abandonar el ambiente intrauterino materno. Durante el desarrollo, la actividad termogénica disminuye y el tejido involuciona hasta convertirse en morfológicamente indistinguible del TAB [revisión Trayhurn & Nicholls, 1986].

En animales hibernantes y otros pequeños mamíferos, la regresión es sólo parcial y el tejido se vuelve a estimular durante la vida adulta en situaciones de exposición al frío [Nicholls & Locke, 1984] o con una dieta hipercalórica [Himms-Hagen, 1989]. Sin embargo, en humanos adultos no existen evidencias de la estimulación del tejido [Trayhurn & James, 1983]. En roedores, se ha descrito su implicación en la regulación del peso corporal [Rothwell & Stock, 1979].



1.2.2.- LOCALIZACIÓN Y MORFOLOGÍA

La elevada actividad termogénica del TAP requiere una gran vascularización tanto para el aporte de oxígeno y sustratos como para el transporte del calor producido a otros tejidos. Por ello, se encuentra situado en zonas muy vascularizadas e inervadas simpáticamente. A nivel global, incluso en recién nacidos, representa un pequeño porcentaje del peso corporal que va desde el 1% al 5% en animales adultos adaptados al frío. Se localiza principalmente en las siguientes regiones (figura 3):



Figura 3 Localización, en las regiones interescapular y axilar, del TAP en roedores.

- cavidad abdominal,
- en la zona periaórtica rodeando órganos vitales como los riñones y corazón,
- en las regiones interescapular, cervical y axilar,
- rodeando al tiroides y al timo,
- asociado con la caja torácica, los músculos intercostales y el esternón.

La célula predominante en este tejido es el adipocito pardo. Se caracteriza por presentar en su citoplasma un núcleo localizado en posición central y numerosos depósitos multiloculares de triglicéridos. Contiene un elevado número de mitocondrias con una membrana interna muy desarrollada, y esto es lo que confiere al tejido su elevada capacidad respiratoria (figura 4). El resto de orgánulos del adipocito pardo quedan reducidos a un pequeño espacio citoplásmico, y aunque existen muchos ribosomas libres, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de estas células son prácticamente inexistentes [Afzelius, 1970]. Cuando el tejido se inactiva, los depósitos de triglicéridos se expanden y funden hasta formar una única gota lipídica que pasa a abarcar gran parte del citoplasma.

1.2.3.- REGULACIÓN DE SU FUNCIÓN: LA TERMOGÉNESIS

La capacidad termogénica que presenta este tejido se debe a la presencia de la proteína desacoplante UCP1 en la

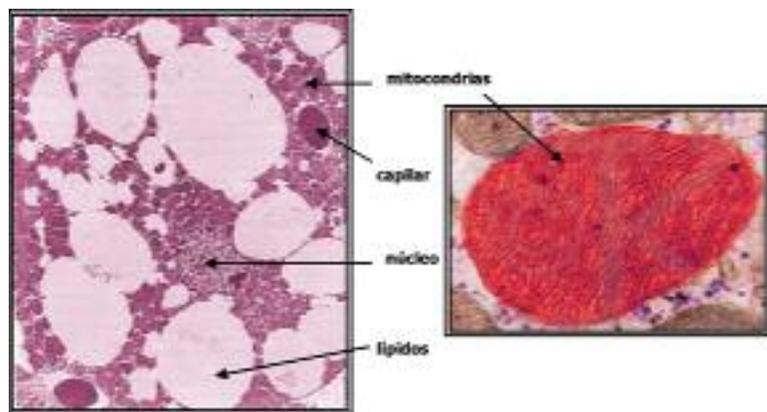


Figura 4 Imagen al microscopio electrónico de un adipocito marrón. Se observan todos sus orgánulos y en detalle sus mitocondrias. Modificado de Trayhurn & Nicholls, [1986].



membrana interna de las mitocondrias de los adipocitos. La UCP1 desacopla la respiración de la síntesis de ATP, ya que permite la reentrada de los protones a la matriz, disipando el gradiente de potencial electroquímico de protones en forma de calor. La regulación de la termogénesis depende del sistema nervioso simpático y el esquema general del proceso es el que se representa en la figura 5 [revisiones Nicholls & Locke, 1984; Rial & González-Barroso, 2001].

La noradrenalina, liberada por las numerosas fibras simpáticas que inervan el tejido, actúa a nivel de los receptores β -adrenérgicos de la membrana citoplásmica del adipocito y se produce entonces una activación de la adenilato ciclasa que eleva los niveles citoplásmicos de AMPc. El aumento de los niveles de AMPc, por una parte hace que la expresión del gen de la UCP1 se estimule, y por otra, que se desencadene la cascada lipolítica. El AMPc provoca que una proteína quinasa active a una lipasa sensible a hormonas con lo que se permite la liberación de ácidos grasos de los depósitos citoplásmicos de triglicéridos.

Los ácidos grasos liberados, por un lado actúan sobre la UCP1 activando el transporte de protones mediado por ella y originando la producción de calor, y por otro, se activan a acil-CoA, que se convierte en acil-carnitina lista para ser transportada al interior de la matriz mitocondrial. Dentro de la matriz los ácidos grasos son oxidados en el proceso de β -oxidación y los electrones producidos en esta reacción son transferidos a la cadena respiratoria para que la generación del gradiente de potencial electroquímico de protones tenga lugar [revisión Nicholls & Locke, 1984].

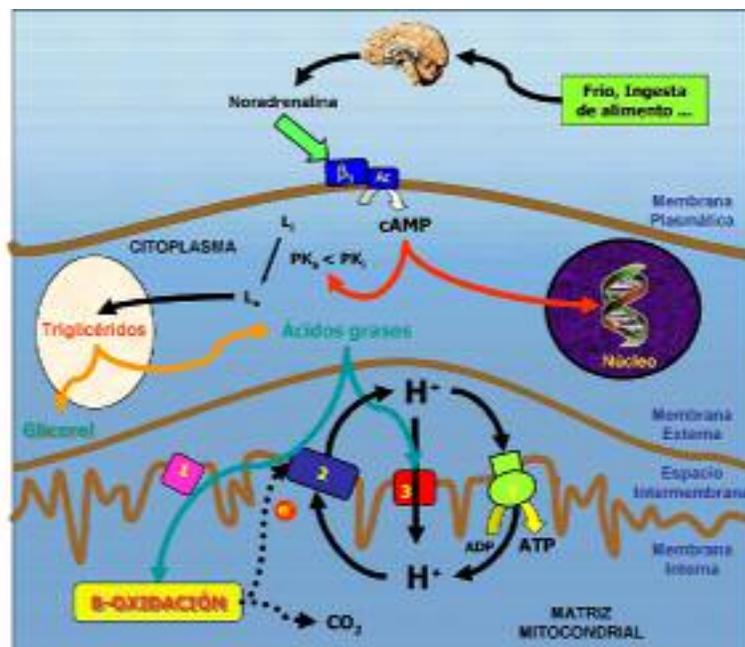


Figura 5 Procesos celulares implicados en la regulación de la termogénesis en el adipocito pardo. Vienen representados: (1) Transportador de carnitina; (2) Cadena respiratoria mitocondrial; (3) UCP1; (4) ATPsintasa; (PK_a) Proteína quinasa activa; (PK_i) Proteína quinasa inactiva; (L_h) Lipasa sensible a hormonas activa; (L_i) Lipasa sensible a hormonas inactiva; (L_a) Lipasa sensible a hormonas activa. Ver texto para explicación.

2.- TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES

2.1.- MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DE LOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES

La importancia vital de la mitocondria en la fisiología de las células requiere un continuo tráfico de metabolitos a través de sus membranas. Este hecho implica la existencia de un eficiente sistema de transporte de los metabolitos claves para el



desarrollo de la fosforilación oxidativa y del resto de sus funciones metabólicas (β -oxidación, ciclo de Krebs...). Las proteínas encargadas del transporte de metabolitos en la mitocondria forman una superfamilia de proteínas relacionadas entre las cuales se encuentra la familia de las UCPs.

Actualmente en mitocondrias de mamíferos, se han caracterizado las siguientes proteínas transportadoras [revisiones en Krämer & Palmieri, 1992; Walker & Runswick, 1993; Palmieri, 1994; Palmieri *et al.*, 1996; Palmieri, 2004]:

- La translocasa de adenín nucleótidos (AAC, ADT o ANT). Presenta tres isoformas (AAC1, AAC2 y AAC3) y cataliza el intercambio del ATP generado en la matriz por ADP citoplásmico.
- Las proteínas desacoplantes o UCPs (UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, BMCP1 y UCPs de plantas), introducen protones y aniones (como Cl^- , NO_3^- y otros aniones halogenuros) en la matriz mitocondrial mediante un mecanismo de uniporte.
- El transportador de fosfato (PiC); también con 2 isoformas (PiC-A y PiC-B), media el antiporte de fósforo inorgánico (Pi) con OH^- de la matriz. Experimentalmente este mecanismo es indistinguible de un simporte de Pi y H^+ hacia la matriz mitocondrial por lo que no es descartable que éste sea el mecanismo.
- El de piruvato (PYC), que introduce mediante antiporte piruvato intercambiándolo por un OH^- de la matriz.
- El de oxoglutarato (OGC), que transporta mediante antiporte 2-oxoglutarato y malato.
- El de glutamato/aspartato (AGC). Se le conocen dos isoformas, aralar1 y citrina y tienen la especial peculiaridad de ser los primeros transportadores mitocondriales que presentan dominios de unión de calcio [Del Arco *et al.*, 2000]. Su función es aportar equivalentes *redox* del citosol a la mitocondria translocando una molécula glutamato acompañada de un H^+ por aspartato.
- El de dicarboxilatos (DCC o DIC). Cataliza el transporte electroneutro de dicarboxilatos (malato, succinato...) por fósforo inorgánico o ciertos compuestos azufrados como sulfato o tiosulfato.
- El de citrato o tricarboxilatos (CTC o CIC). Introduce en la matriz citrato y un protón mediante el antiporte con malato.
- El de carnitina (CAC). Mediante antiporte, transporta acilcarnitina hacia la matriz, liberando carnitina en el espacio intermembrana.



- El de ornitina (ORC). Exporta ornitina al espacio intermembrana. Introduce un H^+ a favor de gradiente por cada ornitina exportada al citosol para generar poliaminas y arginina.
- El de glutamato (GC). Introduce glutamato en la matriz mitocondrial mediante antiporte con iones OH^- .
- El de glutamina (GNC). Desplaza un OH^- de la matriz hacia el espacio intermembrana, introduciendo una molécula de glutamina.

La expresión de estos transportadores en las mitocondrias de los distintos tejidos es variable. Algunos de ellos están presentes en todas las mitocondrias (AAC y PiC), otros en la mayoría (PYC, CAC, OGC y AGC) y el resto se localiza en mitocondrias de células con importancia en procesos específicos como la gluconeogénesis (DIC), termogénesis (UCP1), la síntesis de ácidos grasos y lípidos (CIC) o la síntesis de urea (ORC, GC y GNC).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito la existencia de 35 genes que podrían codificar para transportadores mitocondriales [revisión Palmieri *et al.*, 2000]. De ellos, únicamente se han caracterizado 11 entre los cuales (aparte de las tres isoformas del AAC, del CIC, del PiC, del ORC, del CAC, y del DIC) hay que citar:

- El de succinato/fumarato (SFC). Este transportador introduce en la matriz el succinato producido en el citosol en la ruta del glioxilato mediante un intercambio con fumarato.
- El de oxalacetato (OAC). Cataliza el transporte de oxalacetato al interior de la mitocondria mediante un mecanismo de antiporte con sulfato.
- El de oxodicarboxilatos (ODC). Su función es extraer el 2-oxoglutarato y el 2-oxoadipato de la matriz al citosol para que allí se sinteticen tanto glutamato como lisina respectivamente.

Respecto a las UCPs, actualmente ya se han descrito 45 genes que codifican para proteínas homólogas a la original UCP1. El análisis detallado de los distintos genes identificados, ha permitido establecer la existencia de isoformas de UCPs tanto en animales como en plantas [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000; Ledesma *et al.*, 2002b]. En animales, las isoformas descritas hasta el momento son cinco, la UCP1, de expresión exclusiva del TAP; la UCP2, presente en numerosos tejidos de mamíferos; la UCP3, identificada en el músculo esquelético y TAP, la UCP4, con expresión exclusiva en cerebro y la BMCP1 (o UCP5), con expresión mayoritaria en cerebro e hígado pero con niveles de ARNm detectable en numerosas localizaciones. Si bien se acepta que la UCP1 cataliza la reentrada de H^+ en la matriz celular, el papel fisiológico y funcional de las nuevas UCPs es aún motivo de controversia y existen numerosas hipótesis al respecto [revisión Adams *et al.*, 2000; Bouillaud *et al.*, 2001].



2.2.- SIMILITUD ESTRUCTURAL

Las secuencias aminoacídicas de la mayoría de estos transportadores ya están disponibles en el servidor *Swiss-Prot/TrEMBL* [<http://us.expasy.org/sprot/>] y existen numerosas revisiones que analizan sus relaciones estructurales y funcionales [Kuan & Saier, 1993; Walker & Runswick, 1993, Indiveri *et al.*, 1997, Palmieri *et al.*, 2000; Palmieri, 2004].

Del estudio de sus secuencias se ha comprobado que presentan propiedades estructurales muy similares. Todos ellos están formados por unos 300 aminoácidos con una elevada homología entre ellos. Muestran una estructura organizada en tres dominios, caracterizados por la presencia de una secuencia de unos 100 aminoácidos que se repiten tres veces. Cada dominio a su vez, contiene dos regiones hidrofóbicas y una hidrofílica que las une. La conexión entre los dominios tiene lugar mediante otra pequeña región hidrofílica. La gran homología existente entre los dominios y a su vez entre todos estos transportadores, hace pensar que los tres dominios derivan de la triplicación de una secuencia ancestral común a partir de la cual han surgido los distintos transportadores mitocondriales (ver figura 6) [revisión Walker, 1992; Walker & Runswick, 1993; Palmieri, 2004].

De acuerdo con estas observaciones, se propuso para todos ellos el modelo estructural de la figura 7. Como se observa, la estructura se basa en la existencia de seis hélices α transmembranales, separadas por tres grandes regiones de naturaleza hidrofílica que están orientadas hacia la matriz y otras dos regiones menores, también hidrofílicas, orientadas hacia el espacio intermembrana. Tanto el extremo N-terminal como C-terminal de la proteína se orientan hacia la cara citoplásmica de la membrana [Saraste & Walker, 1982; Walker & Runswick, 1993]. Recientemente, el descubrimiento mediante técnicas de cristalografía de rayos X de la estructura tridimensional del AAC bovino ha confirmado la validez de este modelo [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003] (ver punto 3.6.3).

El alineamiento de las secuencias de estos transportadores muestra que, dentro de su elevada homología, existen unos cuantos aminoácidos estrictamente conservados en todos los miembros de la superfamilia (ver figura 8):

- Hacia el final del extremo C-terminal de la primera hélice de cada uno de los dominios repetidos de la estructura tripartita, se identificó el motivo: P-x-[D/E]-x₂-[R/K], siendo "x" cualquier aminoácido.

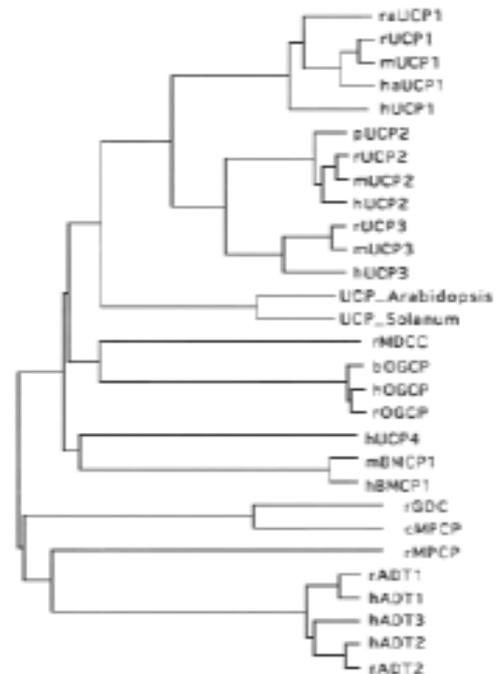


Figura 6 Árbol evolutivo de los distintos transportadores mitocondriales. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la distancia evolutiva existente entre las secuencias. Abreviaturas: MDCC (DIC), OGCP (OGC), MPCP (PIC), GDC (Proteína del mal de Graves) y ADT (AAC). Datos extraídos de Ricquier & Bouillaud, [2000].

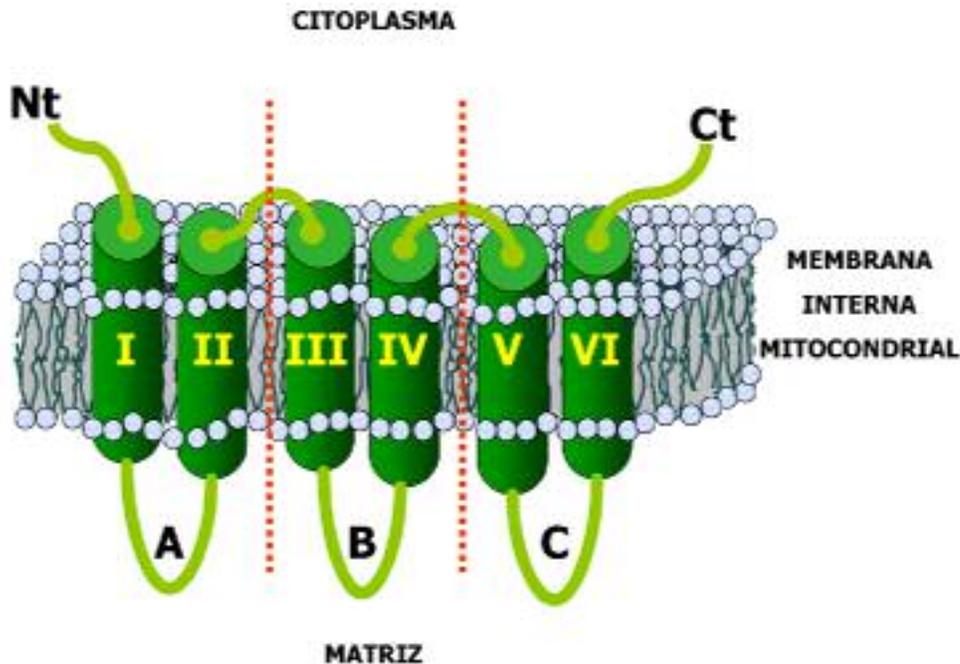


Figura 7 Modelo estructural para los miembros de la superfamilia de transportadores mitocondriales. Las líneas discontinuas separan los tres dominios homólogos que forman la estructura tripartita. Cada dominio consta de dos dominios transmembrana (I, II, III, IV, V y VI) unidos por una región hidrofílica o "loop" (A, B y C). Interconectando los tres dominios existen otras dos regiones hidrofílicas más pequeñas, que al igual que los extremos N-terminal y C-terminal, se sitúan hacia la cara citoplásmica [Walker & Runswick, 1993].

- En el extremo C-terminal del *loop* matricial de cada repetición, el segundo motivo identificado fue: [D/E]-G-x₄-a-[K/R]-G, siendo en este caso "a" cualquier aminoácido aromático. Varios autores sitúan como esenciales estos residuos para la importación e inserción en la membrana interna mitocondrial a través del complejo Tim10/Tim12/Tim22 [Sirrenberg *et al.*, 1998; Koehler *et al.*, 1998].

Por ello, la secuencia P-x-[D/E]-x-[L/I/V/A/T]-[R/K]-x-[L/R/H]-[L/I/V/M/F/Y]-[Q/G/A/I/V/M] (con número de acceso PS00215 en el servidor *PROSITE* (<http://us.expasy.org/prosite>)) se ha empleado para el reconocimiento de nuevos miembros de la superfamilia de los transportadores mitocondriales [El Moulaj *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 2000].

2.3.- SIMILITUD FUNCIONAL

Para una caracterización funcional de estos transportadores se emplean principalmente cuatro métodos de estudio:

- El aislamiento de las mitocondrias que los contienen y el posterior estudio *in vitro* de éstas. [Darley-Usmar, 1987].



- El aislamiento, purificación y reconstitución de los transportadores a partir de mitocondrias aisladas [Palmieri *et al.*, 1993].
- La sobreexpresión de la proteína en bacterias, purificación y reconstitución en liposomas [Palmieri *et al.*, 1995; Indiveri *et al.*, 1998].
- La clonación del ADNc del transportador en un vector de expresión, la expresión de éste en levaduras de la especie *S. cerevisiae* y el posterior análisis *in vitro* de las mitocondrias purificadas [Darley-Usmar, 1987].

Atendiendo a los resultados obtenidos en los diferentes estudios, se han observado una serie de similitudes funcionales en todos los transportadores mitocondriales (revisiones Palmieri *et al.*, 1993; Palmieri, 2004):

- Bajo determinadas situaciones, todos son capaces de transportar sustancias de naturaleza aniónica por lo que también reciben el nombre de transportadores mitocondriales de aniones.
- Realizan el transporte de las moléculas a través de las membranas mediante un mecanismo secuencial de antiporte de sustratos. Este mecanismo implica la formación de un compuesto ternario entre las moléculas interna, externa y el transportador antes de que se produzca el transporte [Palmieri *et al.*, 1993, Palmieri, 1994]. La excepción a esta particularidad la constituyen las UCPs, que catalizan un uniporte de H⁺ o aniones, y el CAC, que funciona de un modo dual realizando uniporte de carnitina o simporte de carnitina/acil-carnitina (mecanismo tipo *ping pong*).
- Se ha visto que modificando químicamente sus grupos SH o bajo condiciones de *patch clamp*, pueden adoptar cinéticas tipo poro o canal (ver sección 3.6). Debido a esto, se piensa que todos están organizados en dos dominios funcionales: un dominio transportador que correspondería al elemento evolutivamente conservado en todos ellos y que presenta un comportamiento tipo canal y otro dominio que hace de "puerta" (del inglés *gating domain*) y que es el directamente responsable de conceder especificidad a la proteína [revisiones Arechaga *et al.*, 2001; Ledesma *et al.*, 2002a].

De este modo se acepta un modelo cinético común a todos estos transportadores mitocondriales, el "modelo del poro con sitio de unión único regulado por puertas" (del inglés *single binding center gated pore*) (figura 9) [Klingenberg, 1991; revisión Arechaga *et al.*, 2001]. Este modelo propone que en el núcleo del transportador debe existir una vía de translocación (o poro) de naturaleza hidrofílica cuyo acceso está regulado por dominios que actúan a modo de "puerta".

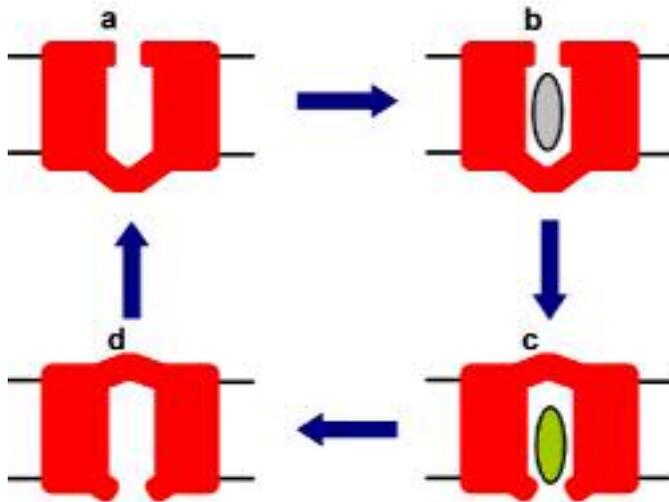


Figura 9 Modelo cinético del poro con sitio de unión único regulado por puertas (SBCGP). El ciclo catalítico empieza cuando el transportador no tiene unido ningún sustrato y una de las puertas de acceso al sitio de unión permanece abierta. **(a)** El sustrato se une al transportador **(b)** y la energía de la interacción proteína sustrato lleva a un reordenamiento conformacional que ocasionará la translocación **(c)**. La puerta de acceso situada en el lado opuesto de la membrana se abre y el sustrato se disocia **(d)**. El transportador sin sustrato regresa al estado original permitiendo el acceso al sitio de unión desde el otro lado de la membrana.

3.- LA UCP1

3.1.- DESCUBRIMIENTO DE LA UCP1

Los primeros que sugirieron que las mitocondrias del TAP presentaban una baja eficiencia energética fueron Lepkovsky *et al.* [1959]. Estos autores observaron que mientras en hígado el cociente P/O (moles de ATP producidos por mol de oxígeno consumido) era de 1.8, en el tejido adiposo pardo el cociente era muy próximo a cero incluso cuando los valores de consumo de oxígeno de ambos tejidos eran similares. En 1967, Lindberg *et al.* observaron que un homogenizado conjunto de tejido hepático y adiposo marrón proporcionaba un cociente P/O equivalente a la mezcla de ambos, o lo que es lo mismo, a la mezcla de mitocondrias acopladas (con P/O próximo a 1.8) y desacopladas (con P/O próximo a 0) en las proporciones de partida. Este descubrimiento indicó que el factor que disminuía la eficiencia energética de las mitocondrias era específico del tejido adiposo pardo.

En un principio se pensó que esta disminución en el rendimiento energético podía ser consecuencia de la pérdida de la maquinaria del proceso de fosforilación oxidativa. Esta hipótesis fue desechada en experimentos posteriores que demostraron la elevada capacidad de los ácidos grasos para disminuir el rendimiento en la producción de ATP de las mitocondrias de TAP comparándolas con las de hígado o cerebro. Se comprobó que las mitocondrias de TAP eran capaces de sintetizar ATP, aunque para ello era requisito imprescindible retirar con albúmina los ácidos grasos presentes en las preparaciones [Guillory & Racker, 1968]. Al año siguiente, Hittelman *et al.* [1969] vieron que si se añadía a la preparación CoA, carnitina y ATP (necesarios para el proceso de activación de los ácidos grasos) no era necesaria la adición de albúmina para eliminar los ácidos grasos presentes en la preparación. En ambas situaciones se incrementaba el rendimiento energético de estas mitocondrias, por lo que a partir de este momento se



propuso que la baja eficiencia de estas mitocondrias era consecuencia de un desacoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa [Lindberg *et al.*, 1967]. Sin embargo, se observó que el efecto reacoplante ocasionado por la retirada de los ácidos grasos debido a su activación o mediante la adición de albúmina no era equiparable, por lo que algunos autores pensaron que el desacoplamiento de las mitocondrias del TAP no era provocado por los ácidos grasos en general, sino por una fracción específica de éstos [Bulychev *et al.*, 1972].

De forma simultánea a las anteriores investigaciones, Rafael y colaboradores realizaron un descubrimiento vital. Estos autores observaron que la adición de ATP o GTP milimolar junto con albúmina a las preparaciones de mitocondrias de TAP incrementaba notablemente la proporción de mitocondrias acopladas con lo cual se señalaba por primera vez a los nucleótidos como inductores del control respiratorio en estas mitocondrias [Rafael *et al.*, 1969]. La discrepancia observada en los datos de reacoplamiento obtenidos tras la retirada de los ácidos grasos por la albúmina o por su activación fue explicada por Cannon *et al.* en 1973 argumentando que el ATP actuaba de modo dual, activando los ácidos grasos e induciendo el control respiratorio en la mitocondria. Estos autores establecieron que la adición de ATP 0.8 mM a una preparación de mitocondrias de TAP era suficiente para observar ambos efectos, mientras que una adición de 55 μ M de ATP era suficiente para activar los ácidos grasos endógenos, pero insuficiente para conseguir un control respiratorio [Cannon *et al.*, 1973].

En 1976, David Nicholls descubrió que la unión de los nucleótidos a las mitocondrias era insensible a atractilato y tenía lugar en la cara externa de la membrana interna mitocondrial [Nicholls, 1976a]. Esto permitió la cuantificación de la proteína en la membrana y con ello se demostró que existía una relación entre el estado termogénico del TAP y la capacidad de unión de nucleótidos de modo que ésta se incrementaba tras un período de aclimatación al frío [Rafael & Heldt, 1976]. Ese mismo año, Ricquier & Kader [1976] encontraron una banda proteica de 32 KDa cuya expresión se potenciaba en las mitocondrias de TAP de rata que habían sido expuestas al frío y la atribuyeron a una posible flavoproteína o a algún tipo de citocromo de función desconocida.

Dos años más tarde Nicholls y colaboradores, mediante marcaje por fotoafinidad, identificaron esta proteína como un polipéptido de 32 KDa responsable del fenómeno de desacoplamiento de las mitocondrias de TAP y la denominaron UCP [Heaton *et al.*, 1978]. Esta proteína se localizaba en la membrana interna mitocondrial y su actividad se inhibía en presencia de nucleótidos púricos y se estimulaba en presencia de ácidos grasos. Poco después se consiguió purificar tanto en hámster como en rata [Lin & Klingenberg, 1980] y cinco años después, Bouillaud *et al.* [1985] y paralelamente Jacobsson *et al.* [1985], clonaron la proteína. El mismo año, Klingenberg y colaboradores, secuenciaron la UCP de TAP [Aquila *et al.*, 1985] y la reconstituyeron en liposomas [Klingenberg & Winkler, 1985]. El posterior hallazgo en varios tejidos de proteínas homólogas a la UCP hizo que se redenominase a la proteína como UCP1 [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000].



3.2.- TOPOLOGÍA DE LA UCP1

3.2.1.- ESTRUCTURA PRIMARIA Y SECUNDARIA DE LA UCP1

La UCP1 es una proteína de 306 aminoácidos embebida en la membrana interna mitocondrial del adipocito pardo, que presenta una masa molecular de unos 33 KDa. Incluye en su secuencia un total de 47 residuos cargados de los cuales 28 son de naturaleza básica y 19 de marcado carácter ácido.

El proceso de aislamiento de la proteína se desarrolla de manera similar al realizado para aislar otros transportadores de membrana interna mitocondrial como AAC. Su aislamiento se lleva a cabo por cromatografía de afinidad en columnas de hidroxiapatito utilizando detergentes no iónicos (Triton[®] X-100). Este método no desnaturaliza la proteína y permite que pueda reconstituirse en liposomas para reproducir su actividad [Lin & Klingenberg, 1980; Klingenberg & Winkler, 1985]. La primera vez que se aisló, se observó que la proteína solubilizada migraba en la ultracentrífuga como un homodímero rodeada de aproximadamente 160 moléculas de Triton[®] [Lin *et al.*, 1980]. El hecho de que se haya encontrado una relación de número de centros de unión de GDP por molécula solubilizada de proteína de 0.5:1 (o lo que es lo mismo, 16 μ mol GDP/g proteína) [Lin & Klingenberg, 1982] y que el tratamiento de la proteína con reactivos de grupos sulfhidrilo (*cross-linking*) provoque la unión entre dos unidades monoméricas de la UCP1 [Klingenberg & Appel, 1989] son argumentos a favor de esta asociación dimérica. Finalmente, la importancia de la adquisición de la estructura dimérica para el correcto funcionamiento de los transportadores mitocondriales, fue demostrado por Schroers *et al.* [1998] basándose en otro de los miembros de la superfamilia, el PiC.

Basándose en la estructura primaria, y tras la aplicación de los perfiles de hidrofobicidad de acuerdo con el método propuesto por Kyte & Doolittle [1982], se predijo un modelo de plegamiento análogo al descrito para otros transportadores mitocondriales [revisión Walker & Runswick, 1993] (figura 7). Se observó la presencia de secuencias altamente repetitivas dentro de la UCP1. Esta elevada homología implicaba que la secuencia de la UCP1 presentaba una estructura tripartita, compuesta por tres repeticiones de unos 100 aminoácidos cada una, con 6 hélices α transmembrana, tres grandes *loops* de unos 40 aminoácidos de naturaleza hidrofílica y otros dos, de unos 20 aminoácidos, también de naturaleza hidrofílica (ver figura 10). La mayor similitud aparecía entre los dominios 1 y 2, mientras que se observaba una ligera homología entre el 1 y el 3 [Aquila *et al.*, 1985; revisión en Walker, 1992].

Los experimentos de espectroscopía de infrarrojos realizados con la proteína demuestran la elevada presencia de hélices α en su estructura. Atendiendo a los datos obtenidos en estos experimentos, la estructura de la UCP1 contiene alrededor de un 50% de hélice α , 30% de estructura β , 15% de giros β y un 7% de estructura al azar [Rial *et al.* 1990].

Del análisis de las secuencias se observó que incluían el motivo común a la superfamilia de los transportadores mitocondriales [Palmieri *et al.*, 1992]. Dentro de cada dominio homólogo, hay residuos estrictamente conservados, como es una prolina, un residuo de glicina y dentro de la segunda hélice de cada repetición, un residuo de arginina [Klingenberg & Huang, 1999] (figura 8). Además se mantiene la presencia de tres residuos

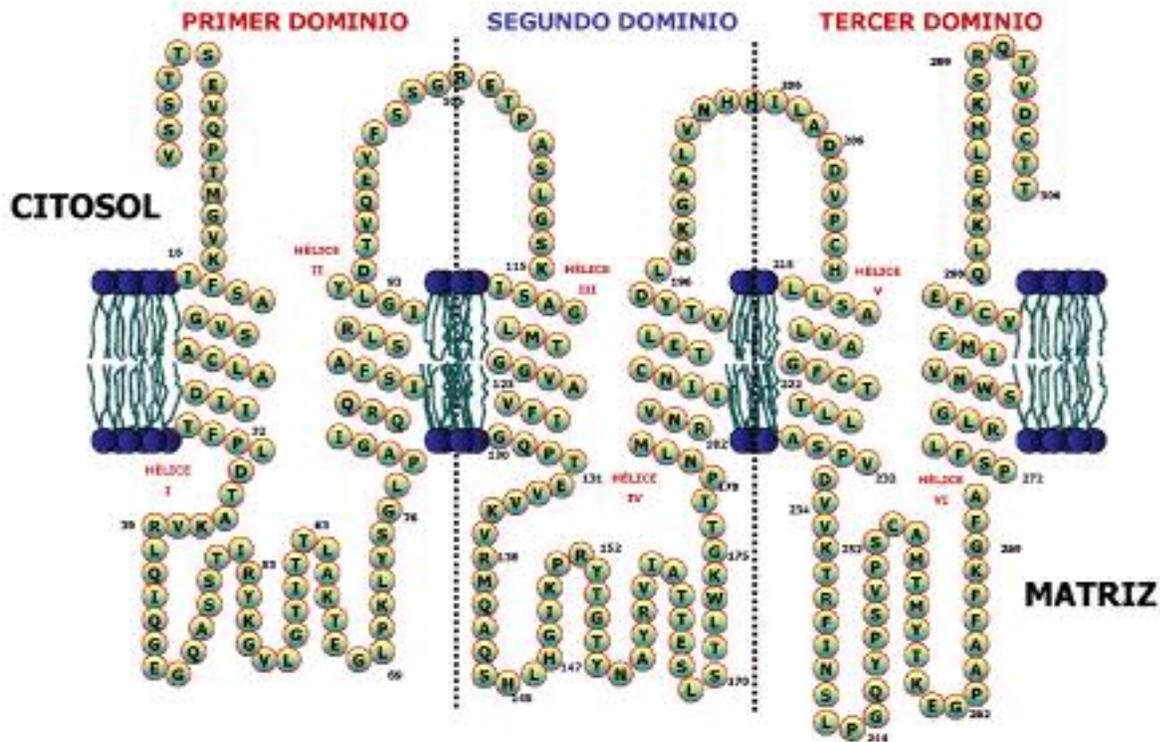


Figura 10 Esquema del plegamiento en la membrana interna y secuencia de la UCP1 de TAP de rata. El esquema ha sido construido a partir de los diversos datos topológicos existentes y en él se observan las tres repeticiones separadas por líneas discontinuas.

cargados y dos aromáticos aparte de varios residuos hidrofóbicos por cada repetición [Aquila *et al.*, 1985]. Del mismo modo, se observó que los primeros aminoácidos (región N-terminal) no estaban muy conservados, mientras que los últimos presentaban un elevado grado de conservación en las UCPs de las distintas especies (ver figura 50). Ridley *et al.* [1986] observaron que esta región C-terminal tiene un marcado carácter antigénico y la señalaron como posible antígeno común para las UCPs de distintas especies.

Los primeros datos topológicos que se obtuvieron indicaron que la región C-terminal de la proteína, que presenta un carácter altamente hidrofílico, estaba orientada hacia el espacio intermembrana, ya que era accesible a la proteólisis con tripsina [Eckerskorn & Klingenberg, 1987]. Estudios realizados con anticuerpos específicos frente a residuos de la UCP1, demostraron que la región que va desde el aminoácido 253 al 279, se orientaba hacia la matriz mitocondrial [Miroux *et al.*, 1992]. Posteriormente este mismo grupo, mediante la construcción de una librería de proteínas de fusión que contenía distintos fragmentos de la UCP1 con carácter antigénico, mapeó la localización de los mismos a ambos lados de la membrana [Miroux *et al.*, 1993]. De este modo se comprobó que la UCP1 adoptaba la estructura secundaria típica de los transportadores mitocondriales (figura 7). Recopilando los diversos datos obtenidos, se ha propuesto que el modelo de plegamiento para la UCP1 de rata es el que se refleja en la figura 10.

3.2.2.- EL GEN DE LA UCP1

El gen de la UCP1 está presente únicamente en mamíferos y actualmente se ha identificado en 9 especies de mamíferos que son las descritas en la tabla 1 [revisión

Nombre	Especie	Nombre común	N.Acceso
BtUCP1	<i>Bos taurus</i>	Vaca	P10861 [†]
CfUCP1	<i>Canis familiaris</i>	Perro	Q9GMZ1
HsUCP1	<i>Homo sapiens</i>	Humano	P25874
RmUCP1	<i>Macaca mulatta</i>	Mono	Q9N1E0 [†]
MaUCP1	<i>Mesocricetus auratus</i>	Hámster Sirio	P04575
MmUCP1	<i>Mus musculus</i>	Ratón	P12242
OcUCP1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	P14271
PsUCP1	<i>Phodopus sungorus</i>	Hámster Siberiano	Q9ER18
RnUCP1	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	P04633

Tabla 1 Resumen de las especies en las cuales se ha identificado el gen de la UCP1 junto con sus números de acceso de la base de datos SWISS-PROT/TrEMBL (<http://us.expasy.org/sprot/>)

Ledesma *et al.*, 2002b]. Se ha localizado en humanos en el brazo largo del cromosoma 4, mientras que en ratón y rata se ha identificado en los cromosomas 8 y 19 respectivamente [Ricquier & Bouillaud, 2000]. Al igual que otros transportadores de la membrana mitocondrial interna carece en su secuencia de péptido señal [Ridley *et al.*, 1986], y se ha propuesto que su inserción en la membrana depende de una señal intrínseca en la secuencia del dominio central de la proteína [Schleiff & McBride, 2000].

La estructura del gen de la UCP1 se correlaciona con la estructura propuesta para la proteína. Se compone de seis exones que codifican para una hélice transmembranal cada uno y presenta las posiciones de los intrones altamente conservadas (figura 11). Esta estructura se mantiene en las distintas especies (al menos la unidad transcripcional) y se presenta en el genoma en una copia única, al contrario que otros transportadores homólogos como el AAC que presenta 3 copias [Walker & Runswick, 1993].

3.2.3.- CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA UCP1

Diversos ensayos fisiológicos señalaron que la expresión de la UCP1 en ratones se induce en situaciones de exposición al frío y de alimentación con dieta de alto contenido graso [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000]. A nivel molecular, se ha visto que las catecolaminas (vía AMPc), la proteína activadora 1 (AP-1), las hormonas tiroideas, los ácidos grasos (como por ejemplo el ácido fitánico [Schlüter *et al.*, 2002]), las tiazolidinedionas y el ácido retinoico son potentes activadores de la expresión del gen de la UCP1 [revisión Silva & Rabelo, 1997; Ricquier & Bouillaud, 1997; Ricquier & Bouillaud, 2000]. Todos ellos actúan directamente sobre un elemento activador o *enhancer* de unos 211 bp que se sitúa antes del inicio de la transcripción (-2.28/-2.49) [Cassard-Doulcier *et al.*, 1993]. La organización de este elemento activador es compleja y en él se han localizado los diversos sitios de unión de los distintos activadores.

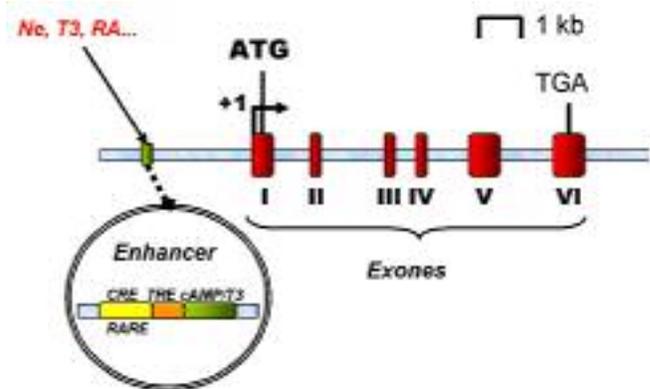


Figura 11 Organización estructural del gen de la UCP1. Vienen señalados los exones y la región activadora de la transcripción donde se sitúan los principales elementos de respuesta. Ver texto para explicación.



Tanto los elementos de respuesta a AMPc (CRE) y ácido retinoico (RARE) más importantes, como la secuencia que le confiere la especificidad tisular [Cassard-Doulcier *et al.*, 1998] y una zona donde se supone que se unen receptores que activan la proliferación de los peroxisomas (PPAR), se encuentran concentrados en un elemento regulador de unos 90 bp (-2.4/-2.49) altamente complejo. Se ha encontrado también que otras hormonas como la insulina, los glucocorticoides, el factor α de necrosis tumoral (TNF α) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) regulan la expresión del gen de una manera indirecta [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000].

3.3.- ASPECTOS FUNCIONALES DE LA UCP1

La UCP1 es una proteína cuya actividad origina una disminución del rendimiento energético, por lo que en condiciones no termogénicas debe permanecer altamente regulada. A nivel molecular, la UCP1 va a interactuar con tres tipos de ligandos: las especies que transporta (protones y aniones), sus activadores (ácidos grasos y retinoides) y sus inhibidores (nucleótidos de purina) [revisiones Rial & Nicholls, 1987; Jaburek *et al.*, 1999; Klingenberg & Echtay, 2001; Rial & González-Barroso, 2001].

3.3.1.- ESPECIES TRANSPORTADAS POR LA UCP1

Si bien aún no hay acuerdo y las teorías existentes son varias, la tendencia generalizada sitúa a la UCP1 principalmente como un transportador de H⁺ capaz de transportar otras sustancias de tipo aniónico.

Nicholls y Lindberg [1973] fueron los primeros en describir un transporte poco específico de aniones halogenuros como Br⁻, NO₃⁻ y Cl⁻ a través de la UCP1. Este transporte se inhibía por nucleótidos de purina pero no se activaba con ácidos grasos. Presentaba una débil dependencia por el pH y una selectividad que dependía del tamaño del anión: I⁻>Br⁻>Cl⁻ [Nicholls 1979; Jezek *et al.*, 1990]. La competición observada entre el transporte de Cl⁻ y H⁺ indicaba que existía una vía común para el transporte de protones y aniones, por lo que en un principio se llegó a proponer que durante el proceso de disipación del gradiente electroquímico, la UCP transportaba OH⁻ en lugar de H⁺, lo cual experimentalmente es indistinguible de un uniporte de H⁺ [Nicholls & Heaton, 1978].

Por otra parte algunos autores, a raíz de los descubrimientos de Skulachev en 1988 (ver sección 3.3.3), consideraron que la UCP1 era una proteína transportadora de la forma aniónica de los ácidos grasos [Andreyev *et al.*, 1988]. Fijándose en esta característica, Jezek & Garlid [1990] encontraron nuevas especies que podían ser transportadas por la UCP1. Entre ellas hay que citar los sulfonatos, alquilsulfatos y sus derivados, oxohalogenuros, derivados de fosfato monovalentes y aniones inorgánicos monovalentes. Tanto la velocidad de transporte, como la afinidad de estos aniones por la UCP1 aumentaban con la hidrofobicidad del sustrato. El descubrimiento de estas sustancias contribuyó a que algunos autores situaran a la UCP1 como un exclusivo transportador de aniones [Garlid *et al.*, 1996].



3.3.2.- LOS NUCLEÓTIDOS DE PURINA INHIBEN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1

Debido a su función desacoplante, la UCP1 *in vivo* está estrechamente regulada ya que, de no ser así, la respiración se desacoplaría de la síntesis de ATP, y esto provocaría un menor rendimiento energético en las células. En condiciones normales (no termogénicas) en las cuales no existe liberación de noradrenalina, la respiración en el adipocito pardo se encuentra perfectamente acoplada a la síntesis de ATP incluso en mitocondrias de animales adaptados al frío y que poseen gran cantidad de UCP1 [Rafael *et al.*, 1986].

Desde las primeras evidencias de la elevada permeabilidad a protones de las mitocondrias del TAP se estableció que para obtener un control respiratorio en estas mitocondrias era necesario eliminar los ácidos grasos y añadir nucleótidos de purina libres (no acomplejados con Mg^{2+}) [Hohorst & Rafael, 1968; Rafael *et al.*, 1969; Grav *et al.*, 1970; Cannon *et al.*, 1973; Nicholls, 1974a]. En 1976, Nicholls y colaboradores descubrieron que los nucleótidos se unían exclusivamente por la cara citosólica de la membrana interna mitocondrial y que esta unión era insensible a atractilato. Fue esta capacidad de unir nucleótidos la que permitió identificar, mediante marcaje por fotoafinidad con 8-azido- $[\gamma^{32}P]$ -ATP [Heaton & Nicholls, 1977, a la UCP1 de mitocondrias de TAP; Heaton *et al.*, 1978] y posteriormente aislarla [Lin & Klingenberg, 1980].

Las afinidades por los nucleótidos varían de la siguiente manera: GTP>GDP>ATP>ITP>ADP>IDP, mientras que la afinidad por los monofosfatos es unas 50-100 veces menor [Nicholls, 1976a; Heaton *et al.*, 1978; Klingenberg, 1988]. Su unión a la UCP1 es altamente dependiente del pH de modo que su afinidad por el sitio de unión disminuye según aumenta el pH en un rango de pH por encima de 6.5 [Nicholls, 1976b]. Con valores de pH inferiores a 6.5, la unión de los nucleótidos es independiente del pH [Klingenberg & Winkler, 1985, revisión Nicholls & Rial, 1999].

Se ha descrito que la tasa de unión del nucleótido a la UCP1 es muy lenta [Huang *et al.*, 1998], por lo que se ha propuesto que realmente la unión del nucleótido se produce a través de dos estados distintos, uno más débil, donde la unión no provoca la inhibición del transporte y otro más fuerte que correlaciona con la inhibición del paso de H^+ y Cl^- a través de la UCP1 [Klingenberg & Winkler, 1985; Huang & Klingenberg, 1995]. Se ha propuesto que la lentitud de la transición entre ambos estados refleja un complejo cambio conformacional de la proteína [Huang & Klingenberg, 1996b; Klingenberg & Echtay, 2001]. Algunos autores sugieren que el estado de unión fuerte no es suficiente para que se produzca la inhibición y proponen un mecanismo por el cual el centro de unión del nucleótido pasa por un tercer estado conformacional en el que se produce la inhibición del transporte [Modriansky *et al.*, 1997].

Un elemento adicional de la interacción entre la UCP1 y los nucleótidos es el fenómeno del enmascaramiento. Este proceso fue descrito por primera vez por Desautels *et al.* [1978] al observar que una rápida disminución en la temperatura de mantenimiento, provocaba en las mitocondrias de TAP de los animales estudiados un aumento en el número de centros de unión del GDP que no podía explicarse por la síntesis de *ново* de la UCP1 [Nedergaard *et al.*, 1985; Trayhurn *et al.*, 1987]. El mismo efecto fue observado tras inyectar noradrenalina y otros agonistas de receptores β -adrenérgicos [Swick *et al.*, 1986;



Milner *et al.*, 1988; revisión Peachey *et al.*, 1988). Varias fueron las teorías que se propusieron para explicar este "desenmascaramiento" [revisiones Nicholls & Locke, 1984; Nedergaard & Cannon, 1992]. Nedergaard y Cannon propusieron que este fenómeno era consecuencia de un proceso de tumefacción mitocondrial provocado por el propio desarrollo de la termogénesis [Nedergaard & Cannon, 1987]. Un año más tarde, Swick y Swick [1988] por un lado, y Milner y Trayhurn [1988] por otro, afirmaron que el enmascaramiento era consecuencia de un cambio conformacional de la proteína, y años después, Huang y Klingenberg lo explicaron afirmando que era consecuencia de un fenómeno de unión "más estrecha" del ATP citosólico [Huang & Klingenberg, 1995]. Sin embargo, actualmente no existe acuerdo para la aceptación de ninguna de ellas ya que los resultados que se han obtenido son contradictorios.

3.3.3.- LOS ÁCIDOS GRASOS ACTIVAN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1

Una vez descubierto que la UCP1 *in vivo* se encontraba inhibida por el ATP citosólico, la siguiente cuestión que se planteó fue establecer el mecanismo de regulación de la UCP1. Cuatro fueron las posibles teorías que se barajaron a lo largo de los años para explicar la activación de la UCP1 [revisión Rial & Nicholls, 1987]: desplazamiento del nucleótido del sitio de unión por un posible inhibidor competitivo como el acil-CoA [Cannon *et al.*, 1977]; aumento del pH citosólico y por lo tanto disminución de la afinidad del nucleótido por el sitio de unión [Chinet *et al.*, 1978]; disminución de la concentración citosólica de nucleótidos de purina [LaNoue *et al.*, 1982] y la finalmente más aceptada, que proponía que los ácidos grasos eran los responsables de la activación de la UCP1 [revisión Rial & González-Barroso, 2001]

La capacidad de los ácidos grasos para desacoplar la fosforilación oxidativa en todo tipo de mitocondrias fue descrita por primera vez por Pressman y Lardy. Estos autores observaron en 1952 que una fracción microsomal termoestable y soluble en acetona podía estimular la respiración e incrementar la producción de ATP en ausencia de fosfato inorgánico [Pressman & Lardy, 1952]. Cuatro años más tarde identificaron esta fracción como ácidos grasos [Pressman & Lardy, 1956] pero se desconocía el mecanismo de desacoplamiento. Pronto quedó claro que a altas concentraciones los ácidos grasos actuaban a modo de detergente sobre cualquier tipo de mitocondrias, pero por otra parte, también se observó que bajas concentraciones ejercían una función protonófora equivalente a la producida por otros desacoplantes típicos [Wojtzak, 1976; Wojtzak & Schönfeld, 1993]. Esta acción protonófora requería un movimiento de translocación de la forma protonada desde la cara citosólica a la matricial de la membrana mitocondrial interna (*flip-flop*). Aquí liberaría un H⁺, y posteriormente la forma aniónica regresaría a la cara citosólica [revisión Hamilton, 1998].

En 1988, Skulachev y colaboradores descubrieron que el carboxiatractilato podía inhibir parcialmente el desacoplamiento inducido por los ácidos grasos en mitocondrias de hígado [Andreyev *et al.*, 1988, 1989]. Esto hizo que se implicase al AAC en el mecanismo del desacoplamiento, y propusieron que el movimiento de la forma aniónica de los ácidos grasos hacia la cara citosólica de la membrana interna era facilitado por el propio transportador. Este comportamiento se comprobó en liposomas con AAC reconstituido [Brustovetsky & Klingenberg, 1994] y en otros transportadores como el AGC, DIC, PIC o las propias UCPs.



En un principio, la tendencia generalizada fue situar a los ácidos grasos como desacoplantes inespecíficos de las mitocondrias ya que este fenómeno se observaba en las mitocondrias aisladas de cualquier tejido. Además, para conseguir una preparación de mitocondrias acopladas era necesario retirar los ácidos grasos de la preparación y la permeabilidad de cloruros detectada en las mitocondrias de TAP no se veía afectada por la adición de ácidos grasos. Sin embargo, algunos descubrimientos señalaban hacia un papel específico de los ácidos grasos en las mitocondrias de TAP. Descubrimientos como la observación, a bajas concentraciones, de un efecto desacoplante mayor de los ácidos grasos en mitocondrias de TAP que en las de otros tejidos [Heaton & Nicholls, 1976; Nicholls, 1979] junto con la existencia de una inhibición de la unión de los nucleótidos en mitocondrias de TAP en presencia de ácidos grasos [Cannon *et al.*, 1977] alimentaron la controversia [revisión Nicholls & Locke, 1984].

Las primeras evidencias aparecidas para entender el papel regulador específico de los ácidos grasos en las mitocondrias de TAP surgieron a principios de los 80 cuando se comprobó *in vitro* el denominado "ciclo de la carnitina" descrito por Hittelman y colaboradores en 1969. Se vio, que tras poner mitocondrias de TAP en la cámara de un electrodo de oxígeno, la adición de ATP, carnitina y CoA ocasionaba la oxidación de los ácidos grasos de la preparación y las mitocondrias lograban adquirir un control respiratorio [Locke & Nicholls, 1981; Locke *et al.*, 1982a,b]. Posteriormente se estudió la posible correlación entre la concentración de los distintos intermediarios de la oxidación y la conductancia a protones de estas mitocondrias. Monitorizando la variación de la conductancia tras la adición de diversos derivados de los intermediarios del ciclo como acyl-CoA y [¹⁴C]palmitato, se descubrió que la concentración de los ácidos grasos libres se correlacionaban de una manera estrecha con el nivel de conductancia observado [Locke *et al.*, 1982a]. Los mismos autores encontraron también que las mitocondrias de TAP de animales incubados a temperaturas termoneutras eran nueve veces menos sensibles a la activación por ácidos grasos que las mitocondrias de animales adaptados al frío [Locke *et al.*, 1982b].

Todos estos descubrimientos sugirieron un posible modo dual de actuación de los ácidos grasos libres en la termogénesis: por un lado como segundos mensajeros de la noradrenalina y por otro como activadores de la UCP1. Para comprobar que la activación de la conductancia mediada por los ácidos grasos estaba relacionada con la vía de transporte sensible a nucleótidos (o transporte a través de la UCP1) se llevaron a cabo experimentos de tumefacción mitocondrial con acetato potásico en presencia de valinomicina. Con ellos se demostró que la permeabilidad inducida por palmitato se inhibía estequiométricamente con nucleótidos [Rial *et al.*, 1983]. Estos resultados crearon una nueva paradoja ya que en experimentos de respiración con mitocondrias de TAP, a iguales concentraciones de ácidos grasos y nucleótidos, el poder desacoplante de los ácidos grasos superaba a la inhibición inducida por los nucleótidos. Poco después, el mismo grupo demostró que esta aparente discrepancia era debida a la diferencia de magnitud del gradiente de potencial electroquímico de protones existente en ambos sistemas de estudio. Los mismos autores señalaron al grupo carboxilo de los ácidos grasos como imprescindible para la activación de la UCP1 y establecieron que los mejores reguladores de la UCP1 son los ácidos grasos de cadena larga [Rial *et al.*, 1983; revisión Rial & González-Barroso, 2001].



Otra evidencia adicional de la actividad como segundos mensajeros de la noradrenalina se obtuvo con la determinación de la concentración de ácidos grasos requeridos para inducir un desacoplamiento tanto en células como en mitocondrias aisladas. En

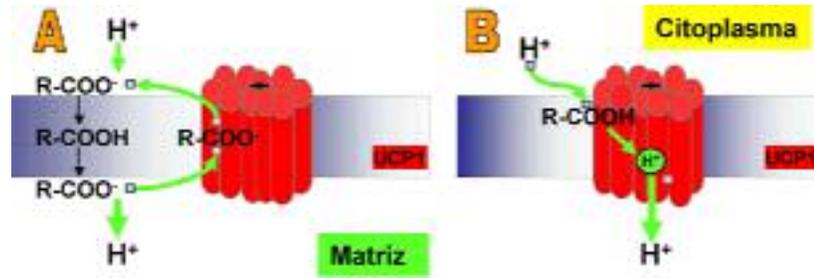


Figura 12 Modelos propuestos para el mecanismo de acción de los ácidos grasos sobre la UCP1. (A) Modelo propuesto por Skulachev [1991]. (B) Modelo propuesto por Rial et al., [1983]. Ver texto para explicación.

adipocitos marrones de ratones adaptados al frío se observó una estimulación de la respiración muy marcada como respuesta a la activación de sus receptores adrenérgicos mientras que en los adipocitos de conejillos de indias incubados a temperaturas termoneutras este fenómeno no se observaba [Locke *et al.*, 1982b, Cunningham *et al.*, 1986., Rafael *et al.*, 1986]. De igual modo se demostró que la activación de los ácidos grasos a acil-CoA era un proceso que mostraba una mayor afinidad que la activación de la UCP1 y que al final de la lipólisis la mitocondria reducía los niveles de ácidos grasos por activación y oxidación de los mismos hasta una concentración por debajo de los niveles que se requieren para que actúen como segundos mensajeros [Cunningham *et al.*, 1986].

3.3.3.1.- Mecanismo de activación del transporte mediado por ácidos grasos

Aceptado el papel de los ácidos grasos como reguladores de la actividad del TAP, aún se discute si los ácidos grasos activan directa o indirectamente la UCP1 o son realmente cofactores de la proteína. Existen principalmente dos hipótesis acerca del mecanismo de acción de los ácidos grasos en mitocondrias de grasa parda [revisiones Ricquier & Bouillaud, 2000; Nedergaard *et al.*, 2001; Rial & González-Barroso, 2001].

En la primera de las hipótesis, derivada de los descubrimientos de Skulachev en 1988, se propone que los ácidos grasos provocan un desacoplamiento inespecífico de las mitocondrias mediante su recirculación, facilitada por la UCP1, a través de la membrana interna mitocondrial. Surgió después de que Skulachev y colaboradores observaran que el carboxiatractilato inhibía parcialmente el desacoplamiento originado por el palmitato en mitocondrias de hígado [Skulachev, 1991] y permitió explicar las diferencias observadas entre las tasas de *flip-flop* de las formas protonadas (muy altas) y aniónicas (relativamente bajas) de los ácidos grasos [revisión Hamilton, 1998]. En este modelo los ácidos grasos son transportados por la UCP1 hacia el lado citosólico de la membrana interna en su forma aniónica mediante un mecanismo de *flip-flop* de modo semejante al que ocurre en otros transportadores mitocondriales como el AAC [Andreyev *et al.*, 1988]. La translocación de los protones a la matriz (ver figura 12.A) ocurre por la capacidad de la forma protonada de los ácidos grasos de difundir libremente a través de la membrana interna. El ácido graso translocaría el protón hacia la matriz y volvería al lado citosólico a través de la UCP1 [Garlid *et al.*, 1996, Jezek *et al.*, 1997b; Skulachev, 1998]. El resultado neto de cada ciclo sería el ingreso de un protón en la matriz mediante un proceso de difusión no iónica y, por lo tanto, la disminución del gradiente de protones



existente.

Este modelo requiere la presencia de los ácidos grasos para que se dé el desacoplamiento y se apoya en experimentos desarrollados tanto en sistemas reconstituidos como en mitocondrias [Jezek *et al.*, 1996]. Sin embargo, este modelo no explica la actividad de la UCP1 *in vivo*. Las elevadas concentraciones de ácidos grasos requeridas para demostrar este modelo [Jezek *et al.*, 1994], junto con la observación *in vitro* de la existencia de desacoplamiento en ausencia de ácidos grasos y el descubrimiento de la existencia de ciertos ácidos grasos con sustituyentes hidrofílicos, que son incapaces de realizar *flip-flop* a través de la membrana, pero que activan el transporte de protones a través de la UCP1, hacen que se dude del sentido fisiológico de esta hipótesis [revisión Klingenberg & Huang, 1999].

La segunda hipótesis, y más aceptada, se basa en un modelo propuesto por Rial y colaboradores en 1983. En él, se sitúa a los ácidos grasos como grupo prostético de la UCP1. Según este modelo los ácidos grasos no se transportan a través de la membrana sino que actuarían aportando su grupo carboxilo para captar y ceder los protones de un sitio a otro de la proteína, desde donde serían translocados a la matriz (figura 12.B) [Rial *et al.*, 1983; Winkler & Klingenberg, 1994; revisión Klingenberg & Huang, 1999]. En este modelo, el efecto de los ácidos grasos en presencia de nucleótidos depende principalmente del potencial de membrana generado. En condiciones de elevado potencial de membrana (cuando en condiciones fisiológicas se estimula la termogénesis) el poder activador de los ácidos grasos supera al poder inhibitorio de los nucleótidos. Por el contrario, mientras que el potencial de membrana sea bajo (por ejemplo en experimentos de tumefacción mitocondrial) la acción de los ácidos grasos se ve bloqueada de modo estequiométrico por la inhibición con nucleótidos [revisión Rial & González-Barroso, 2001].

Rial y colaboradores han propuesto que, si bien en condiciones fisiológicas el mecanismo de activación de la UCP1 por los ácidos grasos se produce de acuerdo a este segundo modelo, no se descarta que, bajo determinadas situaciones de tipo patológico, la UCP1 funcione como un transportador de ácidos grasos adoptando un mecanismo de transporte tipo poro (ver punto 3.6) [González-Barroso *et al.*, 1998].

3.3.4.- LOS RETINOIDES COMO REGULADORES DE LA UCP1

La UCP1 muestra una baja especificidad hacia sus especies activadoras. Compuestos con un grupo carboxilo libre y una determinada solubilidad en medio lipídico son capaces de incrementar el transporte de protones a través de la UCP1 [Rial *et al.*, 1983; Jezek *et al.*, 1997a; revisión en Klingenberg & Huang, 1999]. El ácido retinoico es un potente activador de la transcripción del gen de la UCP1 [Álvarez *et al.*, 1995; Cassard-Doulcier *et al.*, 1994] y en 1999, Rial *et al.* demostraron que también es capaz de actuar de manera directa sobre la UCP1 ocasionando un incremento en la tasa de transporte de protones. El ácido *todo-trans* retinoico muestra una afinidad por la UCP1 mucho mayor que el palmitato pero su tasa de transporte es menor [Rial *et al.*, 1999].

Teniendo en cuenta que las concentraciones requeridas para observar esta activación están dentro del rango necesario para observar la transcripción del gen y que los adipocitos pardos tienen un papel importante en el metabolismo de los retinoides se ha



propuesto que esta relación entre los retinoides y la UCP1 puede tener relevancia desde el punto de vista fisiológico ya que podría constituir una segunda vía de estimulación de la termogénesis en el TAP [Villarroya *et al.*, 1999; revisión Bouillaud *et al.*, 2001].

3.3.5.- LA UBIQUINONA (CoQ₁₀) ES UN COFACTOR IMPRESCINDIBLE PARA EL TRANSPORTE

Un problema a la hora de estudiar *in vitro* la UCP1 ha sido la imposibilidad observada por algunos autores de reconstituir su actividad a partir de proteína expresada en *Escherichia coli* en forma de cuerpos de inclusión [Echtay *et al.*, 1999]. Este fenómeno hizo que se investigase la posible pérdida en el proceso de algún cofactor esencial para el funcionamiento de la proteína en sistemas reconstituidos a partir de cuerpos de inclusión. De este modo, Klingenberg y colaboradores observaron que, tras la adición de ubiquinona (CoQ₁₀) en estado oxidado, se conseguía recuperar la activación del transporte de H⁺ mediado por ácidos grasos característico de la UCP1. Según estos autores, la ubiquinona desempeñaría un papel regulador favoreciendo la unión de los ácidos grasos a la UCP1 [Echtay *et al.*, 2000b]. Un año después, Klingenberg [2001] propuso que la ubiquinona en medio lipídico, interaccionaría con los ácidos grasos formando puentes de hidrógeno a través de sus grupos principales (figura 13). Posteriormente, Tomás *et al.* [2002] observaron con experimentos de marcaje por fotoafinidad que la ubiquinona aumenta considerablemente la afinidad de la UCP1 por otro de sus reguladores, el ácido retinoico.

Recientemente en mitocondrias aisladas, se ha descrito que la activación del transporte de protones mediado por la ubiquinona en presencia de ácidos grasos podría ser una consecuencia indirecta del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (superóxidos o ROS) en la matriz celular [Echtay *et al.*, 2002].

Sin embargo, la aceptación de un papel regulador de la ubiquinona es otro aspecto bastante controvertido ya que otros autores como Keith Garlid y colaboradores, afirman que la ubiquinona no es necesaria para el funcionamiento de la UCP1 y que la reconstitución de su actividad y la de las demás UCPs, a partir de proteína expresada en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión, es posible sin necesidad de añadir ubiquinona [Jaburek & Garlid, 2003].

3.4.- MODELOS DE TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1

Dentro del conjunto grande y variado de sistemas translocadores de H⁺ existente (bombas de H⁺/K⁺ dependientes de ATP, ATPsintasa, intercambiadores de

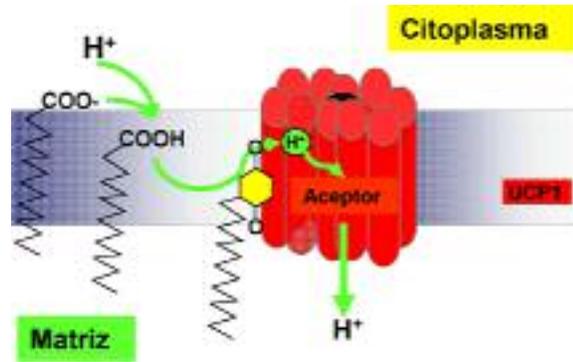


Figura 13 Modelo de actuación de los ácidos grasos y la coenzima Q. La forma protonada del ácido graso establece un puente de hidrógeno con el grupo oxo de la ubiquinona que se encuentra unida a la UCP1. El complejo CoQ-ácido graso facilita la unión del ácido graso a la UCP1 donde libera a un grupo aceptor el H⁺. Finalmente el ácido graso vuelve hacia la membrana en forma aniónica donde recogerá otro protón [revisión Echtay *et al.*, 2001].

H⁺/K⁺, cotransportadores H⁺/sustrato...) el transporte de H⁺ a través de la membrana podría parecer el proceso más simple. Sin embargo, hasta el momento la UCP1 es el único transportador conocido capaz de transportar H⁺ de forma independiente.

En cuanto al mecanismo de transporte adoptado, en general, los transportadores mitocondriales que intercambian los sustratos a través de las membranas, lo hacen mediante un mecanismo de antiporte. Las únicas excepciones las constituyen el CAC, al que se le ha propuesto un mecanismo de translocación tipo *ping-pong* [Indiveri *et al.*, 1994] y la UCP1. Se acepta que la UCP1 cataliza un uniporte eléctrico.

Basándose en la baja tasa de transporte de la UCP1 (0.1-10 iones por segundo) y en su elevada expresión en las mitocondrias de TAP (2.4 dímeros de UCP1 por cada molécula de citocromo aa₃), desde un principio se propuso que la UCP1 presentaba un mecanismo tipo transportador [Lin & Klingenberg, 1982; Klingenberg, 1990]. Un mecanismo tipo canal, por el contrario, permitiría un flujo de protones mucho mayor y requeriría un menor número de moléculas para una misma tasa de transporte. Un razón para explicar la elección de este mecanismo de transporte sería evitar el colapso del potencial de membrana que impediría mantener activos procesos como el transporte de metabolitos, la regulación de los niveles de Ca²⁺...

Existen dos modelos para explicar el transporte de iones a través de la UCP1. Según el modelo propuesto por Nicholls y Rial [1989], la proteína uniría el ión a ser transportado desde la cara matricial o citosólica y lo liberaría, al otro lado de la membrana. Este proceso es siempre un uniporte eléctrico. La unión de nucleótidos de purina por la cara citosólica actuaría como un inhibidor competitivo y bloquearía el transporte. Partiendo de la observación de que los transportes de H⁺ y Cl⁻ son incompatibles, este modelo introduce la idea de una interacción competitiva no sólo entre los iones cloruro y protones sino también con los nucleótidos de purina. Se deben distinguir pues, tres centros de unión en la UCP1: uno para H⁺, otro para aniones y otro para nucleótidos. Todos ellos muestran diferentes propiedades y están regulados por distintos factores (esto explica que los ácidos grasos sólo afecten al transporte de protones). Este mecanismo es similar al que se ha propuesto para otros miembros de la superfamilia de transportadores mitocondriales que catalizan el antiporte de sustratos, con la diferencia que en éstos los sustratos se unen a los dos sitios de unión y forman un complejo ternario (mecanismo secuencial) [revisión Palmieri *et al.*, 1993]

En línea con el modelo anterior Klingenberg [1990] situó a la UCP1 como un transportador de H⁺/OH⁻. Experimentalmente, la translocación de uno u otro ión es indistinguible y en ambos casos el resultado neto es un flujo de protones. La única diferencia entre ambos sería la carga del centro de unión, por lo

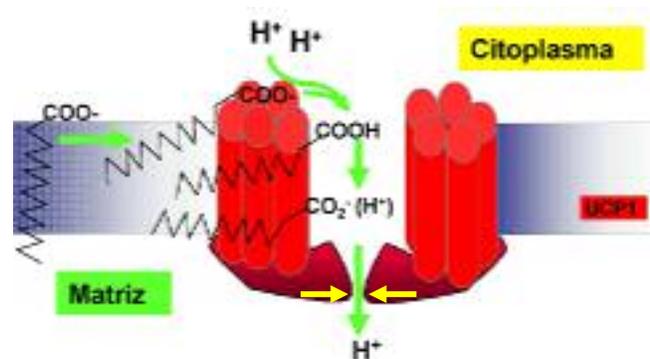


Figura 14 Modelo esquemático de Klingenberg para explicar el transporte de H⁺. En este caso el ácido graso participa en el transporte facilitando un protón a un grupo aceptor dentro de la UCP1, y ésta lo introduce en la matriz [revisión Klingenberg & Echtay, 2001].

que en este modelo se proponen dos posibilidades: que el centro de unión presente carga neutra y tras la protonación se cargue positivamente o que el centro de unión esté cargado negativamente y al unirse los H^+ adquiera una carga neutra. En ambas situaciones, el proceso es equivalente. Las cinéticas de transporte en ambos casos serían diferentes [Klingenberg, 1986]. Para explicar la existencia de una carga positiva en el sitio de unión, el mismo autor [1990] propuso que provenía de un puente salino entre un grupo carboxilo (que situado cerca del sitio de unión actuaría como donador/aceptor) y uno amino (lisina o arginina). Tras la protonación de este grupo el puente salino se rompería y permitiría mostrar la carga positiva con lo que la unión de aniones podría tener lugar. En este modelo, los ácidos grasos participan directamente en el transporte uniéndose a la UCP1 y facilitando un grupo carboxilo que actuaría de donador/aceptor de los protones a translocar (figura 14) (Winkler & Klingenberg, 1994).

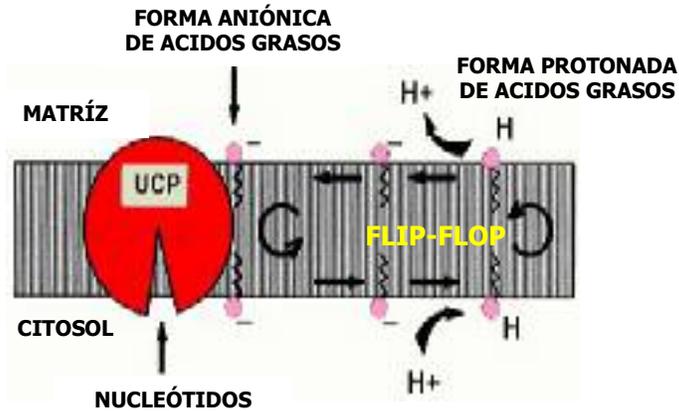


Figura 15 Modelo de *flip-flop* para el transporte de protones a través de la UCP1. Ver texto para explicación.

El segundo modelo fue propuesto por Garlid y colaboradores [Garlid *et al.*, 1996]. Estos autores presentaron un modelo de transporte a través de la UCP1 mediado por ácidos grasos. En este modelo, derivado del propuesto por Skulachev [1991], los ácidos grasos son imprescindibles para el transporte de H^+ a través de la UCP1 y mediante un proceso de difusión no iónica o *flip-flop* (figura 15), la translocación de protones de un lado a otro de la membrana (ver sección 3.3.3.1).

3.5.- RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA UCP1

La obtención de la estructura tridimensional completa de los transportadores de membrana interna mitocondrial es un proceso muy complicado. La única estructura completa que se conoce hasta el momento es la del AAC bovino, descubierta recientemente por Brandolin y colaboradores [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003]. La enorme complejidad que conlleva el estudio de proteínas integrales de membrana, así como la gran dificultad que implica conseguir cristales de una mínima calidad, ha obligado a abordar el estudio de las relaciones que existen entre la estructura de la UCP1 y su función de una manera indirecta. Se han realizado diversos estudios: espectroscópicos [Rial *et al.*, 1990; Viguera *et al.*, 1992; González-Barroso *et al.*, 1999;], topológicos [Eckerskorn & Klingenberg, 1987; Miroux *et al.*, 1992, 1993], computacionales [Ledesma *et al.*, 2002a], de modificaciones químicas [Jezek, 1987; Jezek & Drahotka, 1989; Rial *et al.*, 1989], de resonancia magnética nuclear (RMN) [González-Barroso *et al.*, 1999], de resonancia paramagnética electrónica (RPE) [Chomiki *et al.*, 2001] y de mutagénesis dirigida [Arechaga *et al.*, 1993; Murdza-Inglis *et al.*, 1994; Modriansky *et al.*, 1997; Eghtay *et al.*, 1997].



3.5.1.- RESIDUOS IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA UCP1

3.5.1.1.- Papel de los grupos SH

La colección de residuos mutados para tratar de entender el mecanismo de transporte de la UCP1, así como su regulación por ácidos grasos es amplia. Los primeros candidatos a tener un papel esencial en la actividad de la UCP1 fueron los residuos de cisteína. La mayoría de los transportadores de metabolitos poseen grupos sulfhidrilo que son esenciales para su mecanismo de acción ya que su modificación origina una inhibición en el transporte mediado por estas proteínas y la transformación de estas proteínas en canales con una menor especificidad [Dierks *et al.*, 1990a, b; Herick & Krämer, 1995; Indiveri *et al.*, 1992; Stappen & Krämer, 1993]. Por ello, Robillard y Konings en 1982 propusieron un modelo general para todas las proteínas transportadoras. En esta hipótesis se propone la presencia de dos centros redox (uno como puente disulfuro y otro como ditiol) que se encuentran acoplados mediante un intercambio ditiol-disulfuro de modo que cuando uno está oxidado el otro se encuentra reducido. El $\Delta\mu_{H^+}$ puede alterar el estado redox de estos centros por lo que la afinidad de los mismos por las especies a transportar puede variar. En este modelo, estos cambios de afinidad serían en principio suficientes para permitir un transporte activo de iones y/o metabolitos o la transducción de la energía [Robillard & Konings, 1982].

Con el fin de comprobar si la UCP1 se adecuaba al modelo propuesto y presentaba un comportamiento similar a otros transportadores mitocondriales se modificaron químicamente los residuos de cisteína presentes en la UCP1. En un primer momento no se encontraron evidencias de su participación en el sitio de unión de los nucleótidos [Lin & Klingenberg, 1982], pero en estudios posteriores [Rial & Nicholls, 1986; Jezek, 1987; Jezek & Drahotá, 1989; Rial *et al.*, 1989] se demostró que la modificación química de los grupos sulfhidrilos bajo determinadas condiciones afectaban tanto al transporte de H^+ e iones haluro a través de la UCP1 como a la unión de los nucleótidos a la proteína. Se observó que el efecto provocado dependía de la naturaleza del modificador químico [revisión Klingenberg & Huang, 1999]:

- los reactivos sulfhidrilo de carácter hidrofílico (mersalil, tetranitrometano, TNBS, PHMB, DTNB) inhibían tanto el transporte de iones a través de la UCP1 como la unión del nucleótido.
- los de carácter hidrofóbico como las maleimidas provocan una inhibición de la unión del nucleótido [Rial & Nicholls, 1986], mientras que influyen en el transporte mediado por la UCP1 haciendo que muestre una cinética de dos etapas: un estado intermedio en el que el transporte se muestra inhibido y otra final en la que el transporte se dispara sin llegar a adquirir una cinética tipo canal. Algunos autores señalaron que este fenómeno es consecuencia posiblemente de la modificación sucesiva de dos grupos sulfhidrilo [Rial *et al.*, 1989].

Mediante técnicas de mutagénesis dirigida, Arechaga *et al.* [1993] demostraron que la sustitución individual de cada una de las siete cisteínas por residuos de serina no era cualitativamente esencial para el transporte de iones a través de la UCP1,



si bien el estudio detallado de la cisteína 304 reveló que su mutación provocaba una alteración de la afinidad de UCP1 por ácidos grasos [González-Barroso *et al.*, 1998]. Esto confirmó que el modelo general de Robillard y Konings, al igual que en la mayoría de los transportadores mitocondriales, no se cumple en la UCP1 ya que la modificación de cualquiera de sus residuos SH no provoca una transformación de la cinética de la proteína a tipo canal.

3.5.1.2.- Otros residuos implicados en el transporte

Tras el estudio del papel de los grupos sulfidrilos, numerosos grupos realizaron estudios de mutagénesis dirigida para tratar de localizar residuos de importancia en el mecanismo de transporte. De este modo, se ha propuesto que los aspárticos 27 y 210 intervienen en la adquisición de protones del lado citosólico, ya que su neutralización provoca una disminución en el transporte de protones sin afectar ni al transporte de cloruros ni a la unión de los nucleótidos [Echtay *et al.*, 2000a]. Por otra parte, el glutámico 167 y la arginina 91 se han señalado como responsables del transporte de cloruros, ya que su mutación modifica el transporte de estos aniones sin afectar a la unión de los nucleótidos ni al transporte de H⁺ [Echtay *et al.*, 2000a; revisión Klingenberg & Echtay, 2001]. Otras investigaciones señalaron también a la arginina 152 como mediadora de la interacción de los ácidos grasos con la UCP1 [Urbankova *et al.*, 2003].

Finalmente, hay que decir que algunos autores han señalado al par de histidinas 145 y 147 como últimas responsables del movimiento de los protones hacia la matriz sin influir en el transporte de Cl⁻ ni en la unión del nucleótido. De hecho, estos autores afirmaron que la existencia de este par de residuos en la UCP1 y su ausencia en el resto de las UCPs era la característica diferencial que permitía señalar a la UCP1 como una proteína transportadora de protones [Bienengraeber *et al.*, 1998]. Otros autores contrastaron estos datos en sistemas reconstituidos [Urbankova *et al.*, 2003] mientras que, por el contrario, otros grupos no han conseguido reproducir esos resultados y no observan una inhibición del transporte de H⁺ tras la mutación del par [Zhang *et al.*, 1999; Hagen & Lowel, 2000].

3.5.2.- LA UNIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS A LA UCP1

Dentro de la superfamilia de los transportadores mitocondriales, el AAC y las UCPs son los únicos transportadores que interaccionan en condiciones fisiológicas con nucleótidos. Presentan una elevada homología y por ello desde el descubrimiento de la UCP1 se tomó al AAC como punto de referencia para el estudio de la estructura-función de la nueva proteína. Ambas proteínas comparten algunas características que las hacen diferentes al resto de las proteínas que unen nucleótidos: en ambas el ión Mg²⁺ no participa en la unión (ya que durante su ciclo catalítico no se da la hidrólisis/formación de enlaces fosfato-fosfato) y no presentan los dominios consenso característicos de los enzimas que hidrolizan/sintetizan ATP [Huang & Klingenberg, 1995]. Sin embargo ambos transportadores son funcionalmente muy diferentes. Desde el punto de vista de la unión, en la UCP1 los nucleótidos interaccionan con la UCP1 desde el lado citosólico y únicamente lo hacen para inhibir el transporte mientras que en el AAC la interacción se da a ambos lados de la membrana y los nucleótidos constituyen el sustrato que se transporta. Esto



implica importantes diferencias en cuanto a la afinidad y especificidad de ambas proteínas hacia los nucleótidos. Mientras que el AAC presenta una mayor especificidad con una menor afinidad aparente, la UCP1 se muestra más afín y menos específica. Esto se debe a que en el AAC el nucleótido debe ser translocado por lo que su unión a la proteína implica importantes cambios conformacionales que hacen variar la constante de afinidad que se observa [Klingenberg, 1993; Pebay-Peyroula *et al.*, 2003]. Además, la mayor especificidad observada en el AAC implica una interacción proteína-nucleótido mucho más estrecha ya que es esta energía de unión la que conduce la translocación de los nucleótidos. La unión provoca un cambio en la conformación del centro de unión a un estado de baja afinidad que facilita la liberación del nucleótido. La aparente mayor afinidad y menor especificidad de la UCP1 debe ser consecuencia de que el nucleótido es un inhibidor y que su unión no ocasiona un drástico cambio conformacional, sino un ligero reordenamiento de la proteína [revisión Arechaga *et al.*, 2001].

3.5.2.1.- Localización del dominio de unión del nucleótido

Uno de los principales objetivos perseguidos desde que Nicholls [1976a] descubriese la existencia de una proteína capaz de unir con alta afinidad ADP y ATP en un sitio específico localizado en la cara externa de la membrana interna mitocondrial (UCP1), fue la localización de su dominio de unión de nucleótidos. Actualmente es posiblemente la región mejor descrita de la estructura de la UCP1.

El empleo de 2 y 8-azido-ATP en el marcaje del sitio de unión de nucleótidos del AAC reveló la existencia de dos zonas de marcaje situadas en los *loops* hidrofílicos que unen las hélices α tercera-cuarta y quinta-sexta respectivamente [Dalbon *et al.*, 1988; Mayinger *et al.*, 1989]. Los positivos resultados obtenidos hicieron que estos estudios de fotoafinidad se utilizasen también en la UCP1. De este modo se observó que el 8-azido-ATP se unía a la treonina 259 [Winkler & Klingenberg, 1992]. El empleo de otros análogos de ATP como 2-azido-ATP y 3'-O-(5-fluoro-2,4-dinitrofenil)-ATP (FDNP-ATP), sugirió que se unían a la treonina 264 (alanina 264 en la UCP1 de rata) y a la cisteína 253 respectivamente [Mayinger & Klingenberg, 1992]. Todos estos residuos se encuentran localizados hacia la cara matricial de la membrana interna mitocondrial, en la región hidrofílica que conecta la quinta y sexta hélices α transmembranales y curiosamente en posición homóloga a los identificados en el AAC [Aquila *et al.*, 1985]. La importancia de esta región fue contrastada con estudios de mutagénesis dirigida que revelaron su participación esencial en el sitio de unión del nucleótido [Bouillaud *et al.*, 1994; Miroux *et al.*, 1992].

En el año 1992, se describió una elevada similitud entre la región 261-269 de la UCP1, la 263-271 en el AAC y el dominio de unión a ADN del receptor de estrógenos (figura 16) [Bouillaud *et al.*, 1992]. Este dominio, en los factores nucleares de transcripción, contiene aminoácidos que van a determinar la especificidad de la secuencia de ADN y se consideran, por lo tanto, como un elemento de reconocimiento del ADN [Berg, 1989; Schawe & Rhodes, 1991]. Esta elevada homología, junto con los resultados obtenidos en los experimentos de fotoafinidad que habían marcado residuos próximos a este dominio, llevaron a Bouillaud *et al.* [1992] a proponer que el dominio 261-269 de la UCP1 podría estar implicado en el reconocimiento de los nucleótidos libres y que por lo tanto constituiría un "elemento de reconocimiento de nucleótidos". Posteriormente estos

mismos autores demostraron, mediante mutagénesis dirigida, su implicación en la inhibición por nucleótidos del transporte mediado por la UCP1 [Bouillaud *et al.*, 1994]. La deleción de la fenilalanina 267, lisina 268 y glicina 269, producía una proteína que carecía de regulación por nucleótidos pero que mantenía una sensibilidad a ácidos grasos. Del mismo modo, observaron que la deleción completa del dominio 261-269 producía una proteína altamente deletérea tras su expresión en levaduras. Esta proteína mediaba un transporte incrementado y altamente inespecífico de moléculas de hasta 1000 daltons, y no presentaba regulación alguna por nucleótidos [González-Barroso *et al.*, 1997; revisiones Arechaga *et al.* 2001; Ledesma *et al.*, 2002a].

Sin embargo, el sitio de unión de los nucleótidos en la UCP1 no está únicamente formado por residuos del tercer *loop* matricial de la proteína. Debido a que la UCP1 presenta una estructura tripartita formada por la repetición de unos 100 aminoácidos se estudiaron los residuos homólogos a la región 261-269 en las otras dos primeras repeticiones [González-Barroso *et al.*, 1999]. De este modo se generaron mutantes de la UCP1 de rata que presentaban delecionados los residuos del extremo N-terminal, homólogos a los del tercer *loop* (Phe267-Lys268-Gly269), pero en el primer (Tyr74-Ser75-Gly76) y segundo *loop* (Trp173-Lys174-Gly175). Todos ellos ocasionaron la pérdida de la regulación por nucleótidos por lo que, al igual que ocurría en otros transportadores como el AAC [Majima *et al.*, 1993], se propuso que todos ellos intervenían en la regulación de la unión del nucleótido a la UCP1. Estudios similares se realizaron con las glicinas homólogas a la 269 en el primer y segundo dominio. Se generaron tres mutantes que carecían de las glicinas 76, 175 y 269 respectivamente y se observó de nuevo una pérdida de la regulación por nucleótidos en todos ellos. A partir de estos datos, en 1999, González-Barroso *et al.* propusieron que los tres *loops* matriciales estaban implicados en la unión de los nucleótidos, y por lo tanto en el control del transporte a través de la UCP1.

Otros estudios de mutagénesis dirigida han señalado una participación esencial en la unión de varios residuos con carga. Se ha visto que las argininas 83, 276 (homólogas a las esenciales argininas 79 y 279 del AAC bovino) y la 182, que se orientan hacia el interior de la proteína y se sitúan en posiciones equivalentes de las hélices transmembrana 2, 4 y 6, son también imprescindibles para la unión del nucleótido [Murdza-Inglis *et al.*, 1994; Modriansky *et al.*, 1997]. La interacción de esos residuos con los nucleótidos tendría lugar mediante puentes salinos con los grupos fosfato y su distancia respecto de la región 261-269 se ha visto que es compatible con las dimensiones esperadas para el sitio de unión [González-Barroso *et al.*, 1997]. También se ha señalado al glutámico 190 y la histidina 214 como importantes en la unión de los nucleótidos a la UCP1 [Winkler *et al.*,



Figura 16 Comparación de las secuencias homólogas entre el dominio de unión al ADN en el receptor de estrógenos, la región 265-273 del AAC de toro y las UCP1, UCP2 y UCP3 de rata, ratón y humano. Los * definen los residuos conservados entre los dominios del receptor de estrógenos y AAC. Estos residuos, excepto la lisina 268 del AAC se conservan en la UCP1. Se observa también la elevada homología entre las UCPs y el AAC. En amarillo los residuos que se conservan totalmente en los tres dominios.



1997; Echtay *et al.*, 1997], aunque en este caso, se ha propuesto que la participación de estos residuos en el sitio de unión no es estructural, sino más bien controlando el acceso de los nucleótidos a su sitio de unión [Arechaga *et al.*, 2001; Ledesma *et al.*, 2002a].

Estudios recientes de RPE, tras observar que la unión del nucleótido provocaba la movilización de una cisteína no presente en las UCP2, señalaron también a la cisteína 287 como posible residuo regulador de la inhibición del transporte por nucleótidos [Chomiki *et al.*, 2001].

3.5.2.2.- Dependencia del pH de la unión del nucleótido

La gran dependencia del pH de la unión del nucleótido fue una característica de la UCP1 que llamó la atención desde su descubrimiento [Nicholls, 1976b; Rial & Nicholls, 1983; Rafael *et al.*, 1994]. Esta dependencia se situó durante un tiempo, admitiendo que la UCP1 es un transportador de protones, como clave en la regulación intracelular de la proteína [Chinet *et al.*, 1978]. Posteriormente, se ha demostrado que fundamentalmente afecta al mecanismo de transporte de la proteína alterando la afinidad y selectividad de la proteína por los nucleótidos.

Klingenberg [1988] propuso un mecanismo por el cual el control de la unión del nucleótido se hacía a través de la protonación de un grupo carboxilo con un pK_a próximo a 4 (glutámico o aspártico) en el sitio de unión y la protonación adicional de un grupo con pK_a próximo a 7.2 (histidina) en el caso de los nucleósido trifosfato. Para el control de la unión, el grupo ácido del residuo aniónico se encontraría formando un puente salino con un grupo catiónico (lisina o arginina) impidiendo el acceso de los nucleótidos. Tras la protonación del grupo aniónico, el sitio catiónico quedaría al descubierto y sería entonces cuando el nucleótido cargado negativamente podría unirse.

Estudios posteriores intentaron identificar los residuos importantes para esta propuesta de regulación de la unión. La primera aproximación tuvo lugar mediante ensayos con reactivos químicos específicos, y posteriormente mediante estudios de fotooxidación, mutagénesis dirigida... [revisión Klingenberg & Huang, 1999]. De este modo, el residuo glutámico 190 se reveló como el posible responsable de la unión del grupo fosfato del nucleótido según su estado de protonación [Winkler *et al.*, 1997; Echtay *et al.*, 1997]. El mismo grupo también identificó la histidina 214 como responsable únicamente de la unión de los nucleótidos trifosfato [Echtay *et al.*, 1998]. Estos autores propusieron que, en estado ionizado, esta histidina deslocalizaría su carga mediante su interacción con un residuo aniónico (probablemente el aspártico 209 o el 210). La consecuencia de esto sería el desplazamiento del residuo y de este modo se permitiría el acceso del γ -fosfato al sitio de unión [Echtay *et al.*, 2000a]. Sin embargo, ambos residuos se han localizado en la cara citosólica de la proteína, lejos del sitio de unión del nucleótido localizado por fotoafinidad, por lo que otros autores han propuesto que la participación de estos residuos no es estructural en el sitio de unión, sino más bien controlando el acceso de los nucleótidos a su sitio de unión [Arechaga *et al.*, 2001; Ledesma *et al.*, 2002a].

Se estudiaron otros residuos de naturaleza básica que podían tener influencia en la dependencia de la unión según el pH como las lisinas 72 y 268, las histidinas 145 y 147 y las argininas 83, 91, 182 y 276. Experimentos de mutagénesis dirigida realizados



por diversos grupos demostraron que la modificación de cualquiera de las lisinas o histidinas no afecta de manera esencial a la dependencia al pH del centro de unión de nucleótidos de la UCP1 [ver revisiones González-Barroso *et al.*, 1999; Modriansky *et al.*, 1997; Klingenberg & Huang, 2001]. Sin embargo, la modificación de la arginina 91, aún afectando al transporte de cloruros, parece influir en la dependencia al pH aunque se propone que ello es debido a su contribución a la estabilidad de la proteína más que a la participación en el sitio de unión [Echtay, 2000a].

También se estudiaron otros residuos de naturaleza ácida como el aspártico 27 o el glutámico 267. Si bien en el caso del aspártico 27 su mutación provoca una ligera disminución en la afinidad de la unión de nucleótidos, no se ha observado que su modificación afecte a la dependencia al pH de la unión por lo que se propone que ello es debido a su contribución a la estabilidad de la proteína más que a la participación en el sitio de unión [Echtay *et al.*, 2000a]. De igual modo, la neutralización del glutámico 167 no afectaba a la dependencia al pH de la unión del nucleótido, pero disminuía drásticamente el transporte de Cl⁻ [Echtay *et al.*, 2000a; revisión Klingenberg & Echtay, 2001].

3.6.- MODELOS ESTRUCTURALES DE ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA UCP1

Una interesante característica de los miembros de la familia de los transportadores mitocondriales es el comportamiento dual que presentan a la hora de transportar moléculas, funcionando a veces como transportadores típicos y otras adoptando cinéticas de tipo canal (o poro) [revisión Rial *et al.*, 1998]. Numerosos estudios soportan estas observaciones:

- En el caso del AAC se ha visto que en presencia de Ca²⁺ se convierte en un canal con una conductancia que va de 300 a 600 pS [Brustovetsky & Klingenberg, 1996]. Este hecho se observó de manera similar en el PiC ya que al ponerle en presencia de cationes divalentes su conductancia pasaba de 25 pS a 40 pS [Herick *et al.*, 1997]. En la UCP1 la conductancia es de 75 pS pero no es dependiente de Ca²⁺ [Huang & Klingenberg, 1996a].
- La modificación de los grupos sulfidrilo lleva a una pérdida de especificidad de sustrato en un sitio de unión interno, pero no en los externos, y convierte el mecanismo de antiporte típico de estos transportadores en un mecanismo de uniporte que no presenta saturabilidad. Estas alteraciones originan una variación en las actividades transportadoras de estas proteínas, pero les permiten mantener en todo momento energías de activación y tasas de recambio que no permiten su clasificación como poros [Dierks *et al.*, 1990b] (ver punto 3.5.1.1). Un ejemplo de éstos son el AAC y el OGC, en los cuales la modificación de los grupos de cisteínas del primer y segundo *loop* matricial respectivamente modifica de manera drástica las propiedades del transporte mediado por ellos [Majima *et al.*, 1993].

- La deleción de la región 261-269 en el caso de la UCP1 convierte a la proteína en un poro de elevada conductividad [González-Barroso *et al.*, 1997].

Todos estos datos hacen que se considere que los transportadores mitocondriales presentan, estructuralmente hablando, dos dominios funcionales. El primero de ellos presentaría unas características que le asemejarían a un canal; y el otro, el que propiamente haría de la denominada "puerta", sería el responsable de las características particulares de cada transportador [revisión Rial *et al.*, 1998; Ledesma *et al.*, 2002a]. Rial y colaboradores propusieron que en la UCP1 las seis hélices α transmembranales se agrupan formando un canal donde los tres *loops* matriciales son los encargados de conformar el llamado dominio "puerta" [Arechaga *et al.*, 2001]. La observación de que las modificaciones en este dominio provocaban la pérdida de la regulación y especificidad de la de la proteína, y en casos extremos, la conversión de la proteína en un poro, son argumentos a favor esta hipótesis. En la UCP1, diversos ensayos de modificación química de sus cisteínas [Rial *et al.*, 1989] o experimentos de *patch-clamp* [Huang & Klingenberg, 1996a] demostraron que en estas circunstancias la proteína adquiriría una elevada conductividad independiente del Ca^{2+} , pero manteniendo una cierta regulación por nucleótidos y una selectividad hacia las especies transportadas. Los resultados de experimentos posteriores realizados por Rial y colaboradores, situaron al dominio 261-269 como probable parte integrante del dominio denominado "puerta" [González-Barroso *et al.*, 1997].

En 1997, Rial y colaboradores estudiaron la estructura tridimensional que podía adoptar la región C-terminal del tercer *loop* hidrofílico de la UCP1, considerada como parte integrante del dominio "puerta" (figura 17) [González-Barroso *et al.*, 1997]. Mediante la construcción y análisis por RMN de un péptido sintético de 20 aminoácidos que contenía la secuencia SCAMTYTKEGPAAFFKGFA (ver figura 50), estos autores propusieron una estructura tridimensional en la que región comprendida entre los residuos 263-268 (PAAFFK), situada hacia el extremo N-terminal de la hélice transmembrana VI (ver figura 10), adopta una estructura en hélice α . Propusieron además que la unión con la sexta región transmembrana, que tiene lugar por medio de la región comprendida entre los residuos 269-272 (GFAP), constituiría un giro β de tipo VIII [Hutchinson & Thornton, 1994]. Mediante

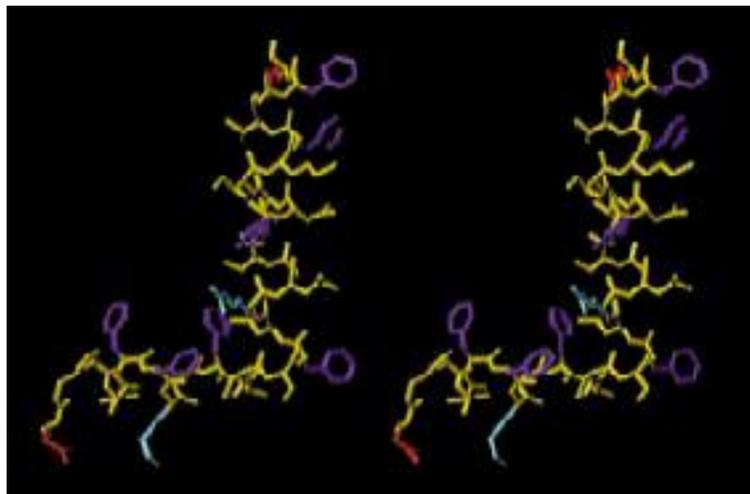


Figura 17 Modelado molecular de la región 261-269 de la UCP1 de rata y de la sexta hélice α transmembrana. Los dos subdominios se unen en la figura por un giro β . El glutámico 261 y el 269 vienen señalados en rojo, la lisina 268 y la arginina 276 en azul y los residuos aromáticos en dorado. Imagen extraída de González-Barroso *et al.*, [1999].



técnicas de modelado molecular, estos autores también propusieron que esta región de naturaleza anfipática comprendida entre los residuos 263-268, se sitúa casi en paralelo a la membrana lipídica [González-Barroso *et al.*, 1997].

3.6.1.- ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LOS MONÓMEROS DE LA UCP1

La primera estructura tridimensional completa de un transportador de la membrana interna mitocondrial es reciente. En el año 2003, Gérard Brandolin y colaboradores consiguieron por primera vez resolver la estructura del AAC bovino y esto

posibilitará comprender muchos de los aspectos funcionales de estas proteínas [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003]. La publicación de esta estructura, teniendo en cuenta la elevada homología existente entre el AAC y la UCP1 (figura 8), ofrece una gran información acerca de la posible organización estructural de la UCP1. Sin embargo, antes de la aparición de esta estructura, algunos autores ya habían formulado modelos estructurales para tratar de entender el funcionamiento de la UCP1. Mediante el análisis de secuencias, la búsqueda de homologías con estructuras ya resueltas, y la recolección de los diversos datos

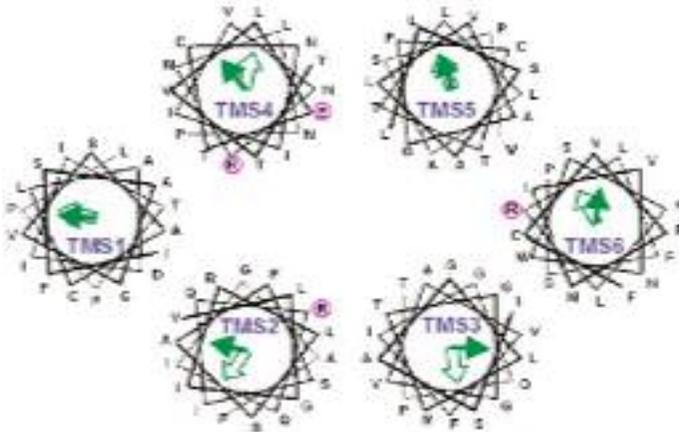


Figura 18 Modelo de organización transmembranal de la UCP1. La figura esquematiza las seis hélices transmembranales con su correspondiente momento hidrofóbico indicado por una flecha negra. El momento de variabilidad se esquematiza con una flecha vacía. Imagen modificada de Ledesma *et al.*, [2002a].

aparecidos (tanto biofísicos de baja resolución como de mutagénesis), Rial y colaboradores generaron un modelo de acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento [Ledesma *et al.*, 2002a].

El modelo de organización tridimensional de la UCP1 propuesto por estos autores que es el que viene reflejado en las figuras 18-20 y presenta numerosas analogías con la organización descrita para el AAC [Ledesma *et al.*, 2002a]. En él, la UCP1 presenta la estructura tripartita característica de los transportadores mitocondriales, con tres repeticiones cada una y dos dominios hidrofóbicos por repetición. Estos dos dominios comprenden de 17 a 20 aminoácidos y presentan una estructura en hélice α que constituye los segmentos transmembranales de la proteína.

En este modelo las seis hélices α transmembranales se organizarían formando una especie de barril de hélices antiparalelas de unos 25 a 30 Å de profundidad. Debido al carácter anfipático de las hélices, los residuos de naturaleza hidrofóbica mirarían hacia la membrana lipídica, y los de naturaleza polar hacia el interior de la proteína. Con estas consideraciones los autores evaluaron la orientación de los residuos analizando los perfiles de hidrofobicidad y la periodicidad de la variabilidad (figura 18). De este modo propusieron que la zona interna del barril constituiría la vía de transporte de la proteína y que los residuos cargados de las hélices α señalados como esenciales se orientarían hacia esta zona (glutámico 190 y las argininas 83, 182, y 276).



Teniendo también en cuenta que la unidad funcional de la proteína es un dímero, para que el contacto entre ambos monómeros pudiese tener lugar de un modo similar a lo observado en el AAC, los autores sugirieron una proximidad entre las hélices α I y VI de cada monómero. De este modo la obtención de la proteína en forma de monómeros covalentemente unidos en tándem podía ser posible.

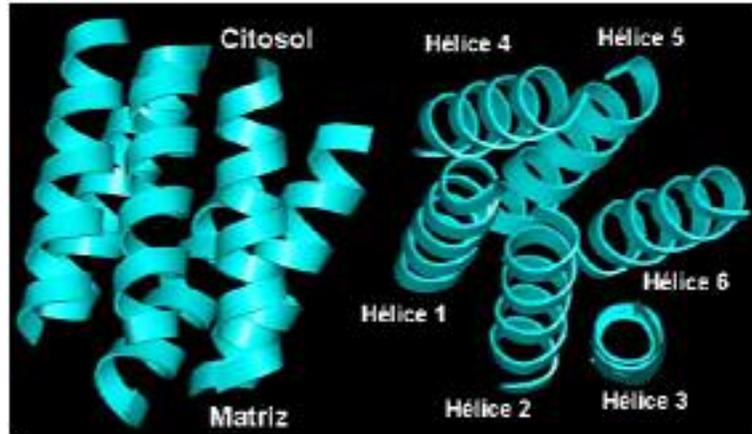


Figura 19 Modelo de organización transmembranal de la UCP1 en vista tridimensional. La figura muestra los seis segmentos transmembrana vistos en la imagen de la izquierda según se inserta en la membrana interna mitocondrial y en la derecha desde el citosol. Imagen modificada de Ledesma *et al.*, [2002a].

Propusieron también que los *loops* matriciales no penetraban en el interior del barril ya que, aparte de su inviabilidad estérica, su inserción podía interferir en la interacción de residuos esenciales para la unión del nucleótido como las argininas 83, 182 y 276.

Con todos estos datos Rial y colaboradores, mediante un análisis computacional de los datos recolectados y el posterior diseño 3-D, construyeron los modelos de las figuras 19 y 20. El modelo descrito en la figura 19 considera que en cada monómero se da un agrupamiento de los segmentos transmembrana para formar una especie de barril con los segmentos I, II y III en orientación antihoraria mientras que los segmentos IV, V y VI se orientan de forma horaria. Los *loops* por su parte, se orientarían formando el denominado dominio "puerta" [Arechaga *et al.*, 2001]. Ambos monómeros se organizan como se refleja en la figura 20 para formar el dímero [Ledesma *et al.*, 2002a].

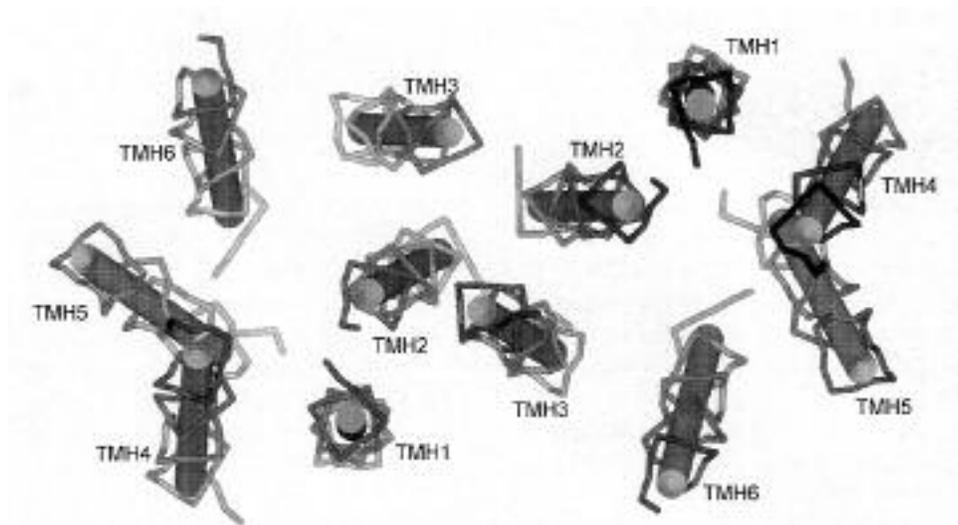


Figura 20 Modelo de organización transmembranal del dímero de la UCP1. Vista desde la cara citosólica de la membrana. Imagen extraída de Ledesma *et al.*, [2002a].



3.6.2.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL SITIO DE UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO DE LA UCP1

Hasta el momento la estructura del sitio de unión del nucleótido de la UCP1 se desconoce y sólo existen modelos. Uno de ellos fue el propuesto por Rial y colaboradores [Ledesma *et al.*, 2002a], que se fundamentó en las siguientes observaciones:

- Los experimentos de marcaje por fotoafinidad habían marcado la cisteína 253, la treonina 259 y la treonina 264 [Mayinger & Klingenberg, 1992].
- La treonina 264 había sido señalada como parte de una pequeña hélice α paralela a la membrana situada en el N-terminal de la hélice α VI [González-Barroso *et al.*, 1999].
- La mutación de las argininas 83, 182 y 276 (en las hélices II, IV y VI) provocaba una abolición drástica de la inhibición por nucleótidos de la UCP1 [Echtay *et al.*, 2001a].
- La fluorescencia del triptófano 173 se mostraba atenuada tras su interacción con yoduro, mientras que la unión del nucleótido se había visto que previene de la interacción con yoduro [González-Barroso *et al.*, 1999].

Con estos antecedentes, Rial y colaboradores propusieron un modelo estructural del sitio de unión del nucleótido a la UCP1 que *a posteriori* ha resultado bastante similar al descrito en el AAC. Este modelo propone una estructura tal que el nucleótido penetraría en el "barril" de hélices α por el lado citosólico de la proteína, en situaciones en las cuales el dominio "puerta" permitiría que su dominio de unión se mostrara accesible. La unión se daría en una zona más profunda de la proteína y la interacción proteína-nucleótido tendría lugar entre los tres *loops* matriciales (que contribuyen a la formación de un bolsillo hidrofóbico), el anillo de purina de los nucleótidos, las argininas de las hélices II, IV y VI y los grupos fosfatos de los nucleótidos. Al unirse, el nucleótido dejaría la cadena de polifosfatos orientada hacia el núcleo de la proteína como refleja la figura 21. Las cargas

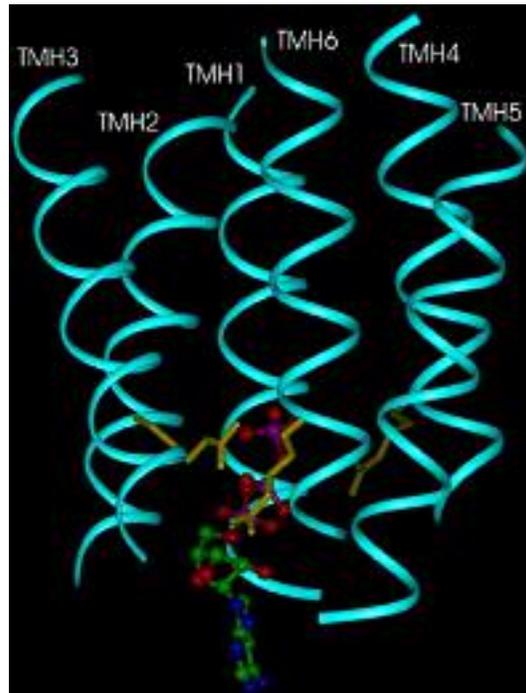


Figura 21 Modelo para la posición del nucleótido cuando se une a la UCP1 dentro del "barril". Para una mayor claridad, los autores han descrito las hélices α como cintas y solamente la arginina 83, la arginina 182 y la arginina 276 son mostradas para mostrar donde se sitúa la cadena de polifosfatos con respecto a estos tres residuos. Extraído de Ledesma *et al.*, [2002a].

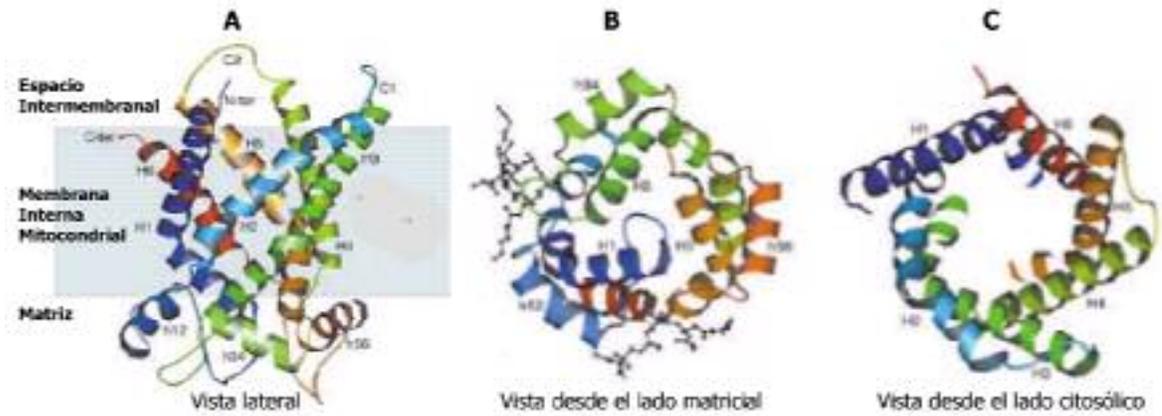


Figura 22 Arquitectura del AAC bovino. Las hélices transmembranales, las matriciales, los loops del espacio intermembranal y los del lado matricial se representan con las letras H, h, C o M, respectivamente. **A. Vista lateral.** la estructura está coloreada de acuerdo a la secuencia, de azul (N-terminal) a roja (C-terminal). Los límites de la membrana están dibujados de acuerdo con los segmentos hidrofóbicos de las hélices α . **B. Vista desde dentro.** Dos cardiolipinas están representadas en negro como líneas punteadas. **C. Vista desde citosol.** Modificado de Pebay-Peyroula *et al.*, [2003].

negativas en este caso, pueden establecer puentes salinos con cualquiera de los residuos de arginina de los segmentos transmembrana II, IV y VI (83, 182 o 276) y de este modo, se permite una interacción del anillo de purina con las cadenas laterales de los residuos identificados en los experimentos de fotoafinidad como integrantes del sitio de unión de los nucleótidos (aminoácidos 263-268) [González-Barroso *et al.*, 1999; Arechaga *et al.*, 2001; Ledesma *et al.*, 2002a].

3.6.3.- LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL AAC BOVINO Y DE SU DOMINIO DE UNIÓN DE NUCLEÓTIDOS

Como antes citamos, en el año 2003, Gérard Brandolin y su grupo consiguieron resolver por primera vez la estructura de una proteína transmembrana. Estos autores, mediante cristalografía de rayos X, obtuvieron la estructura del AAC bovino unido a carboxiatractilato a una resolución de 2.2 Å [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003]. La estructura del monómero del AAC resuelta se refleja en las figuras 22-23 y muestra a grandes rasgos las características ya señaladas en algunos de los modelos establecidos anteriormente [Walker & Runswick, 1993; Ledesma *et al.*, 2002a]. La estructura global consta de una zona transmembrana compuesta por seis hélices α transmembranales inclinadas unas respecto a las otras, y en posición ortogonal respecto al plano de la membrana lipídica. Las seis hélices forman una especie de barril que delimita una cavidad interna con forma cónica que se muestra accesible desde el espacio intermembranal. Esta cavidad presenta un diámetro máximo de 20 Å y una profundidad de unos 30 Å y presenta una superficie altamente hidrofílica. En su parte

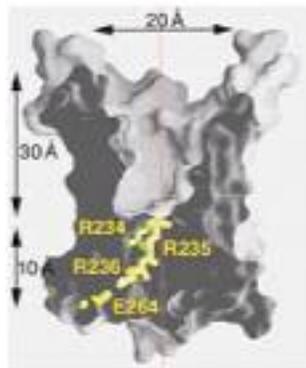


Figura 23 Sección del AAC bovino. En el fondo de la cavidad se señala la secuencia RRRMMM característica del AAC. Se observan tanto las dimensiones como la forma cónica de la cavidad que se abre hacia fuera. En el fondo de la cavidad se señala el recorrido través de la parte cerrada del transportador de las argininas del motivo común de los transportadores de nucleótidos. Imagen extraída de Pebay-Peyroula *et al.*, [2003].



inferior se sitúa el motivo común de los transportadores de nucleótidos (RRRMMM) que emerge de la parte inferior de la proteína (figura 23). El plegamiento de las tres repeticiones presentes en la secuencia del transportador (y muy probablemente en el resto de los miembros de la superfamilia) es muy similar y se refleja en la figura 24. Los *loops* matriciales que conectan las hélices impares y pares contienen pequeños fragmentos que adoptan una conformación en hélice α y se sitúan en paralelo a la superficie de la membrana lipídica, fortaleciendo una conformación cerrada hacia el espacio matricial del transportador. Las superficies que se orientan hacia la membrana son hidrofóbicas y muy probablemente interactúan con ella. Cada una de las hélices impares muestran un pronunciado pliegue que es debido a la presencia en la secuencia de un residuo de prolina que es característico de todos los transportadores mitocondriales (P-x-(D/E)-x₂-(K/R)). Expuesto hacia el espacio intermembrana, dos pequeños *loops* conectan las tres repeticiones.

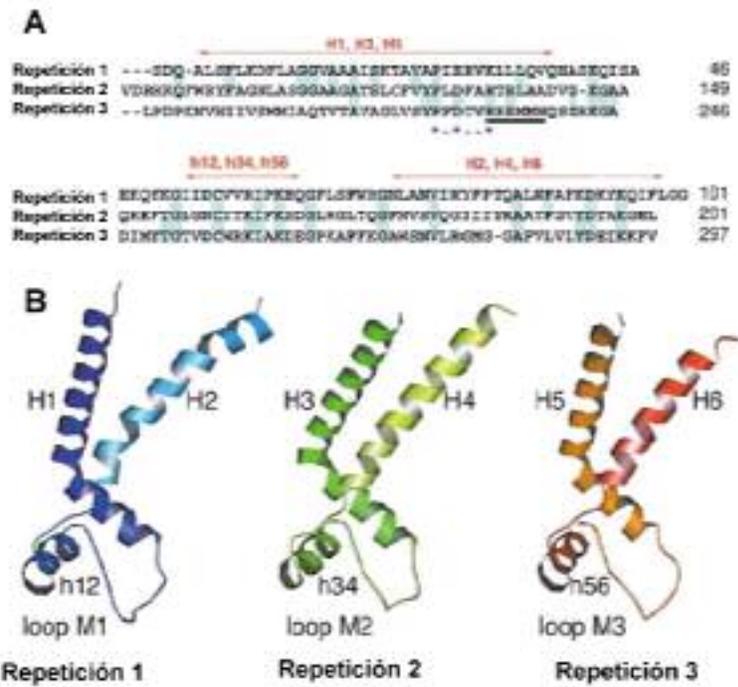


Figura 24 Las tres repeticiones del AAC bovino. A. Alineamiento de las secuencias de las tres repeticiones. Los residuos conservados se resaltan en azul y los * indican el motivo común de los transportadores mitocondriales. Las hélices se delimitan con flechas rojas y el motivo común de los transportadores de nucleótidos se subraya en negro. **B. Orientación tridimensional de las tres repeticiones.** La comparación de las estructuras demuestra que son muy similares. Imagen extraída de Pebay-Peyroula et al., [2003].

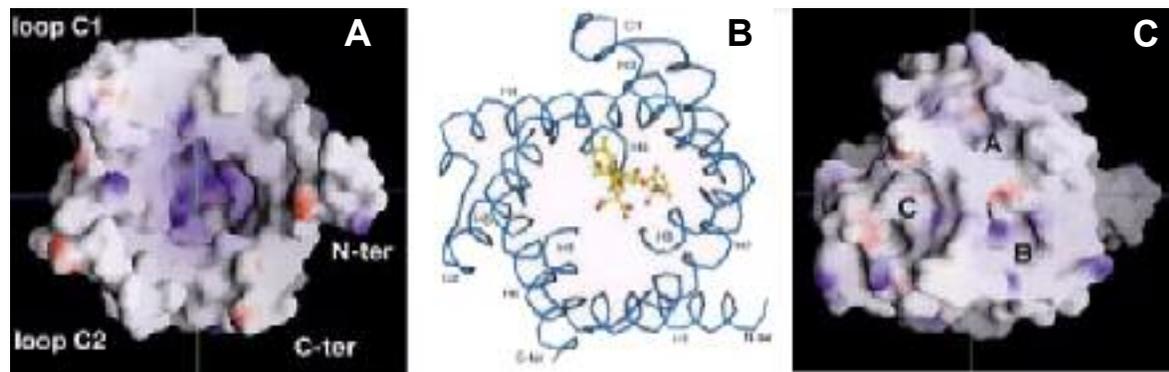


Figura 25 Topología del AAC. A. Vista desde el citosol. Se observa claramente la cavidad y una distribución asimétrica de las cargas vista desde el lado citosólico. **B. Vista desde el citosol.** Esquema del sitio de unión del carboxiatractilato, se observa la localización al fondo de la cavidad del carboxiatractilato. **C. Vista desde la matriz.** En esta imagen, A, B y C (en negro) son pequeñas cavidades. En B (Arg139/Lys162/Lys165) y C (Arg236/Arg243/Arg258/Lys259) se localizan los grupos de residuos catiónicos citados en el texto. Las imágenes A y C muestran potenciales electrostáticos de superficie. Se señalan en rojo las superficies negativas y en azul las positivas. Imágenes modificadas de de Pebay-Peyroula et al., [2003].

Respecto al dominio de unión del nucleótido, la estructura del AAC bovino revela que el nucleótido penetra en el barril de hélices α desde el lado citosólico y se aloja en lo más profundo de la cavidad en una posición desplazada (figura 25). La distribución de las cargas y de los residuos aromáticos es asimétrica dentro de la cavidad delimitada por el barril (figura 25). En ella, se observan dos grupos de residuos catiónicos (Arg139/Lys162/Lys165 y Arg236/Arg243/Arg258/Lys259) separados unos 10 Å entre ellos, y un grupo de tres tirosinas que se agrupan formando una especie de escalera (186, 190 y 194), y que parecen ser las encargadas de guiar al ADP a su sitio de unión. La unión por su parte, requiere numerosas interacciones tanto directas, entre el nucleótido y numerosos residuos del AAC (argininas 79, 187, 234, 235, las lisinas 22 y 32...), como indirectas a través de moléculas de agua (arginina 279). Esto explica la elevada selectividad y afinidad de este transportador [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003].

4.- PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A LA UCP1

4.1.- DESCUBRIMIENTO DE LAS NUEVAS UCPS

La expresión exclusiva de la UCP1 en el TAP y la participación esencial en la termogénesis desarrollada por este tejido es un hecho confirmado por numerosos autores [revisión Nicholls & Locke, 1984]. Sin embargo, en humanos adultos la presencia de TAP es escasa y a pesar de ello la termogénesis tiene lugar. En este caso, se ha visto que la termogénesis tiene lugar en otros tejidos como músculo esquelético, hígado y en menor medida en el TAB [Nobes *et al.*, 1990]. Algunos autores intentaron explicar este fenómeno como consecuencia de una fuga de protones a través de las membranas de las mitocondrias de estos tejidos, aunque su elevado valor (del 20 al 30% del total teórico del oxígeno consumido), indicaba que aparte de esto, algún otro componente de la membrana interna mitocondrial debía intervenir [Brand *et al.*, 1994; Brown, 1992]. La demostración de que el desacoplamiento observado en mitocondrias de tejidos distintos al TAP no era debido a la fuga de protones a través los fosfolípidos de la membrana [Brookes *et al.*, 1997], unido a la observación de que anticuerpos y secuencias de ADN complementario a la UCP1 se unían a proteínas y ARN de tejidos distintos al TAP, apuntó hacia la existencia de proteínas homólogas a la UCP1 en otros tejidos.

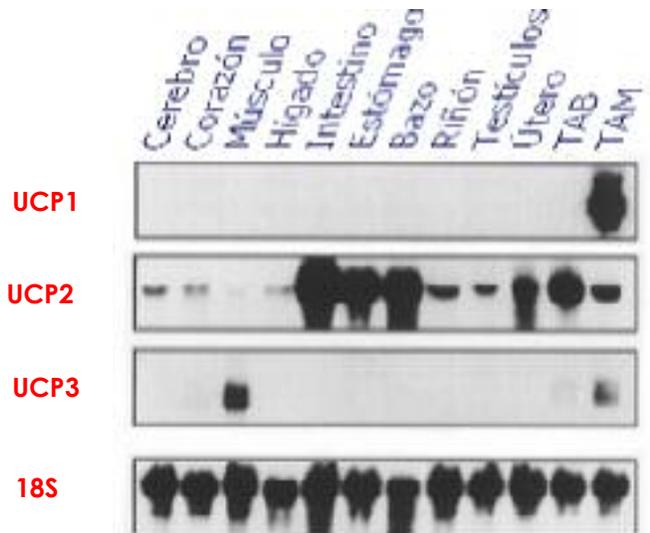


Figura 26 Patrón de expresión de las UCP1, UCP2 y UCP3. Se observa la expresión prácticamente ubicua de la UCP2, y la especificidad de la UCP1. En la figura TAM representa al TAP. Datos modificados de Ricquier & Bouillaud, [2000].

considerada como UCP. Se expresa exclusivamente en cerebro y se ha conseguido identificar tanto en humano como rata [Mao *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000b].

- La proteína BMCP1, del inglés *brain mitochondrial carrier protein*. También llamada por algunos autores UCP5 por su relativa homología con el resto de las UCPs (34% con la UCP1, del 38% con la UCP2 y del 39% con la UCP3). Presenta un patrón de expresión mayoritario en cerebro y testículos, aunque se ha identificado en numerosos tejidos. Se descrito en humano, ratón y rata [Sanchis *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000b].
- Las UCPs de plantas. También en plantas se han descrito UCPs. Con un tamaño de 32 KDa la primera de ellas fue identificada en la patata por Laloi *et al.* [1997]; se llamó *StUCP* (de *Solanum tuberosum*) y presenta un 41% de homología con la UCP1 y un 43% con la UCP2. Posteriormente se localizaron más: en *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP*), con un 41 y 46% de homología con la UCP1 y UCP2 respectivamente, en maíz (*OsUCP*), en repollo (*ScUCP*), trigo (*WhUCP*)...(tabla 2).

Hasta el momento se han identificado 45 genes considerados como isoformas de UCPs [Ricquier & Bouillaud, 2000] (ver tabla 2). Un alineamiento de las clases de UCPs conocidas se muestra en la figura 29 y refleja su elevado grado de homología. Ledesma *et al.* [2002b] analizaron la secuencia de todas ellas, y estimaron sus distancias evolutivas para obtener el árbol filogenético de la figura 27 en el que se reflejan las relaciones existentes entre todas las UCPs conocidas hasta ese momento.

4.2.- ESTRUCTURA GÉNICA DE LAS NUEVAS UCPs

En humanos y ratones, los genes de la UCP2 y UCP3 se encuentran separados por pocas kb [Pecqueur *et al.*, 1999]. En concreto, el gen de la UCP2 está localizado a unos 7-20 kb *downstream* de el codón stop del gen de la UCP3 y se ha identificado en humanos, entre los marcadores D11S916 y D11S911 del cromosoma 11q13, y en ratones en el cromosoma 7 [Fleury *et al.*, 1997; Boss *et al.*, 1998a]. La organización génica que presentan tanto el gen de la UCP2 como el de la UCP3 es similar al de la UCP1, con seis exones codificantes y uno (UCP2), o dos (UCP3) exones situados en el extremo 5' que no se traducen (figura 28) [revisiones Ricquier & Bouillaud, 2000].

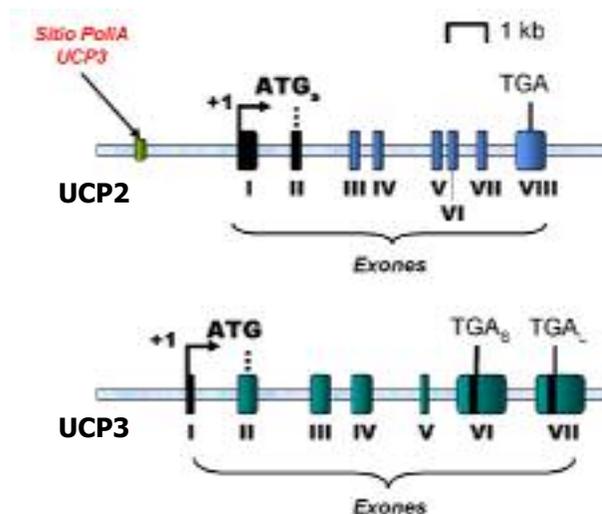


Figura 28 Estructura génica de las proteínas UCP2 y UCP3. Vienen señalados los exones de la UCP2 (azul) y de la UCP3 (verde) y el sito poliA de la UCP3. En negro se señalan los exones que no se traducen. Ver texto para explicación.



Clase	Proteína	Especie	Nombre común	Nº Acceso
UCP1	<i>BtUCP1</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca	P10861 [†]
	<i>CfUCP1</i>	<i>Canis familiaris</i>	Perro	Q9GMZ1
	<i>HsUCP1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Humano	P25874
	<i>RmUCP1</i>	<i>Macaca mulatta</i>	Mono	Q9N1E0 [†]
	<i>MaUCP1</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	Hámster Sirio	P04575
	<i>MmUCP1</i>	<i>Mus musculus</i>	Ratón	P12242
	<i>OcUCP1</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	P14271
	<i>PsUCP1</i>	<i>Phodopus sungorus</i>	Hámster Siberiano	Q9ER18
	<i>RnUCP1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	P04633
UCP2	<i>BtUCP2</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca	Q9XSE1 [†]
	<i>BrUCP2</i>	<i>Brachydanio rerio</i>	Pez cebra	Q9W720
	<i>CfUCP2</i>	<i>Canis familiaris</i>	Perro	Q9N2J1
	<i>CcUCP2</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa	Q9W725
	<i>HsUCP2</i>	<i>Homo sapiens</i>	Humano	P55851
	<i>RmUCP2</i>	<i>Macaca mulatta</i>	Mono	AF202130 ^{††}
	<i>MmUCP2</i>	<i>Mus musculus</i>	Ratón	P70406
	<i>PsUCP2</i>	<i>Phodopus sungorus</i>	Hámster Siberiano	Q9ER17
	<i>RnUCP2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	P56500
	<i>SsUCP2</i>	<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	O97562
UCP3	<i>BtUCP3</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca	O77792
	<i>CfUCP3</i>	<i>Canis familiaris</i>	Perro	Q9N2I9
	<i>EmUCP3</i>	<i>Eupetomena macroura</i>	Colibrí	Q98T90
	<i>GgUCP3</i>	<i>Gallus gallus</i>	Pollo	Q9DDT7
	<i>HsUCP3</i>	<i>Homo sapiens</i>	Humano	P55916
	<i>MmUCP3</i>	<i>Macaca mulatta</i>	Mono	Q9N1D8 [†]
	<i>MgUCP3</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	Pavo	Q90X50
	<i>MmUCP3</i>	<i>Mus musculus</i>	Ratón	P56501
	<i>PsUCP3</i>	<i>Phodopus sungorus</i>	Hámster Siberiano	Q9ER16 [†]
		<i>RnUCP3</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata
	<i>SsUCP3</i>	<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	O97649
UCP4	<i>HsUCP4</i>	<i>Homo sapiens</i>	Humano	O95847
	<i>RnUCP4</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	Q9EPH6
BMCP1	<i>HsBMCP1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Humano	O95258
	<i>MmBMCP1</i>	<i>Mus musculus</i>	Ratón	Q9Z2B2
	<i>RnBMCP1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	Q9JMH0
UCPs Plantas	<i>AtUCP1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mostaza silvestre	O65623
	<i>AtUCP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mostaza silvestre	Q9ZWG1
	<i>LeUCP</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	AF472619 [‡]
	<i>OsUCP1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Q9AVG2
	<i>OsUCP2</i>	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Q9AVG1
	<i>StUCP</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Patata	O24391
	<i>SrUCP</i>	<i>Sympllocarpus renifolius</i>	Remolacha	Q9MBE7
	<i>TaUCP</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Q9FXQ5
	<i>ZmUCP</i>	<i>Zea mays</i>	Maíz	AF461732 [‡]
UCP?	<i>PmUCP?</i>	<i>Pagrus major</i>	Pargo Japonés	AF487341 ^{†‡}

Tabla 2 Resumen de las 45 UCPs identificadas hasta el momento. Todos los números de acceso son del servidor SWISS-PROT/TrEMBL, excepto las marcadas con ‡ que tienen depositada la secuencia en GenBank. † Sólo parcialmente secuenciadas.

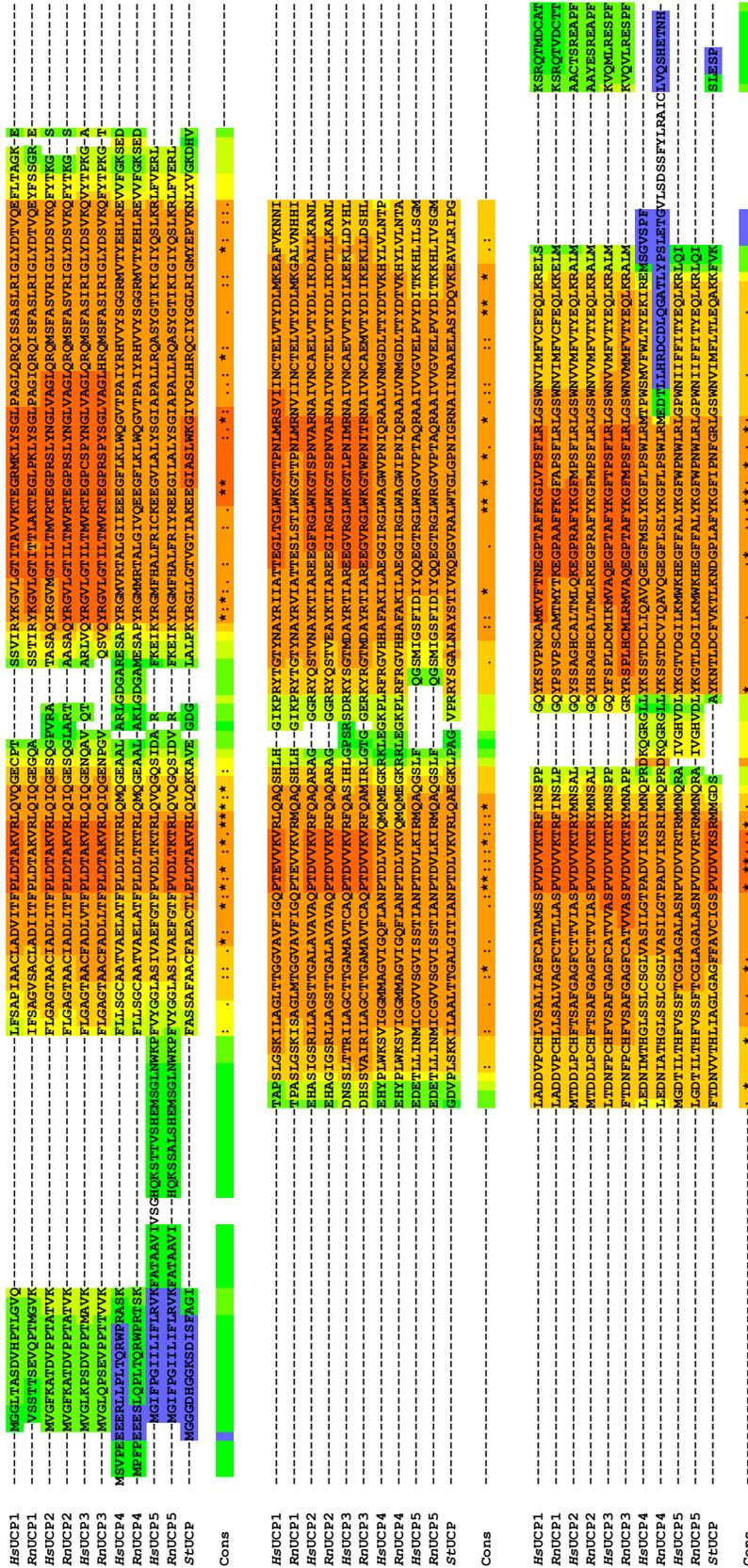


Figura 29 Alineamiento de las secuencias de las clases de las UCPs conocidas. El alineamiento se realizó con el programa informático T-coffe (versión 1.41) a través del servidor Expasy (<http://us.expasy.org>). Se han dividido las secuencias para mostrar que se mantiene en todas ellas una estructura tripartita en la en la cual existen varios residuos estrictamente conservados en cada una de las tres repeticiones. Las secuencias utilizadas se tomaron de las bases de datos del SwissProt y GenBank y tienen los números de acceso que se muestran en la tabla 2. Se observan los distintos grados de conservación de los residuos. La escala de colores () va del azul al rojo indicando del residuo menos conservado al más conservado. En la secuencia consenso se marcan con "*" los residuos estrictamente conservados, con ":" los altamente conservados y con "." los conservados.



La transcripción del gen de la UCP2 comienza en el exón 3 [Pecqueur *et al.*, 1999]. Una característica particular de este gen es la presencia de varios codones de iniciación (ATG) en el exón 2 que en determinadas situaciones codifican para un péptido de 36 aminoácidos de función desconocida, pero que no inhibe la síntesis de la UCP2 *in vitro*. Al contrario que el gen de la UCP1, el promotor de la UCP2 no presenta ni caja TATA ni CAAT, pero tiene una secuencia rica en GC y los motivos de unión de la caja CCAAT y de la caja Y [Yamada *et al.*, 1998].

Se ha descrito la existencia de una elevada regulación transcripcional debido a la presencia en regiones cercanas al promotor de sitios de unión de factores de transcripción como Sp1, AP-1 y AP-2, de elementos de respuesta a AMPc (CREB), receptores PPAR, sitios reguladores proteína activadora, y el factor regulador del músculo MyoD [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000; Ledesma *et al.*, 2002b]. Se ha propuesto que la exposición a ácidos grasos, ácidos grasos polinsaturados y prostaglandinas potencian la transcripción del gen mediante su unión a los receptores PPAR. También se han identificado otros reguladores indirectos de su expresión como la leptina, las citoquinas, las hormonas tiroideas y varios agonistas de los receptores β -adrenérgicos [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000; Dalgaard & Pedersen, 2001]. A nivel traduccional el gen presenta también una estrecha regulación ya que se ha demostrado que el aumento del transcrito de la UCP2 no se correlaciona en numerosas ocasiones con el incremento de la proteína [Enerback *et al.*, 1997]. Pecqueur *et al.* [2001] han descrito una potente regulación traduccional a la baja en *cis* mediante la transcripción del gen a partir de un marco abierto de lectura localizado en el exón 2 del gen de la UCP2.

Por su parte, el gen de la UCP3 se encuentra organizado en siete exones en una localización muy próxima al extremo 5' del gen de la UCP2, y al igual que en ésta, no todos sus exones se transcriben (figura 28). En humanos, se ha visto que puede codificar

	UCP1		UCP2			UCP3		
	TAP	TAP	TAB	Músculo esquelético	Otros	TAP	TAB	Músculo esquelético
Leptina	↑	→	↑	→	-	↑	-	↑→
Insulina	↑	→	→	→	-	→	-	→
Glucocorticoides	↓	↓	-	↓	-	↓	-	↑→
T3	↑	↑	↑	↑	-	↑	-	↑
Agonistas- β 3	↑	→	↑	↑→	↑ ^a	→	↑	↑→
Estimulantes de PPAR	↑	-	↑→	-	↑ ^b	-	↑	β
TNF α	↑	↑	↑	↑	↑ ^a	-	-	↑
Ácidos grasos libres	-	-	-	↑	-	-	-	↑
	TAP	TAP	TAB	Músculo esquelético	Otros	TAP	Otros	Músculo esquelético
Frío	↑	↑	-	↑ ^e	↑ ^d	↑	-	↑ ^e
Ejercicio crónico	→	→	→	↓→	↓ ^d	↓	→ ^d	↓→
Dieta grasa	↑	→	↑	→	↑ ^a	→	→ ^a	↑→
Ayuno	↓	→↓	↑	↑→	→ ^d	↓	→ ^a	↑→

Tabla 3 Regulación de la expresión de los ARNm de las UCP1, UCP2 y UCP3 bajo la acción de diversas situaciones metabólicas, de diversas hormonas, o de diferentes situaciones ambientales o fisiológicas. En el caso de la UCP1 los resultados señalados reflejan los niveles detectados tanto de mensajeros como de proteína. ^a Hígado, ^b Islotes pancreáticos, ^c TAB, ^d Corazón, ^e Dependiente del tiempo de inducción. Datos extraídos de Dalgaard & Pedersen, [2001].



para dos isoformas, UCP3_L y UCP3_S, denominadas así por su diferente tamaño (312 y 275 aminoácidos respectivamente). La isoforma UCP3_S se genera por corte alternativo del último de los intrones del gen y genera una proteína que tiene deleciónado el último de los dominios transmembrana (característico de los transportadores mitocondriales) [Boss *et al.*, 1997a]. En músculo esquelético de humanos las dos isoformas se expresan en la misma proporción, sin embargo en ratones, únicamente se ha identificado la existencia de una de las isoformas [Millet *et al.*, 1997; Solanes *et al.*, 1997]. Presenta también una estricta regulación transcripcional pero los mecanismos moleculares que controlan la expresión no son todavía muy conocidos. Se ha descrito que en las regiones cercanas al extremo 5' del gen existen sitios potenciales de unión a diversos reguladores de la transcripción, como a reguladores del músculo MyoD y MEF2, a receptores de hormonas tiroideas y a PPAR [Acín *et al.*, 1999].

Experimentalmente se ha observado que los factores que regulan la transcripción y traducción del gen de la UCP1, así como diversos factores ambientales y fisiológicos, también pueden afectar de diversas maneras a la transcripción de los genes de la UCP2 y UCP3 según el órgano donde se expresen (ver tabla 3) [revisión Dalgaard & Pedersen, 2001].

Respecto a la UCP4 y UCP5, sus genes están aún poco estudiados. La UCP4 fue localizada en humanos cerca del marcador genético SHGC-34952 en el cromosoma 6p11.2-q12 y la UCP5 en el cromosoma X en la región q25-26. De la UCP5, en humanos, se conoce la existencia de al menos dos isoformas con propiedades bioquímicas diferentes: la UCP5_L, identificada predominantemente en cerebro, y la UCP5_S que pierde una secuencia de tres aminoácidos (valina-serina-glicina) localizada en la posición 23 de la isoforma UCP5_L, y que se expresa de manera residual en otros tejidos distintos al cerebro [Sanchis *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000b; revisión Adams, 2000].

Finalmente, hay que decir que las UCPs de plantas presentan una organización génica algo distinta. En *Arabidopsis* por ejemplo, todos los genes de UCPs descritos presentan nueve exones [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000].

4.3.- ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS NUEVAS UCPs

No existen datos relevantes de la estructura de las nuevas UCPs. La mayoría de ellos se basan en un análisis de las secuencias identificadas como el de la figura 29. Se acepta que, por su elevada homología de secuencia con la UCP1, presentan un modelo estructural similar a ésta y por extensión al de los transportadores de mitocondriales: una estructura tripartita compuesta por 3 repeticiones de unos 100 aminoácidos cada una. De este modo, el modelo de plegamiento estructural de la UCP2 debería ser muy similar al del esquema mostrado en la figura 10. Posteriormente se ha visto que, debido a la existencia de un corte alternativo durante la transcripción del gen de alguna de ellas como la UCP3 o la UCP5, el plegamiento estructural de las isoformas cortas no puede ser igual [revisión Ricquier & Bouillaud, 2000].



4.4.- FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS NUEVAS UCPs

El descubrimiento de esta nueva familia de proteínas de elevada homología hizo sospechar en un primer momento que la función de todas ellas podría ser análoga a la de la UCP1 y que, por lo tanto, su principal función sería la de llevar a cabo el proceso de termogénesis en los tejidos donde se expresan. Numerosos estudios se han desarrollado para intentar contrastar esta posibilidad (monitorización de ARNm, detección de la proteína, creación de *knockouts*...) y, si bien en el caso de la UCP2 y UCP3 la tendencia generalizada les sitúa como verdaderas proteínas desacoplantes con funciones varias, en el caso del resto de UCPs su papel es aún controvertido.

4.4.1.- LA UCP2

La amplia expresión de la UCP2 (figura 26) la situó en un primer momento como la principal candidata a ser la responsable de la termogénesis adaptativa en respuesta al frío y a la dieta en humanos. Sin embargo, su patrón de expresión prácticamente ubicuo y los resultados de posteriores experimentos, han sugerido una intervención esencial de esta proteína en el control de la producción de los radicales libres (y por lo tanto en la regulación de la respuesta inmune), en la regulación del metabolismo de los lípidos y en el control de la secreción de insulina [revisiones Boss *et al.*, 2000, Ricquier & Bouillaud, 2000; Saleh *et al.*, 2002].

4.4.1.1.- La UCP2 como reguladora del metabolismo

Varios grupos han expresado con éxito el gen de la UCP2 en levaduras y en células en cultivo. Los resultados obtenidos indican una caída del potencial de membrana [Fleury *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 1997] y un incremento en la producción de calor de estas mitocondrias [Paulik *et al.*, 1998]. De igual forma, la reconstitución de la proteína en liposomas se ha visto que incrementa el flujo de protones de forma similar a la UCP1 [Jaburek *et al.*, 1999]. También el estudio de timocitos de ratones *knockout* para la UCP2 demostró que ésta era responsable de un 50% de la tasa metabólica basal por lo que era evidente que ejercía una función desacoplante [Krauss *et al.*, 2002]. Ésto, unido a su elevado parecido con la UCP1 la situó en un primer momento, y de modo análogo a la UCP1, como principal responsable de la termogénesis de los tejidos donde se expresaba. Varios estudios así lo proponen (tabla 3):

- Se ha comprobado que los niveles de ARNm de la UCP2 fluctúan entre situaciones de hipotiroidismo e hipertiroidismo. El nivel de hormonas tiroideas en sangre se correlaciona de manera directa con la tasa metabólica de modo que su incremento aumenta el desacoplamiento de las mitocondrias de hígado y músculo esquelético [Lanni *et al.*, 1999].
- La expresión de la UCP2 en hepatocitos de roedores es prácticamente nominal, pero en ratones *ob/ob* (leptina deficientes) su expresión se encuentra inducida y esto se correlaciona con una



elevada tasa de desacoplamiento en las mitocondrias de estos hepatocitos [Chavin *et al.*, 1999; Melia *et al.*, 1999].

- Como respuesta a una situación de frío, se ha visto que la expresión de la UCP2 en el TAP aumenta de manera paralela a la expresión de la UCP1 [Boss *et al.*, 1997a; Carmona *et al.*, 1998].
- La recuperación de la temperatura corporal después de una situación de hipotermia mediada por endotoxinas, se ha visto que también se correlaciona con un aumento en los niveles de ARNm de la UCP2 en músculo esquelético.
- Se ha observado que, tras una alimentación a base de una dieta rica en grasas durante dos o tres semanas, la expresión de la UCP2 en ratones obeso-resistentes (A/J) es mucho mayor que en ratones propensos a la obesidad (C57BL6/J) [Fleury *et al.*, 1997; Surwit *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 1999].

Sin embargo, los resultados obtenidos en otros estudios fisiológicos cuestionan el papel termogénico de la UCP2 *in situ* ya que se ha demostrado que el aumento del transcrito de la UCP2 no se correlaciona necesariamente, ni con un incremento en la cantidad o actividad de la proteína, ni con un aumento en la tasa de desacoplamiento de las mitocondrias aisladas a partir de esos tejidos (tabla 3):

- En situaciones de ayuno, en las cuales se debería fomentar una situación de ahorro energético en el individuo, la expresión de la UCP2 en músculo esquelético de roedores, aumenta [Boss *et al.*, 1997a; Cadenas *et al.*, 1999; Samec *et al.*, 1998a; Weigle *et al.*, 1998].
- El tratamiento de ratones con endotoxinas no se han correlacionado con una mayor tasa de desacoplamiento de las mitocondrias aisladas [Cadenas *et al.*, 1999].
- En ratones *knockout* de la UCP1, donde se ha comprobado un incremento en la expresión de la UCP2 en mitocondrias de TAP [Enerback *et al.*, 1997], se ha visto que la tasa de desacoplamiento de sus mitocondrias es similar a la que se observa en mitocondrias controles que no la expresan y además, estos animales son sensibles al frío [Monemdjou, 1999].
- En humanos obesos expuestos a dieta hipocalórica se observa un incremento en la expresión de la UCP2 en TAB y músculo, y sin embargo, sus mitocondrias muestran una tasa metabólica basal disminuida [Millet *et al.*, 1997; Vidal Puig *et al.*; 1999].



- En ratones obesos con genotipo *ob/ob* o *db/db* se ha comprobado también un aumento de transcrito de la UCP2 en hígado y TAB [Chavin *et al.*, 1999].

Tan contradictorios resultados hicieron que se descartase el papel termogénico a nivel corporal de la proteína, y se han buscado otros posibles papeles para la UCP2 a nivel fisiológico [revisión Boss *et al.*, 2000b; Saleh *et al.*, 2002; Horvath *et al.*, 2003].

4.4.1.2.- Control de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

Durante el estado 4 de la respiración, el potencial de membrana de las mitocondrias aumenta, y concomitantemente la producción de radicales libres [Turrens, 1997]. En la mitocondria, estas ROS se producen principalmente durante la respiración,

cuando una pequeña proporción de moléculas de oxígeno se convierten en radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) tras la reducción de un electrón del O_2 por los complejos I y III de la cadena respiratoria (ver explicación en figura 30) [Boveris & Chance, 1973]. Las ROS se producen también en peroxisomas, retículo endoplásmico, leucocitos, macrófagos..., y son consecuencia de procesos como la degradación de los ácidos grasos o de otras moléculas, o de procesos que defienden contra diversos tóxicos.

En macrófagos, la generación de ROS previene de infecciones provocando la destrucción de las células extrañas. Sin embargo, el exceso de ROS puede causar numerosos trastornos como la peroxidación de los lípidos, el daño del ADN mitocondrial, la modificación de las proteínas o la inducción de diversos factores transcripcionales que alterarían la transcripción de los genes [Lee *et al.*, 1999].

Los primeros autores que relacionaron la producción de ROS con la UCP2 fueron Casteilla y colaboradores [Nègre-Salvayre *et al.*, 1997]. Estos autores observaron que la adición de GDP a adipocitos pardos provocaba un aumento en el potencial de membrana de sus mitocondrias y por lo tanto un aumento en la generación de ROS. Posteriormente, Diehl y su grupo observaron una correlación entre la proteína y su transcrito con la producción de H_2O_2 en macrófagos y hepatocitos de ratones *ob/ob* [Lee *et al.*, 1999]. Estudiaron también el efecto del $TNF\alpha$ en los hepatocitos de estos ratones, y vieron que incrementaba la generación de oxidantes. Los mismos autores analizaron la expresión de la UCP2 en cultivos de hepatocitos en presencia de una emulsión de lípidos y observaron que en primer lugar se producía un rápido incremento de ROS para

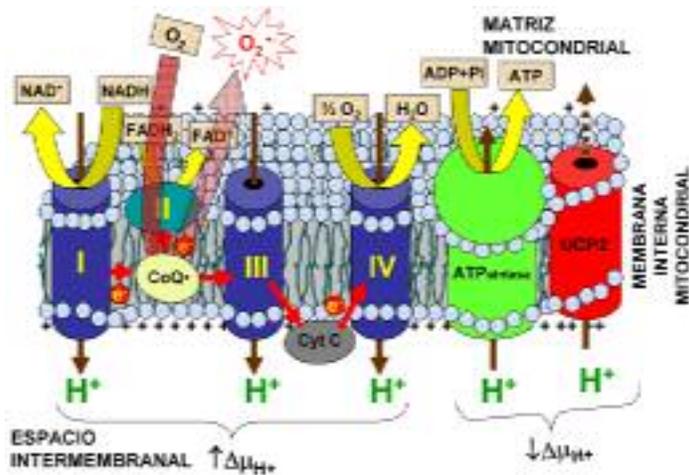


Figura 30 Formación de ROS en la mitocondria. La formación de ROS depende del potencial de membrana. Un elevado potencial de membrana lleva a la inhibición del transporte de electrones por la cadena respiratoria provocando un incremento en la vida media de los intermediarios capaces de reducir el oxígeno a aniones superóxido como el radical semiquinona. Las UCPs y más en concreto la UCP2 median la disminución del potencial de membrana, particularmente en condiciones de poca disponibilidad de ADP, por lo que se propone que disminuyen la producción de ROS.



posteriormente observar una clara inducción del gen [Cortez-Pinto *et al.*, 1998]. Todo esto les llevó a proponer un papel para la UCP2 como protectora de la lipotoxicidad y del daño oxidativo. Así, a través del control de las ROS generadas por el incremento en el almacenaje o la oxidación de los ácidos grasos, la UCP2 actuaría como protectora de la apoptosis en los hepatocitos del hígado graso [Rashid *et al.*, 1999; Pastore *et al.*, 2000].

Un año después, el estudio de ratones *knockout* para la UCP2 demostró que estos animales no presentaban un fenotipo obeso, ni sensible al frío, pero las mitocondrias de sus macrófagos mostraban un alto potencial de membrana y una producción de radicales libres muy elevada. Esta característica permitía a estos ratones resistir a la infección por *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular que infectaba letalmente el cerebro de ratones [Arsenijevic *et al.*, 2000]. Esto llevó a algunos autores a proponer que la UCP2 también podía tener un papel esencial en la defensa inmunitaria.

El hecho que en situaciones de estrés oxidativo la transcripción del gen de la UCP2 en macrófagos se encuentre disminuida, es otra de las observaciones que apoyan este papel para la UCP2 de reguladora de ROS. En cerebro, la expresión del gen de la UCP2 se da en poblaciones neuronales muy específicas del sistema nervioso central relacionadas con los mecanismos de respuesta rápida que intervienen en la homeostasis del individuo [Horvath *et al.*, 1999]. Sin embargo, se ha visto que en situaciones neurodegenerativas como la isquemia, la expresión se puede inducir en regiones donde normalmente no se expresa. Esta inducción de la proteína se ha demostrado que es inversamente proporcional a la activación de la caspasa 3 y ésta a su vez, es directamente proporcional a la producción de ROS. La caspasa 3 es una proteína vital, ya que contribuye al daño cerebral provocado por la isquemia tras desencadenar la cascada apoptogénica [Bechmann *et al.*, 2002]. Recientemente se ha demostrado en ratones que la sobreexpresión del gen de la UCP2 en el cerebro protege del daño neuronal subyacente a cualquier situación de trauma cerebral y favorece la recuperación de las capacidades neurológicas de estos individuos [Mattiasson *et al.*, 2003]. Los mismos autores observaron que el desacoplamiento parcial inducido por agentes desacoplantes, como el 2,4 dinitrofenol, reducían la muerte en poblaciones neuronales sometidas a situaciones de privación celular de oxígeno o glucosa. De manera análoga, en el corazón se ha visto que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa protege del daño oxidativo provocado tras una situación de hipoxia y posterior reoxigenación del tejido cardíaco [Minners *et al.*, 2000]. La transfección de células H9c2 (derivadas de tejido embrionario de corazón) con el gen de la UCP1, ha demostrado un incremento en la supervivencia de éstas en situaciones de estrés oxidativo [Bienengraeber *et al.*, 2003]. De este modo, varios autores han propuesto que la UCP2 es una proteína inducible de función protectora tanto en cerebro como en corazón. Mediante la activación de diversas señales *redox* o induciendo un desacoplamiento parcial que limita la generación de ROS [Skulachev, 1996], la UCP2 previene del daño celular derivado de las situaciones de trauma oxidativo [Mattiasson *et al.*, 2003; Teshima *et al.*, 2003].

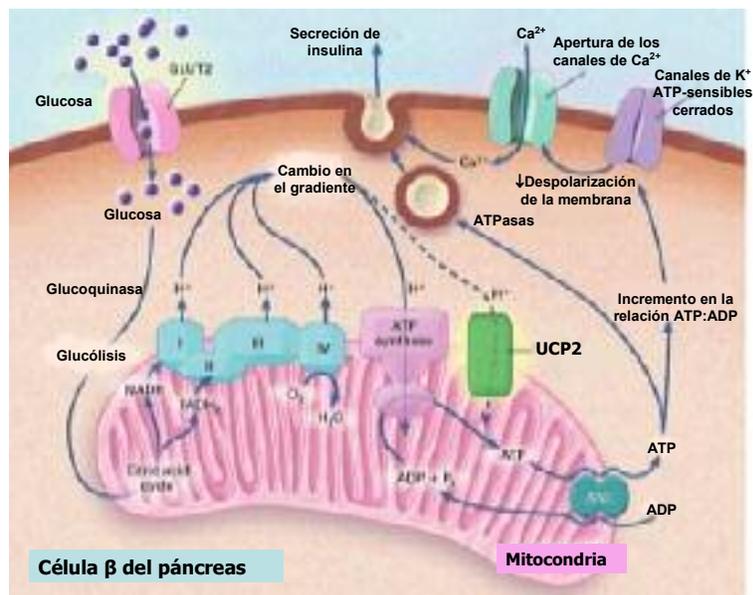
4.4.1.3.- Control del metabolismo de los ácidos grasos libres

Varias investigaciones sugirieron que la UCP2 podría mediar en el proceso de oxidación de los ácidos grasos libres [Samec *et al.*, 1998b; Wang *et al.*, 1999]. El hecho de que la expresión de la UCP2 en los adipocitos del TAB y en células del músculo esquelético

se incrementase en situaciones como el ayuno [Millet *et al.*, 1997; Boss *et al.*, 2000] o tras la estimulación con leptina [Cusin *et al.*, 1998; Scarpace *et al.*, 1998], en las cuales se observa un aumento en los niveles de ácidos grasos, sugirió que la UCP2 podría mediar provocando un cambio en el metabolismo de los ácidos grasos. En este caso la UCP2 actuaría promoviendo la utilización de los ácidos grasos para la obtención de ATP en la mitocondria y permitiendo que la glucosa sea utilizada en otros órganos con mayores requerimientos (como por ejemplo el cerebro) [revisión Dulloo & Samec, 2001]. El tratamiento en situaciones de ayuno con agentes antilipolíticos como el ácido nicotínico ha mostrado una inhibición del incremento en la transcripción del gen de la UCP2 en determinadas fibras oxidativas del tejido muscular, por lo que se propone que la señal fisiológica que desencadena esta desviación del metabolismo son los ácidos grasos y que la UCP2 actuaría previniendo del daño oxidativo provocado por elevados niveles de lípidos o incluso favoreciendo un proceso de oxidación de los ácidos grasos no acoplado a procesos dependientes de energía [Samec *et al.*, 1998a]. Sin embargo, este efecto inhibitorio de la expresión del gen de la UCP2 por agentes antilipolíticos no se observa en las fibras musculares del metabolismo glicolítico. Este fenómeno es explicado por algunos autores afirmando que en estos casos la regulación de la proteína se da a nivel traduccional [revisión Saleh *et al.*, 2002].

4.4.1.4.- Control de la relación ATP:ADP e influencia en la diabetes tipo II

La regulación de la glucosa en sangre es mantenida por las células β del páncreas que secretan insulina de manera proporcional al incremento de la glucosa circulante que detectan a través de sus receptores GLUT2. Las células β captan la glucosa y la emplean para aumentar la producción de ATP, incrementando así la relación ATP:ADP y provocando el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP de la célula. Esto provoca una hiperpolarización de la membrana que hace que los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes se abran y se permita la entrada de Ca^{2+} en la célula β . Esta entrada de calcio es la responsable de la secreción de las vesículas de insulina sintetizada en la célula β en un proceso dependiente de ATP (figura 31).



Toda esta fisiología indicaba que el gen de la UCP2 debía participar de alguna manera en el proceso. Así, algunos autores han observado que el gen de la UCP2 se encuentra atenuado en las ratas ZDF que acumulan lípidos (del inglés *Zucker diabetic rats*), mientras que en islotes normales, la leptina o diversos ligandos de PPAR- γ hacen

Figura 31 Papel de la UCP2 en la secreción de la insulina en la célula β del páncreas. Ver texto para explicación. Imagen modificada de Langin *et al.*, [2001].



que se sobreexpresa [revisión Saleh *et al.*, 2002]. Esta sobreexpresión del mensajero de la UCP2, tanto en islotes de ratas [Chan *et al.*, 1999] como en cultivos de células β [Chan *et al.*, 2001], se ha visto que provoca la disminución de los niveles de ATP de la célula y por lo tanto, el bloqueo de la secreción de insulina estimulada por glucosa [Chan *et al.*, 1999]. El estudio de *knockouts* de la UCP2 reveló también que estos ratones presentaban unos niveles de glucosa en sangre bajos y unos elevados niveles de insulina debido a su sobreestimada secreción en la célula β . Se propuso de este modo que la UCP2 podría tener un papel esencial en el proceso de secreción de la insulina y por lo tanto, en el desarrollo de un proceso de diabetes tipo II. Algunos autores argumentaron esta propuesta con *knockouts* del gen de la UCP2 inducidos a partir de ratones *ob/ob*. Los islotes de los ratones *ob/ob* presentan el gen de la UCP2 sobreexpresado y muestran un fenotipo obeso y diabético. Al perderle, estos ratones muestran en primer lugar una recuperación de la secreción de insulina, y posteriormente una disminución drástica de los niveles de glucosa en la sangre [Zhang *et al.*, 2001].

Sin embargo, esta correlación entre la sobreexpresión de la UCP2 y el riesgo de diabetes no puede extenderse a todos los tejidos donde la UCP2 se expresa. Este paralelismo se cumple únicamente en las células β ya que, al contrario que en éstas, en tejido adiposo y muscular se ha visto que el incremento de la expresión de la UCP2 parece tener una relación inversa con el desarrollo de la diabetes tipo II [Li *et al.*, 2000]. De igual modo se ha visto que la relación ATP:ADP no aumenta ni en bazo ni en pulmón en ratones *knockouts* de la UCP2 por lo que se cree la función fisiológica de la UCP2 puede depender del órgano en el que se exprese [Couplan *et al.*, 2002].

4.4.1.5.- Regulación a nivel molecular de la UCP2

La gran homología existente entre la UCP2 y la UCP1 llevó a varios autores a buscar los posibles reguladores fisiológicos de la UCP2 dentro de los conocidos para la UCP1. Actualmente las discrepancias en este aspecto son grandes, y si bien algunos autores defienden la idea de que tanto la UCP1 como la UCP2 o UCP3 se regulan de la misma manera [Jaburek & Garlid, 2003], el distinto comportamiento de ambas proteínas bajo las mismas condiciones de experimentación hace que se acepte que la regulación de la UCP2 es bastante diferente a la de la UCP1 [revisiones Ricquier & Bouillaud, 2000; Bouillaud *et al.*, 2001; Ledesma *et al.*, 2002b].

La adición de ácidos grasos a mitocondrias de levaduras aisladas que expresan el gen de la UCP2, no se ha observado que ejerza ningún tipo de efecto sobre el desacoplamiento que provoca la expresión ectópica de la proteína [Rial *et al.*, 1999]. Otros grupos por el contrario, en liposomas con UCP2 reconstituida en presencia de ubiquinona y ácidos grasos, han conseguido reconstituir una tasa de transporte de protones y aniones similar a la que observan con la UCP1 [Jaburek *et al.*, 1999; Echtay *et al.*, 2001b; revisión Klingenberg 2001].

Lo mismo ocurre en el caso de los nucleótidos. Algunos autores, estudiando mitocondrias de levaduras aisladas, no han observado ningún efecto de los nucleótidos sobre la tasa de desacoplamiento basal, ni sobre la actividad desacoplante mediada por la UCP2 [Zhang *et al.*, 1999; Rial *et al.*, 1999]. El mismo estudio pero con UCP2 expresada en células INS-1 aportó los mismos resultados [Fink *et al.*, 2002]. Sin embargo, otros



autores sí que han observado un efecto inhibitorio de los nucleótidos en sistemas reconstituidos. Garlid y colaboradores afirman que la actividad transportadora de la UCP2 estudiada en liposomas, y reconstituida a partir de cuerpos de inclusión de bacterias, puede inhibirse tras la adición de altas concentraciones de nucleótidos [Jaburek *et al.*, 1999; Jaburek & Garlid, 2003]. De forma análoga, y tras el descubrimiento de la ubiquinona como cofactor esencial para el transporte de protones a través de las UCPs, Brand, Klingenberg y colaboradores también han corroborado este efecto regulador de los nucleótidos sobre la UCP2 [Echtay & Brand, 2001; Echtay *et al.*, 2001b].

El estudio de otro de los activadores de la UCP1, el ácido *todo-trans* retinoico refleja las mismas discrepancias según los sistemas de experimentación empleados y los órganos de los que se extraen las muestras. En presencia de este regulador, algunos autores han visto que la respiración de las mitocondrias de levaduras que expresan UCP2 se acelera, de igual forma que ocurre en mitocondrias que incorporan UCP1, pero con una cinética distinta. Mientras que la UCP1 tiene una amplia tolerancia hacia los ligandos activadores, la UCP2 en condiciones fisiológicas muestra una elevada dependencia del pH, alta especificidad y una mayor tasa de transporte que la UCP1 en presencia de retinoides [Rial *et al.*, 1999]. Estos resultados se han contrastado en timocitos de ratones *knockout* de la UCP2, en los cuales, se ha observado que la pérdida del gen conlleva a la ausencia de la sensibilidad a retinoides que estaba presente en los timocitos de fenotipo salvaje [Krauss *et al.*, 2002]. Sin embargo, no ocurre lo mismo en las mitocondrias de bazo o pulmón de ratón en las cuales, a pesar de mostrar una elevada expresión de UCP2, Bouillaud y colaboradores han observado que el ácido retinoico no provoca un incremento en el desacoplamiento de estas mitocondrias [Couplan *et al.*, 2002].

Recientemente se ha descrito que los radicales superóxido son capaces de desacoplar las mitocondrias de riñón, bazo y células β de rata. Esto ha hecho que algunos autores sitúen a las ROS como posibles reguladoras de las UCPs. En el año 2002, Martin Brand y colaboradores demostraron que los radicales superóxido activan el transporte de protones mediado por las UCPs tras su interacción con éstas desde el lado matricial [Echtay *et al.*, 2002a; 2002b]. Este transporte de H^+ requiere de la presencia de ácidos grasos y es muy sensible a la inhibición por nucleótidos di y trifosfato. Un argumento a favor de esta hipótesis es que esta actividad desacoplante en presencia de superóxidos se correlaciona con el patrón de expresión de la proteína. Así, mientras que este fenómeno no se observa ni en las mitocondrias de hígado ni en las de corazón, en las mitocondrias del TAP y del músculo esquelético de rata (donde la UCP1 y UCP3 son respectivamente mayoritarias), el desacoplamiento en presencia de superóxidos sí que se aprecia [Echtay *et al.*, 2002b].

4.4.2.- LA UCP3

Su expresión en músculo esquelético y grasa parda, unido a su alta homología con la UCP1 y a una respuesta fisiológica similar a la que la UCP1 presentaba en TAB, hizo que también se la considerase como una posible proteína con actividad desacoplante. En un principio se pensó que podía tener un papel esencial en el mecanismo de termogénesis adaptativa en el músculo, sin embargo, al igual que en el caso de la UCP2, el papel fisiológico de la UCP3 aún no está establecido y existen varias hipótesis al respecto [revisión Giacobino, 2002; Schrauwen, 2002].



4.4.2.1.- La UCP3 como reguladora de la termogénesis

Diversos experimentos de transformación de levaduras con el gen de la UCP3, así como la sobreexpresión del mismo en células de mamífero demostraron que su expresión provocaba una notable caída en el potencial de membrana de las mitocondrias, y un aumento en el consumo de oxígeno por parte de estas células [Mao *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; Boss *et al.*, 1998c]. Esto era consistente con su posible función desacoplante, si bien, el aislamiento de las mitocondrias de estas células que sobreexpresan UCP3 reveló un incremento del estado 4 sensiblemente inferior al observado en las mitocondrias de levaduras que expresaban UCP1 [Zhang *et al.*, 1999; Hinz *et al.*, 1999].

De acuerdo con un papel termogénico de la UCP3 se han obtenido las siguientes observaciones (tabla 3):

- Tanto la exposición puntual al frío (tres horas) [Boss *et al.*, 1999] como la administración de hormonas tiroideas [Gong *et al.*, 1997; Lanni *et al.*, 1999] aumentan la expresión del gen de la UCP3 de forma paralela al de la UCP1.
- Ratones transgénicos que sobreexpresan UCP3 muestran una tasa basal de consumo de oxígeno bastante superior a ratones de fenotipo salvaje [Curtin *et al.*, 2002]. Otros autores han observado que estos ratones presentan hiperfagia, pero no muestran fenotipo obeso, con lo que se deduce que su tasa metabólica basal está incrementada [Clapham *et al.*, 2000].
- Existe una correlación entre la expresión de la UCP3, la tasa de desacoplamiento mitocondrial, y el control del peso corporal en mujeres [Harper *et al.*, 2002a].

Sin embargo existen experimentos que, al igual que para la UCP2, cuestionan este papel de la UCP3 en la termogénesis adaptativa (tabla 3):

- La exposición prolongada al frío desencadena una disminución en los niveles de transcrito de la UCP3 a partir del primer día de exposición [Lin *et al.*, 1998].
- En situaciones de ayuno o de restricción alimenticia se ha detectado un incremento en la expresión del gen de la UCP3 en músculo esquelético y al contrario de lo que cabría esperar, una disminución en la tasa metabólica [Gong *et al.*, 1997; Hwang & Lane., 1999; Millet *et al.*, 1998]. Es más, este aumento de la expresión no se correlaciona con un aumento en la tasa de desacoplamiento de las mitocondrias aisladas de músculo esquelético [Cadenas *et al.*, 1999].



- Ratones *knockout* para la UCP3, al igual que los *knockout* para la UCP2, no presentan ni un fenotipo obeso ni alteraciones metabólicas considerables, aunque muestren a nivel celular una eficiencia energética y producción de ROS elevadas [Cline *et al.*, 2001]. Estos ratones no presentan sensibilidad al frío y en sus mitocondrias de músculo esquelético se detecta una estimulación de la expresión de los genes de otras UCPs (en este caso UCP2) que podrían compensar la aparición de un determinado fenotipo [Vidal-Puig *et al.* 1997]. Este efecto también fue observado en *knockouts* del gen de la UCP2 que presentaban el gen de la UCP1 altamente inducido en TAB [Arsenijevic *et al.*, 2000].
- En ratones, al contrario de lo que ocurre con la UCP1, los cambios en los niveles de ARNm de la UCP3 no se correlacionan con las tasas metabólicas observadas [Surwit *et al.*, 1998]. Ni siquiera una alimentación con dieta grasa, que implicaría un aumento en los niveles de ARNm de la UCP1 y UCP2 en TAP y de la UCP3 en músculo esquelético, se correlaciona con una variación en la tasa metabólica de estos roedores [Samec *et al.*, 1999].

A partir de estas observaciones existe acuerdo al afirmar que la UCP3 es una proteína desacoplante de la fosforilación oxidativa *in vivo* que media el desacoplamiento de las mitocondrias donde se expresa (TAP y músculo esquelético principalmente). Sin embargo se propone que, al igual que en el caso de la UCP2, su función fisiológica real no es la regulación del metabolismo energético, si no más bien la regulación del metabolismo de los lípidos o el control de las ROS [revisión Schrauwen & Hesselink, 2002].

4.4.2.2.- Posibles funciones fisiológicas de la UCP3

El hecho que las situaciones de ayuno provocasen un incremento en la expresión del gen de la UCP3 hizo que se estudiase el posible efecto de los niveles plasmáticos de ácidos grasos circulantes en la expresión del gen. De este modo se demostró que los ácidos grasos libres, a través de los receptores PPAR, eran capaces de incrementar la expresión del gen de la UCP3 de manera análoga a lo observado en la UCP1 y UCP2 [Weigle *et al.*, 1998; Khalfallah *et al.*, 2000]. De igual modo, se ha observado que la expresión de la UCP3 se encuentra activada por la exposición al frío, por una dieta rica en grasas y por la administración de hormona tiroidea (tabla 3), situaciones todas ellas en las cuales la oxidación de los ácidos grasos también se encuentra estimulada. Sin embargo, las condiciones en las cuales la UCP3 no se encuentra inducida no se caracterizan por bajos niveles de ácidos grasos [Vidal-Puig *et al.*, 1999]. Para explicar estas observaciones se ha propuesto que la transcripción de la UCP3 se inhibe en condiciones en las cuales se incrementa la oxidación de grasas y se activa en situaciones en las cuales la captación de ácidos grasos excede a la oxidación de los mismos, con lo que eventualmente se incrementan los niveles plasmáticos de ácidos grasos (ayuno, esfuerzo físico).

Algunos autores propusieron que de acuerdo con estas observaciones la función fisiológica de la UCP3 podría ser actuar como transportador de la forma aniónica



de los ácidos grasos para evitar su toxicidad en la matriz mitocondrial cuando se da un exceso de éstos [Jezek *et al.*, 1998; Schrauwen *et al.*, 2001]. Otros afirman que esto es una consecuencia indirecta, y que este transporte tiene lugar con el objetivo de regular los niveles de CoA [Himms-Hagen & Harper, 2001; revisión Schrauwen & Hesselink, 2002]. Lo cierto es que este transporte de la forma aniónica de los ácidos grasos tan sólo se ha observado en situaciones patológicas y puede tener lugar no sólo en las UCPs, sino en la mayoría de los transportadores mitocondriales [revisión Rial & González-Barroso; 2001]. Esto hace que se dude que las UCPs puedan actuar fisiológicamente de esta manera y se piensa que la detoxificación de la matriz no tiene lugar mediante el transporte de los ácidos grasos a través de la UCP3, sino que es consecuencia de un proceso de aceleración de la oxidación de éstos.

Brand y colaboradores piensan que esta correlación entre la UCP3 y el metabolismo de los lípidos, al igual que lo que ocurre en el caso de la UCP2, tiene relación con una función reguladora de la producción de ROS ya que el desacoplamiento facilita la oxidación de los ácidos grasos y evita la lipotoxicidad que ocasiona su acumulación en la matriz [Echtay *et al.*, 2002b].

4.4.2.3.- Regulación a nivel molecular de la UCP3

Debido a que hasta el momento no se ha establecido de una manera clara su función, pocos son los datos existentes acerca de los reguladores fisiológicos de la UCP3. Algunos autores han observado que la UCP3 reconstituida en liposomas cataliza un flujo de protones y es regulada a nivel molecular de forma análoga al resto de las UCPs [Jaburek *et al.*, 1999; Jaburek & Garlid, 2003]. Otros por el contrario, bajo las mismas condiciones de experimentación, no eran capaces de observarlo [Echtay *et al.*, 1999]. Sin embargo, tras el descubrimiento de la participación de la ubiquinona como cofactor esencial para el mecanismo de transporte de las UCPs [Echtay *et al.*, 2000b], los mismos autores afirmaron que tras la adición de ubiquinona, la tasa de transporte de protones y aniones a través de la UCP3 se regeneraba y era similar a la de la UCP1. Además, también describieron la capacidad de la proteína para ser inhibida por nucleótidos de purina, preferentemente por ADP [ver revisión Klingenberg, 2001; Echtay *et al.*, 2001b].

El descubrimiento en mitocondrias de ratón de la regulación por radicales superóxido de la actividad transportadora de protones de las UCPs [Echtay *et al.*, 2002b], junto con la observación de la pérdida de esta actividad en mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratones *knockout* de la UCP3 demostró que, *in vivo*, la generación de radicales superóxido incrementaba la actividad transportadora de protones mediada por la UCP3 [Echtay *et al.*, 2002a]. Esta actividad desacoplante mediada por ROS, al igual que lo observado en la UCP1 y UCP2 *in vitro*, era también muy sensible a la inhibición por nucleótidos por lo que se propuso que la regulación de éstas era similar. Sin embargo, la expresión ectópica de la proteína en mitocondrias de levaduras, que se había mostrado tan útil para el estudio de la UCP1 y UCP2, no mostró una proteína activa ni regulable por nucleótidos. Se propone que la UCP3 expresada en levaduras probablemente produzca una proteína que no retiene su estado nativo [Klingenberg, 2001; Harper *et al.*, 2002b].



4.4.3.-. LA UCP4 Y BMCP1 (O UCP5)

Los detalles conocidos hasta el momento acerca de la función de estas proteínas son escasos, pero debido a su relativa homología, se les ha relacionado con funciones análogas a las descritas tanto para la UCP1, como para la UCP2 o la UCP3, pero en los tejidos donde se expresan [revisión Dullo & Samec, 2001].

En el caso de la UCP4, la expresión ectópica en células de mamífero provoca una disminución en el potencial de membrana de esas células [Mao *et al.*, 1999]. Atendiendo a esta observación y a su patrón de expresión predominante en cerebro, se piensa que el papel de la UCP4 podría ser desarrollar un proceso de termogénesis localizada que podría intervenir en la respuesta neuronal. La correlación encontrada entre la exposición al frío y la inducción de la transcripción del gen de la UCP4 (en zonas definidas) así lo parecen indicar [Yu *et al.*, 2000].

Por su parte, también la expresión del gen de la UCP5 en mitocondrias de células de mamífero provoca una disminución en el potencial de membrana [Sanchis *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000b]. El aislamiento de mitocondrias de levaduras que expresan el gen corrobora que estas mitocondrias muestran una tasa de desacoplamiento mayor que las controles, y de nuevo, las situaciones de exposición al frío se correlacionan con un aumento del ARNm. Todo ello, unido a la reciente demostración de su expresión en numerosos tejidos la sitúan también como probable candidata a intervenir de algún modo en la termogénesis, aunque de momento, no existen datos concluyentes al respecto.

4.4.4.-. LAS UCPS DE PLANTAS

Se ha propuesto que el papel de las UCPs de plantas (patata, *Arabidopsis* o remolacha) es similar al de las UCPs de mamíferos. Así, se ha visto que, de manera análoga a lo realizado por otras UCPs, participan de un modo activo en la respuesta a la exposición al frío y en la regulación de la producción de las especies reactivas del oxígeno [Pastore *et al.*, 2000; Kowaltowski *et al.*, 1998]. Median también en otros procesos termogénicos como la maduración del fruto en la cual, en el tomate y el mango, se ha demostrado que las UCPs desempeñan un papel vital [Considine, 2001]. En cuanto a su regulación, recientemente se ha descrito que la UCP de patata muestra un transporte de H⁺ activado por ácidos grasos [Hourton-Cabassa *et al.*, 2002].

**OBJETIVOS:**

Los transportadores de metabolitos la membrana interna mitocondrial forman una superfamilia de proteínas relacionadas. Las proteínas desacoplantes forman, a su vez, una familia dentro de la de los transportadores mitocondriales siendo la proteína desacoplante del tejido adiposo pardo UCP1 la mejor caracterizada. La UCP1 tiene una función claramente termogénica y su actividad desacoplante se encuentra regulada: los nucleótidos de purina la mantienen inhibida mientras que los ácidos grasos, que actúan como segundos mensajeros de la noradrenalina, son los activadores fisiológicos. El objetivo global de esta Tesis es ahondar en el conocimiento de las bases moleculares que confieren a la UCP1 la capacidad de respuesta a los ácidos grasos.

Existe un gran debate sobre el mecanismo molecular de transporte de la UCP1 y en particular sobre el mecanismo de activación. El primer objetivo de esta Tesis es establecer el papel de los ácidos grasos en la activación de la UCP1. Para ello se reexaminarán los dos mecanismos hipotéticos en los que se propone que los ácidos grasos o bien son el sustrato transportado por la UCP1 o constituyen un grupo prostético que modifica la conductancia de la UCP1 a los protones.

La UCP1 presenta una elevada homología con otras proteínas desacoplantes de mamíferos y sin embargo la regulación de su actividad muestra marcadas diferencias. Así, la UCP2 no responde a ácidos grasos. La mutagénesis dirigida ha demostrado ser una buena herramienta para el estudio de las relaciones estructura-función en proteínas y de hecho ya ha proporcionado valiosa información sobre la organización estructural y funcional de la UCP1. El segundo objetivo de esta Tesis es determinar las regiones de la UCP1 que le confieren sus propiedades específicas y para ello se va a proceder a sustituir regiones características de la UCP1 con sus homólogas de la UCP2 con el fin de identificar aquellas que confieren a la UCP1 su respuesta a los ácidos grasos.





1.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1.1.- MICROORGANISMOS EMPLEADOS PARA LA MANIPULACIÓN DE LOS ADNc DE LA UCP1, UCP2 Y FORMAS MUTADAS

En este trabajo se emplearon dos tipos de microorganismos para realizar los distintos experimentos; bacterias, de la especie *Escherichia coli*, y levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

En todos los casos, los vectores de clonación y expresión fueron transfectados como paso previo en cepas de *E. coli* para su amplificación y manipulación. Se utilizaron las siguientes cepas:

- TG1 α (genotipo *supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrCB-hsdSM)5 (r_k- m_k) [F' tra36 proAB lac⁺Z Δ M15]*). Se empleó en el proceso de clonación de las cepas controles UCP1 y UCP2, y en el de las quimeras Lp1_A, Lp2_C y Lp1_A/Lp2_C.
- Epicurian coli[®] XL1-Blue Supercompetente (genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac⁺Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)]*). Suministrada por *Stratagene*, esta cepa se usó en distintos pasos durante la generación de aquellos mutantes en los cuales para su construcción se empleo el *kit* de mutagénesis "Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit[®]".
- Epicurian Coli[®] SCS110 (genotipo *rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galk galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIq Z Δ M15] (Stratagene)*). En determinados momentos del proceso de generación de Lp1_A, Lp2_C, Lp1_A/Lp2_C, Q-121 Y Q-212 fue necesario obtener un ADN no metilado para que las endonucleasas *MscI* y *PfMI* fuesen capaces de actuar. Para ello se empleó esta cepa que presenta mutada la *dcm* metilasa y que, por lo tanto, genera un ADN no metilado durante el proceso de replicación.

Todos los experimentos de caracterización bioenergética de las cepas referencia y de los distintos mutantes se realizaron sobre la cepa diploide de levaduras, *S. cerevisiae* W303. Esta cepa presenta el fenotipo: *a/ α ; ade 2-10; his 3-11, 15; leu 2-3,112; ura 3-1; can 1-100; trp-*, y nos fue cedida por el Dr. Francisco Portillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas (Madrid).

1.2.- VECTORES UTILIZADOS EN LA MANIPULACIÓN DE LOS ADNc DE LA UCP1, UCP2 Y FORMAS MUTADAS

1.2.1.- VECTOR DE CLONACIÓN

El plásmido de *E. coli* utilizado para manipular los ADNc fue pUC19 [Yanisch *et al.*, 1985]. Es un plásmido de alto número de copias con un tamaño de 2686 bp (figura 32). Incluye en su secuencia los siguientes genes:



clonación y amplificación) y levaduras.

Los ADNc correspondientes a la UCP1, UCP2 y a las formas mutadas se introdujeron en el plásmido pYeDP bajo el control del promotor *gal10-cyc1*. El protocolo de clonación empleado para la UCP1 se describe en Arechaga *et al.* [1993]. Como controles de todos los experimentos posteriores se obtuvieron tres plásmidos diferentes:

- pYeDP-UCP1: que contiene la secuencia, inserta entre dianas *EcoRI*, que codifica para la UCP1 en la orientación adecuada para su correcta expresión.
- pYeDP-control: donde el ADNc codificante de la UCP1 se ha insertado entre las dianas *EcoRI* en sentido inverso, por lo cual, su expresión origina un ARNm antisentido no codificante.
- pYeDP-UCP2: que presenta inserto, entre dianas *EcoRI* y *SacI*, el ADNc de la UCP2 en sentido codificante.

1.3.- MANIPULACIÓN DE LOS ADNc

1.3.1.- LIGACIONES

En las ligaciones de fragmentos de ADN se empleó la ligasa del fago T4 que une los extremos 5'fosfato y 3'OH de fragmentos de ADN con extremos romos o cohesivos. Las ligaciones se realizaron en un volumen de 10 μ l, conteniendo 1 μ l de enzima (400 U/ μ l), 1 μ l de tampón de ligasa (Tris-HCl 500 mM pH 7.5, Cl_2Mg 100 mM, ditiotreitól 100 mM, ATP 10 mM, albúmina de suero bovino (SAB) 0.25 mg/ml) y la concentración de fragmentos deseada en cada caso. Las incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 16 °C durante un mínimo de 8 horas (en el caso de extremos romos o ligaciones difíciles), o en caso de extremos cohesivos, durante dos horas a temperatura ambiente. La inactivación del enzima se realizó incubando a 65°C durante 10 minutos.

1.3.2.- DESFOSFORILACIONES

Para la desfosforilación de los extremos de los fragmentos de ADN se utilizó la fosfatasa "Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP) que eliminó los grupos 5'fosfatos de los fragmentos de ADN para evitar su religación. El volumen de la reacción fue de 20 μ l, incluyendo 1 μ l del enzima (1 U/ μ l), 1.5 μ g de ADN linearizado y 2 μ l de tampón de desfosforilación (Tris-HCl 200 mM pH 8.0, $MgCl_2$ 100mM). La reacción se mantuvo durante aproximadamente una hora, después de lo cual se inactivó el enzima incubando a 65°C 15 minutos.

1.3.3.- DIGESTIONES

Los enzimas de restricción empleados en los distintos procesos de mutagénesis se reflejan en la tabla 4. Todos ellos se usaron en un volumen de digestión de 50 μ l que



Nombre Enzima	Temperatura Óptima	SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO	Concentración U/μl
<i>AluNI</i>	37°C	(CAG _n nn'CTG)	10
<i>BsmI</i>	65°C	(GAATG _n Cn')	5
<i>EcoRI</i>	37°C	(G'AATT _n C)	10
<i>MscI</i> **	37°C	(TGG'CCA)	3
<i>NcoI</i>	37°C	(C'CATG _n G)	10
<i>PfFI</i> *	37°C	(GACn'n _n GTC)	10
<i>PfMI</i> **	37°C	(CCAn _n nn'nTGG)	8
<i>PpuMI</i>	37°C	(rG'GwC _n Cy)	2
<i>SacI</i> *	37°C	(G _n AGCT'C)	20
<i>SmaI</i>	25°C	(CCC'GGG)	20

Tabla 4 Enzimas de restricción usadas en la construcción de los mutantes. Se señalan las temperaturas a las cuales presentan una actividad óptima, la secuencia de reconocimiento de cada una de ellas, así como la concentración del stock de cada enzima. * señala aquellas enzimas que requirieron SAB para su correcto funcionamiento. ** Enzimas dcm sensibles que requirieron un ADN no metilado para poder actuar sobre sus dianas.

contenía de 5 a 6 μg de ADN molde, de 1 a 2 μl de los enzimas, 5 μl del tampón de reacción 10x (de composición específica para cada enzima y suministrado con ellas) y SAB cuando se requería. La inactivación de los enzimas tuvo lugar en la mayoría de los casos por incubación de las digestiones durante 20 minutos a 65°C salvo en el caso de *BsmI*, que se incubó durante el mismo período de tiempo a 80°C, y *PpuMI* que no se inactivaba térmicamente y se tuvo que separar físicamente el enzima purificando la digestión con el *kit* "QIAquick Gel Extraction Kit".

1.3.4.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

El análisis de plásmidos y fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en porcentajes del 0.7 al 1.5% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8.0, EDTA 2mM), de acuerdo con el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, [1982]. El ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio al 1% e iluminación con luz ultravioleta a 310 nm (ver figura 59).

1.3.5.- PURIFICACIONES DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

Los fragmentos obtenidos en los procesos de manipulación de ADN se purificaron, previa separación en gel de agarosa al 0.7% y tinción con bromuro de etidio al 1%, con dos *kits* comerciales según el tamaño de los mismos:

- En el caso de fragmentos menores a 3 kb se empleo el *kit* "QIAquick Gel Extraction Kit".
- Cuando los fragmentos fueron mayores, la purificación se realizó con el *kit* "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit".



Como patrón de migración de los ADNs se utilizaron los marcadores de peso molecular número XIV y en ocasiones, para fragmentos grandes, lambda DNA/ *Hind*III. El fundamento y protocolo desarrollados para el uso de estos *kits* vienen recogidos en las instrucciones suministradas por el proveedor.

1.4.- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

1.4.1.- CEPA TG1 α

El paso previo para la transformación de las bacterias empleadas en este trabajo fue someter a las células a un proceso de adquisición de un estado competente que permitiese la captación de pUC19 o pYeDP. El protocolo utilizado para la preparación de células de *E. coli* TG1 α competentes fue el siguiente:

Se inocularon 2 ml de un medio general de crecimiento (1.6% triptona, 1% extracto de levadura, 0.5% cloruro sódico) con 1 colonia aislada de TG1 α y se creció durante toda la noche a 37°C con agitación (275 rpm). A la mañana siguiente se diluyó 1 ml del cultivo en 100 ml del medio de crecimiento y se incubó a 37°C con agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0.5. Se recogieron las células por centrifugación a 4°C y 5000 x *g* y se resuspendieron en 50 ml de cloruro cálcico (CaCl₂ 50 mM). La suspensión se incubó en un baño de hielo durante 30 minutos y se volvieron a sedimentar las células en las mismas condiciones. Se repitió la resuspensión pero en 10 ml de CaCl₂ 50 mM y se dejó otros 30 minutos en hielo. Finalmente se añadió glicerol al 15%, se separaron en alícuotas de 200 μ l, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

La transformación de las bacterias se llevó a cabo mediante un proceso de choque térmico basado en el protocolo descrito en Sambrook *et al.* [1989]. Se descongelaron en hielo alícuotas de células competentes y se añadieron 100 ng de vector (pUC19 o pYeDP en nuestro caso). Se incubaron 20 minutos en hielo y se les sometió a un choque térmico de 39°C durante 3 minutos y 30 segundos. A continuación se introdujeron en hielo durante 2 minutos, se les añadió 1 ml de LB (bactotriptona 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro sódico 0.5%; pH 7.2 ajustado con NaOH) y se incubaron a 37°C con agitación (275 rpm) durante una hora. A continuación se centrifugaron a 7000 x *g* durante 1 minuto y el sedimento se resuspendió con 150 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 7.5) para finalmente sembrar las células en placas de LB con ampicilina (LB, bactoagar 1.5%, ampicilina 100 μ g/ml) e incubar 12 horas a 37°C.

1.4.2.- CEPAS EPICURIAN COLI[®] XL1-Blue Supercompetente Y SCS110

Tanto la cepa Epicurian coli[®] XL1-Blue Supercompetente, como SCS110 se suministraron en estado competente por lo que no fue necesario ningún tipo de tratamiento adicional para la adquisición de un estado transformante. El proceso de transformación en estos casos fue similar al realizado con TG1 α con las siguientes diferencias:



- Antes de la incubación de las células con el ADN se les añadía β -mercaptoetanol (25 mM) y se incubaban en hielo durante 10 minutos para incrementar el rendimiento de la transformación.
- Los tiempos de incubación variaron: el ADN y las bacterias se incubaban en hielo durante 30 minutos y el choque térmico era de 45 segundos a 42°C.

Los protocolos de transformación detallados de ambas cepas vienen recogidos en las instrucciones suministradas por el proveedor

1.4.3.- SELECCIÓN DE CLONES POSITIVOS

Una vez transformadas las bacterias, para evitar la pérdida del plásmido y el crecimiento de bacterias no transformadas, todas las siembras se realizaron en medio LB en presencia de ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml.

La selección de positivos que incorporaban tanto pUC19 como pYeDP con un ADNc inserto en el *poliI* se realizó mediante la adición en la placa justo antes de la siembra, de 16 μ l de una solución de isopropil-tio- β -D-galactósido (IPTG) 400 mM y 40 μ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) (4% p/v disuelto en N,N-dimetilformamida). Las colonias positivas presentaban color blanco debido a la imposibilidad de digerir el compuesto análogo de la galactosa, X-Gal.

Para comprobar finalmente, tras el proceso de transformación, la adquisición por parte de las bacterias del plásmido con el gen clonado inserto en el *poliI* se seleccionaron un cierto número de clones blanquecinos crecidos en placas de LB con ampicilina. Con ellos, se realizó el siguiente protocolo de lisis celular: se tomaron muestras de las colonias con un palillo y se mezclaron con 40 μ l de un tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, NaOH 100 mM, SDS 1%). A continuación se añadieron 3 μ l de HCl 1N, 5 μ l de tampón de aplicación (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol y 30% glicerol) y se incubaron las muestras 5 minutos a -80°C. Seguidamente se centrifugaron a 4°C y 16000 $\times g$ y se tomaron 25 μ l de los sobrenadantes para aplicarlos en un gel de agarosa al 1%. Tras su tinción con bromuro de etidio al 1% y posterior iluminación con luz ultravioleta a 310 nm, se estudiaron los patrones de migración de los plásmidos en el gel (ver figura 56).

1.4.4.- AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS OBTENIDOS

Todos los clones seleccionados tras un proceso de transformación con cualquiera de los dos vectores empleados, se amplificaron incubando las células que los contienen durante la noche en medio líquido LB con ampicilina, a una temperatura de 37°C y con agitación (275 rpm). Crecidas las células, los plásmidos eran aislados con el *kit* "High Pure Plasmid Isolation Kit". Este *kit* proporciona una cantidad aproximada de 15 μ g de ADN por purificación (4 ml de células). En el caso del vector de expresión vacío pYeDP, se hizo uso del *kit* "CONCERT™ High Purity Plasmid Maxiprep System" debido a que se necesitó una mayor cantidad del plásmido. Este *kit* proporciona unos 100 μ g de plásmido



por purificación (150 ml de células). El protocolo seguido, así como los fundamentos del método, vienen descritos en las instrucciones suministradas por los fabricantes junto a los *kits* de aislamiento.

1.4.5.- ALMACENAMIENTO DE LOS CLONES BACTERIANOS OBTENIDOS

Todos los clones, seleccionados y chequeados tras la mutagénesis se almacenaron por duplicado. Las células se crecieron la noche anterior en medio líquido LB con ampicilina, con agitación (275 rpm) y a 37°C. Cuando el cultivo llegó a saturación, se tomaron 2 volúmenes de células y 1 volumen de glicerol al 30% y se separaron en tubos de congelación, en alícuotas generalmente de 1 ml. Finalmente se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

1.5.- TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

1.5.1.- TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

Los vectores de expresión pYeDP-UCP1, pYeDP-UCP2, pYeDP-control y sus formas mutadas, se introdujeron en *S. cerevisiae* para conseguir la expresión de las proteínas y su incorporación en la membrana interna mitocondrial de las levaduras.

Al igual que en bacterias, el primer paso para transformar las levaduras por este método fue preparar células en estado competente para la captación de los vectores de expresión. Para ello, se inocularon colonias individuales de levaduras W303 2n en 400 ml YPD líquido (extracto de levaduras 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%) y se dejaron crecer durante toda la noche con agitación (275 rpm) a 28°C.

Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (600 nm) de 1-2 se recogieron las células por centrifugación a 3000 x *g* durante 15 minutos y a 4°C. Se resuspendieron en 80 ml de agua destilada y se añadieron 10 ml de TE 10x (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM; pH 7.5) y 10 ml de una solución acetato de litio (hidróxido de litio 1M ajustado a pH 7.5 con ácido acético diluido). La suspensión de células se incubó con agitación suave (200 rpm) a 30°C durante 45 minutos después de los cuales, se adicionaron 2.5 ml de DL-ditiotreitol 1M y se volvió a incubar la mezcla con agitación suave, a 30°C y durante otros 15 minutos.

La suspensión de levaduras se diluyó con agua destilada hasta 200 ml y se centrifugaron las células a 4°C y 3000 x *g* durante 15 minutos. Se resuspendieron en 40 ml de sorbitol 1M frío y se lavaron dos veces más en este mismo medio y en las mismas condiciones. La resuspensión final se hizo en sorbitol 1M frío a una concentración de 1×10^{11} células/ml. Este volumen se repartió en tubos *Eppendorf*, en alícuotas de 60 μ l que contenían células y glicerol al 87% en una relación de volúmenes de 5:1. Repartidas las células se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Todo el proceso se realizó a 4°C.



Para la electroporación, las alícuotas almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo. Se sedimentaron las células por centrifugación a 4°C y $11000 \times g$ en una centrífuga *Eppendorf*, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en $40 \mu\text{l}$ de sorbitol 1M frío. A las cubetas de electroporación previamente enfriadas (*BioRad*, 2 mm de paso) se añadieron las células y $1 \mu\text{g}$ del vector de expresión conteniendo el gen a expresar. Se aplicó un pulso eléctrico de 1500 V y $50 \mu\text{F}$ fijando el límite de resistencia en el electroporador (*Invitrogen*) a 100Ω . Las células electroporadas se resuspendieron en $250 \mu\text{l}$ de sorbitol 1M frío, se sembraron en placas de SD (base de nitrógeno sin aminoácidos (YNB) 0.67%, glucosa 2%, casaminoácidos 0.1%, triptófano 20 mg/ml, adenina 40 mg/ml, bactoagar 2%) y se incubaron durante 48-72 horas a 28°C .



Figura 34 Electroporador de la casa *Invitrogen* usado para la transformación de levaduras.

1.5.2.- TRANSFORMACIÓN POR ACETATO DE LITIO

Para preparar células competentes para la transformación por este método, dos días antes de la transformación se inocularon colonias aisladas de levaduras en 5ml de YPD. Este inóculo se creció a 28°C con agitación (275 rpm) hasta su saturación. La noche anterior a las transformaciones se inocularon $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de células saturada en 300 ml de YPDA (extracto de levaduras 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%, adenina 30 mg/l) y se dejaron crecer a 28°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm cercana a 0.6 (que en *S. cerevisiae* equivale aproximadamente a una concentración de 1×10^7 células/ml). Se recogieron mediante centrifugación a $4000 \times g$ a temperatura ambiente y se resuspendieron en 10 ml de agua destilada para volver a centrifugarlas a $6000 \times g$. El sedimento de células se resuspendió en 1.5 ml de solución de acetato de litio preparada en el momento y compuesta de: 1 volumen de TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM; pH 7.5), 1 volumen de solución de acetato de litio (hidróxido de litio 1M; pH 7.5 con ácido acético diluido) y 8 volúmenes de agua destilada.

Esta suspensión de levaduras en acetato de litio se utilizó para transformar levaduras en el momento aunque en alguna ocasión se almacenó a 4°C durante un máximo de 7 días. En este caso, las células retenían un elevado estado competente, pero se tenían que incubar a 30°C durante una hora como paso previo al proceso de transformación.

Para cada transformación se tomaron $200 \mu\text{l}$ de la suspensión de células en acetato de litio y se le añadió $1 \mu\text{g}$ del ADN transformante (siempre disuelto en un volumen menor de $20 \mu\text{l}$). A cada una de las mezclas de transformación se les añadieron 1.2 ml de solución de polietilenglicol 3350 (PEG) preparada en el momento (PEG al 40%, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, hidróxido de litio 0.1 M pH 7.5 (con ácido acético) y EDTA 1 mM) y se incubaron a 30°C con agitación suave (200 rpm.) durante 30 minutos. A continuación se les sometió a un choque térmico de 15 minutos a 42°C y se sedimentaron las células con un pulso de centrifugación (2 segundos) a $12000 \times g$ en una centrífuga *Eppendorf*. Las células precipitadas se resuspendieron en $150 \mu\text{l}$ de TE preparado en el momento y se sembraron en placas de SD para incubarlas a 28°C durante 48-72 horas.



1.5.3.- SELECCIÓN DE CLONES POSITIVOS. INMUNODETECCIÓN DE LA UCP1, UCP2 Y FORMAS MUTADAS: *WESTERN-BLOTTING*

Todos los clones obtenidos tras el proceso de transformación, independientemente del método empleado, se crecieron en medio mínimo SD para evitar la pérdida del plásmido y el crecimiento de levaduras no transformadas. En este medio, sólo crecen aquellos clones que presentan autotrofia a uracilo (incorporan el vector con el gen *ura3*).

La expresión del gen de la UCP1, UCP2, así como de sus formas mutadas se encontraba bajo el control del promotor *gal10-cyc1*. De este modo, la expresión se induce con galactosa y se reprime en presencia de glucosa. Para seleccionar los clones de *S. cerevisiae* con un nivel adecuado de expresión de las proteínas diseñadas en un primer momento, se inmunodetectó la presencia de éstas en un precipitado celular. El protocolo seguido fue el siguiente:

A partir de las placas de medio mínimo SD sembradas tras la transformación, se seleccionaron varias colonias y se prepararon preinóculos en 50 ml de SP (YNB 0.67 %, fosfato potásico 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.12%, glucosa 0.1%, ácido láctico 2%, casaminoácidos 0.1%, triptófano 20 mg/l, adenina 40 mg/l, pH 4.5 ajustado con KOH) 36 horas antes del experimento. 12 horas antes se chequeó la densidad óptica de los cultivos y se diluyeron con medio SG (galactosa 2%, YNB 0.67%, casaminoácidos 0.1%, triptófano 20 mg/l, adenina 40 mg/l) hasta conseguir un volumen de 50 ml a una absorbancia a 600 nm de 0.3. Se crecieron durante toda la noche a 28°C con agitación (275 rpm) y al día siguiente se midieron las absorbancias alcanzadas para calcular el número de células de acuerdo a la siguiente expresión [González-Barroso, M.M., 1997]:

$$N^{\circ} \text{ mill. cel/ml} = -0.116 + 16.5 \times Abs_{600nm}$$

Se tomaron 20 millones de células de cada muestra y se precipitaron durante una hora con volúmenes iguales de ácido tricloroacético frío al 20%. A continuación, para eliminar los restos de ácido, se centrifugaron a 12000 *x g* durante 10 minutos a 4°C, se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en etanol absoluto a -20°C. Las muestras disueltas se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se repitió la centrifugación a 12000 *x g*, lavado e incubación y, finalmente, se volvieron a centrifugar las muestras a la misma velocidad. Tras retirar los sobrenadantes por última vez, se secaron las muestras en un desecador de vacío y se resuspendieron en tampón de aplicación (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%, SDS 2%) para una posterior inmunodetección.

La inmunodetección de la UCP1, UCP2 o de sus formas mutadas en células precipitadas o en mitocondrias se analizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). La polimerización de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un aparato "Mighty Small II" de *Hofer Scientific Instruments*. Se realizó un sistema discontinuo de acuerdo al descrito por Laemmli [1970]. El gel concentrante contenía 3.75% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) a pH 6.8 y el gel separador 12,5% de acrilamida/bisacrilamida a pH 8.8. Las muestras de proteína se disolvieron en tampón de



aplicación ya descrito y se les añadió 2-mercaptoetanol al 5%. Se calentaron a 95°C durante 5 minutos y después de un ligero pulso de centrifuga (2 segundos), se aplicaron. La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%. Se aplicó una intensidad de 150 voltios durante 45 minutos.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa siguiendo, esencialmente, el procedimiento descrito por Towbin *et al.*, [1979]. Durante dos horas se aplicó una intensidad de corriente de 15 V (1.2 mA/cm²) en un aparato "Trans-Blot SD" de *Bio-Rad* usando un tampón de transferencia que contenía glicina 190 mM, Tris-HCl 25 mM, metanol 20% (v/v); pH 8.3. Terminada la transferencia, la membrana se tiñó reversiblemente con rojo Ponceau para verificar la presencia de las bandas y se dejó bloqueando durante dos horas en TBS (NaCl 0.9%, Tris-HCl 20 mM; pH 8.2) con 5% de leche en polvo.

Para la detección de la UCP1, UCP2 o de alguna de sus formas mutada, las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes; con una dilución 1:500 de suero de conejo anti-UCP1, preparado según el método descrito por Fernández *et al.* [1987], o con una dilución de la misma concentración de un anticuerpo comercial anti-UCP2, generado según el protocolo descrito por Stuart *et al.* [2001], y que reconoce la región específica de la UCP2 de humano y ratón comprendida entre los aminoácidos 144 y 157 (QARAGGGRRYQSTV). La incubación se realizaba durante la noche a 4°C en TBS con leche en polvo al 0.2%.

Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS al 0.1% de leche para lavar el anticuerpo no unido. Los anticuerpos unidos específicamente, se detectaron con un anticuerpo de cabra anti-Ig G de conejo conjugado con peroxidasa. Se preparó una dilución 1:3000 con TBS al 0.1% de leche y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Del mismo modo antes descrito se lavaron las membranas con TBS con 0.1% de leche y se preparó la solución reveladora. Para ello se disolvió 4-cloronaftol (para una concentración final del 1.44%) en 250 µl de etanol absoluto. Esta disolución se diluyó lentamente con 30 ml de TBS a pH 7.6 y se añadieron 10 µl de H₂O₂ al 30%. La mezcla resultante se filtró para eliminar los posibles precipitados y a continuación se incubó junto con las membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos unidos específicamente producían una reacción colorimétrica que podía observarse en la membrana (ver figura 68). Como patrones de referencia se utilizaron levaduras que expresaban UCP1 y UCP2 y que previamente habían sido seleccionadas como clones con una expresión correcta de ambas proteínas.

Una vez realizada una primera selección de los clones a partir de la inmunodetección de las proteínas en los precipitados celulares, y para comprobar que los niveles de expresión de las proteínas estudiadas eran normales, se aislaron las mitocondrias de esas cepas de levaduras seleccionadas y sobre ellas, se estudió de nuevo su expresión proteica.

1.5.4.- AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE pYEDP EN LEVADURAS

Todos los clones seleccionados tras el proceso de transformación, se crecieron incubando durante toda la noche en medio líquido SD, a una temperatura de 28 °C y con



agitación (275 rpm). El aislamiento del vector de expresión pYeDP en *S. cerevisiae* se realizó mediante un método de aislamiento de ADN genómico total de levaduras, modificado de Sambrook *et al.*, [1989]:

El día anterior al experimento se inoculó la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el vector de expresión en 10 ml de SD y se dejó crecer con agitación (275 rpm) durante toda la noche a 28°C hasta saturación. De la suspensión, se tomaron 5 ml de células y se centrifugaron a 7000 $\times g$. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron con 1 ml de agua destilada para centrifugar de nuevo a 7000 $\times g$ y volver a desechar el sobrenadante. El sedimento obtenido se resuspendió en 500 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM, SDS 1%) y se añadieron bolitas de vidrio de 425-600 μ m lavadas con ácido hasta un volumen final de 1.25 ml. La mezcla obtenida se sometió a agitación vigorosa en *vortex* durante 2 minutos para completar la rotura física de las células y se recogió la fase líquida por filtración. Al eluído se le añadieron 275 μ l de acetato amónico 7M pH 7.0 y se incubó, primero a 65 °C durante 5 minutos y después otros 5 minutos en hielo. Se añadieron 500 μ l de cloroformo, se volvió a agitar en *vortex* y se precipitaron los restos celulares con un pulso de centrifugación (2 segundos) a 12000 $\times g$.

El sobrenadante obtenido (que contenía el ADN genómico y plasmídico) se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de isopropanol y se centrifugó a 10.000 $\times g$ durante 5 minutos para que el ADN precipitase. Finalmente, se lavó con etanol al 70%, se secó en un desecador de vacío y se disolvió en 50 μ l de agua destilada.

1.5.5.- ALMACENAMIENTO DE LOS CLONES DE LEVADURAS TRANSFORMADOS.

Después de los chequeos pertinentes, las colonias seleccionadas de las placas de SD obtenidas tras las transformaciones se inocularon en medio líquido SD y se crecieron a 28 °C con agitación (275 rpm) durante la noche anterior al almacenamiento. Cuando los cultivos alcanzaron una DO a 600 nm de entre 2 a 3, se tomaron 0.5 ml y se añadieron junto con otros 0.5 ml de glicerol al 30% a un tubo de congelación. Las células se congelaron almacenándolas inmediatamente y por duplicado en congeladores de -80°C.

1.6.- MUTAGÉNESIS

1.6.1.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para construir la mayoría de los mutantes estudiados en este trabajo se utilizó un *kit* de mutagénesis de la casa comercial *Stratagene*: "Quick change site directed Mutagénesis Kit". Este *kit* presenta una serie de ventajas:

- permite mutaciones puntuales, cambios de uno o varios aminoácidos, inserciones o deleciones en plásmidos de doble hélice.
- elimina la necesidad de subclonar en otros vectores o de recuperar un ADN monocatenario.



- evita la necesidad de localizar sitios de restricción únicos.
- no requiere realizar transformaciones múltiples.

Para la amplificación por PCR, se empleó la polimerasa *PfuTurbo*[®] que se caracteriza por presentar una elevada fidelidad de replicación (lo que disminuye notablemente la probabilidad de introducir mutaciones al azar) y además, replica ambas hebras del molde y no desplaza los cebadores mutantes.

El proceso de mutagénesis requiere un plásmido de ADN molde doble hebra superenrollado con el ADNc a mutar inserto y dos cebadores (complementarios a cada una de las hebras del vector) que incorporen la mutación deseada. Los cebadores son extendidos por PCR usando la polimerasa *PfuTurbo*[®] durante un reducido número de ciclos. Se generan hebras de ADN que incorporan la mutación deseada y que presentan cortes. A continuación se les somete

a digestión con la endonucleasa *DpnI* que es específica de ADN metilado y hemimetilado (la mayoría de las cepas de *E. coli*, como TG1 α , son dam metilantes). Con esto, se eliminan las hebras parentales y quedan únicamente las hebras generadas a partir de la PCR (incorporan las mutaciones deseadas). El paso final es introducir los vectores sintetizados (con cortes) en la cepa de *E. coli* suministrada por el kit, XL1-Blue Supercompetente. Esta cepa, mediante un proceso de transformación por choque térmico, capta el ADN mutante con cortes y lo repara generando un nuevo plásmido que contiene la secuencia original con las mutaciones diseñadas introducidas (figura 35).

En la generación de mutantes, se emplearon moldes distintos, pero todos ellos presentaban el ADNc a mutar inserto en uno de los vectores empleados en el trabajo, o pUC19 o pYeDP. Según se usara uno u otro vector, el proceso de mutagénesis se realizó con algunas modificaciones.

1.6.1.1.- Mutantes realizados a partir de pUC19

Se encuadraron en este grupo los mutantes:

- *Puntuales*: en estos mutantes únicamente se cambió un residuo conservado de la secuencia original de la UCP1 por el residuo conservado correspondiente de la UCP2. Se incluyen aquí Pro78Val, Ala264Arg y Thr259Arg.

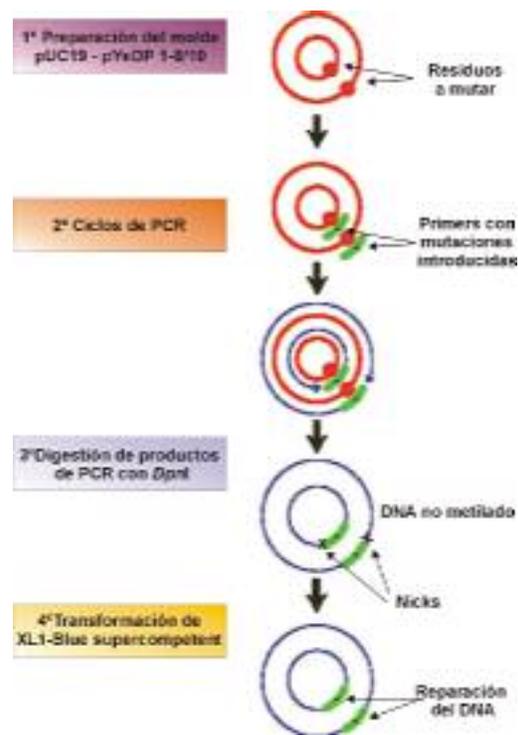


Figura 35 Esquema general del proceso de mutagénesis realizado con el kit "Quick change site directed Mutagénesis Kit".



CEBADOR	Tm °C	DIR.	SECUENCIAS ORIGINALES <i>Rh</i> UCP1 /SECUENCIAS MUTADAS	MUTACIÓN INTRODUCIDA
Pro78Val_s	74.5	5'	CTGTACAGCGGTCTGCCTGTGGCATCCAGAGG CTGTACAGCGGTCTG GT TGCTGGCATCCAGAGG	L ₇₃ YSGLPAGIQR ₈₃ LYSGL V AGIQR
Pro78Val_r	74.5	3'	CCTCTGGATGCCAGCA ACC CAGACCGCTGTACAG	LYSGL V AGIQR
Ala264Arg_s	77.5	5'	GTACACCAAGGAAGGACCGGCAGCCTTTTCAAAGGGTTG GTACACCAAGGAAGGACCG CG AGCCTTTTCAAAGGGTTG	Y ₂₅₈ TKEGPA AAFFKGF ₂₇₀ YTKEG P RA FFKGF
Ala264Arg_r	77.5	3'	CAAACCCCTTTGAAAAGGCT CG CGGTCTTCTTGGTGTAC	YTKEG P RA FFKGF
Thr259Arg_s	77 °C	5'	GCAATGACCATGTACACCAAGGAAGGACCGGC GCAATGACCATGTAC CGG AAGGAAGGACCGGC	A ₂₅₄ MTMYTKEGPA ₂₆₄ AMTMY R KEGPA
Thr259Arg_r	77 °C	3'	GCCGGTCTTCTT CGG TAGATGGTCATTGC	AMTMY R KEGPA

Tabla 5 Temperaturas de fusión y cambios originados por los cebadores mutagénicos diseñados en este primer grupo de mutantes puntuales. Se reflejan las secuencias originales de la UCP1 y las mutaciones introducidas se señalan en rojo.

- *Varios aminoácidos:* este grupo de mutantes, entre los que se encuentran Lp2_A, Lp2_B, Lp2_AB, Lp1_B y Lp3_A, cambian varios aminoácidos de la secuencia original de la UCP1 por aminoácidos conservados en las UCP2.

Para la construcción de estos mutantes se diseñaron los cebadores mutagénicos que se reflejan en las tablas 5 y 6, atendiendo a las instrucciones suministradas por el fabricante del *kit*. Su síntesis, y la de todos los cebadores diseñados en este trabajo, se encargó al servicio de química de proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Todos los *cebadores* eran suministrados deshidratados y se preparaban a una concentración de 0.1 µg/µl con agua destilada para su posterior utilización.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador "Gene

CEBADOR	Tm °C	DIR.	SECUENCIAS ORIGINALES <i>Rh</i> UCP1 /MOLDE/ MUTADAS	MUTACIÓN INTRODUCIDA
Lp1_B_s	82.4	5'	GCCAAGACAGAAGGATTGCCGAACTGTACAGCGGTCTG GCCAAGACAGAAG TCCCGGGAGC CTGTACAGCGGTCTG	A ₆₅ KTEGLPKLYSGL ₇₇ AKTEG P RSLYSGL
Lp1_B_r	82.4	3'	CAGACCGCTGTACAG GCTCCGGG ACCTTCTGTCTTGGC	AKTEG P RSLYSGL
Lp3_A_s	79 °C	5'	GGACAGTACCCAAGTGTACCCAGCTGTGCAATGACCATG GGACAGTACCCAAGT CAGGGC ACTGTGCAATGACCATG	G ₂₄₅ QYPSVSPSCAMT ₂₅₇ GQYPS A GHCAMT
Lp3_A_r	79 °C	3'	CATGGTCATTGCACAG TGGCCTGC ACTTGGGTACTGTCC	GQYPS A GHCAMT
Lp2_A_s	80.1	5'	GTTATAGCCACCACAGAAAGCTTGTCAACTGTGGAAGGGACG GTTATAGCCACCACAGAA GGCTTGCAGG ACTGTGGAAGGGACG	V ₁₆₂ IATTESLSTLWKG T ₁₇₆ VIATTEG L RGLWKG T
Lp2_A_r	80.1	3'	CGTCCCTTCCACAGT CCTCG CAAGC TT TCTGTGGTGGCTATAAC	VIATTEG L RGLWKG T
Lp2_B_s	71 °C	5'	CAGAGTTATAGCCACCACAGAAAGCTTGTCAAC CAGAGTTATAGCC CGCGA AGAAAGCTTGTCAAC	R ₁₆₁ VIATTESLST ₁₇₁ RVIA R EESLST
Lp2_B_r	71 °C	3'	GTTGACAAGCTTCT TTCGCGG GCTATAACTCTG	RVIA R EESLST
Lp2_AB_s (Lp2_B_s)	76 °C	5'	CAGAGTTATAGCCACCACAGAAAGCTTGTCAAC CAGAGTTATAGCCACCACAGAA GGCTTGCAGG CAGAGTTATAGCC CGCGA AGAAAGCTTGCAGG	R ₁₆₁ VIATTESLSTLWKG T ₁₇₆ RVIA R E E GLRGLWKG T
Lp2_AB_r	76 °C	3'	CCTCGAAGCCTTCT TTCGCGG GCTATAACTCTG	RVIA R E E GLR G

Tabla 6 Temperaturas de fusión y cambios originados por los cebadores diseñados en este primer grupo de mutantes de varios aminoácidos. Se reflejan las secuencias originales y/o mutadas de los moldes, así como las mutaciones introducidas (en rojo las introducidas en el proceso de mutagénesis, en verde las ya incorporadas en el molde en un proceso de mutagénesis anterior).



Amp System 2400" (Perkin-Elmer).

Todos estos mutantes, excepto Lp2_AB que utilizó como molde pUC19-Lp2_A, se realizaron a partir de una muestra purificada de pUC19 con el ADNc de la UCP1 (pUC19-

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Fase
1	1	95 °C	30 sg.	Desnaturalización
2	16/18	95 °C	30 sg.	Desnaturalización
		55 °C	1 min.	Anillamiento
		68 °C	7 min. 12 sg.	Extensión
3	1	68 °C	7 min.	Finalización
4	1	4 °C	?	

Tabla 7 Ciclos de PCR programados para la realización de los mutantes generados a partir de pUC19.

UCP1) inserto entre dianas *EcoRI*. En todos los casos, la mezcla de reacción tuvo un volumen de 50 μ l y se componía de de 25 ng de molde, 125 ng de cada uno de los cebadores sintetizados y purificados, 1 μ l de ADN polimerasa *PfuTurbo* (2.5 U/ μ l), 5 μ l de tampón de reacción (KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100mM, Tris-HCl 200 mM pH 8.8, MgSO₄ 20 mM, Triton® X-100 1%, SAB libre de nucleasas 1mg/ml), 1 μ l de mezcla de dNTPs (220 μ M de cada uno), y agua destilada hasta completar el volumen. El desarrollo del protocolo de mutagénesis fue el mismo en todos los casos, con la única excepción de que para los mutantes que incluían varios cambios (Lp1_B, Lp3_A, Lp2_A, Lp2_B y Lp2_AB) fueron necesarios dos ciclos de PCR adicionales (18) debido a que la mayor complejidad de la mutación así lo requería. Los ciclos de PCR programados fueron los señalados en la tabla 7.

En todos los casos la amplificación por PCR se chequeó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se digirió con *DpnI* durante una hora y se transformó XL1-Blue Supercompetente con 1 μ l de la digestión. La selección de positivos se realizó con IPTG y X-Gal, según condiciones ya mencionadas, en placas de LB con ampicilina incubadas durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron dos clones de cada mutante y se incubaron en medio líquido LB con ampicilina durante la noche a 37 °C y con agitación. Así se amplificaron los plásmidos y posteriormente se purificaron para llevarlos a secuenciar al servicio de secuenciación automática de ADN del CIB.

Una vez comprobado que, aparte de la deseada, no se había introducido ninguna mutación en la región codificante de nuestro ADN se linearizó el vector pYeDP vacío con *EcoRI* y se trató con la fosfatasa SAP. Con el mismo enzima, se escindieron de pUC19 las formas mutadas de la UCP1. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. y se purificaron los ADNs a partir de las bandas observadas tras tinción con bromuro de etidio al 1%. El plásmido pYeDP vacío linearizado se purificó con el *kit* "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" y los ADNc quimera con el *kit* "QIAquick Gel Extraction Kit Protocol".

A continuación se unieron con ADN ligasa de T4 el vector pYeDP y las formas mutadas de la UCP1 en una relación molar de 1:10 durante 16 horas a 16°C, y se transformó *E. coli* TG1 α por choque térmico. Las bacterias se incubaron en medio sólido LB con ampicilina a 37 °C durante la noche y de los clones obtenidos se seleccionaron varios por cada mutante para, tras un proceso de lisis ácida del contenido celular, analizar su patrón de migración en gel de agarosa al 0.7 % (ver sección 1.4.3). Los clones seleccionados, se inocularon en medio líquido LB ampicilina y se volvieron a incubar con agitación y a 37°C durante la noche. Se aislaron sus plásmidos, y seguidamente se digirieron con *NcoI* durante 4 horas a 37 °C para determinar la orientación de inserción de



los ADNc quimera en el vector de expresión. Localizados los clones con nuestros ADN quimera insertos en posición codificante, se introdujeron en W303 2n por electroporación.

1.6.1.2.- Mutantes realizados a partir de pYeDP

Dentro de este grupo se engloban el resto de los mutantes construidos en este trabajo, con la excepción de Q-121, Q-212, Lp1_A, Lp2_C y Lp1_A/Lp2_C. Se utilizó de nuevo el *kit* de mutagénesis "Quick change site directed Mutagénesis Kit" para generar las mutaciones, pero varió el proceso al variar el molde a usar. Al igual que en el grupo anterior se diseñaron tanto mutantes puntuales como de varios aminoácidos:

- *Mutantes puntuales:* los mutantes diseñados en este grupo fueron, sobre la UCP1: Gly124Ala, Gly130Ala, Pro178Val, Gly175Leu, Glu134Asp y Met140Phe; y sobre la UCP2: U2Asp138Glu y U2Phe144Leu.
- *Varios aminoácidos:* aquí se sitúan el resto de los mutantes. Únicamente U2Lp2_A es una proteína quimera realizada sobre la UCP2. El resto de los mutantes son proteínas quimera de la UCP1. Se realizaron mutantes del segmento transmembrana III (Hx3_A y Q-Hx3), del segmento IV (Q-Hx4), de ambos (Q-Hx3/Hx4) y finalmente del *loop* matricial II (Lp2_D, Lp2_ABC, Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE y Q-Lp2).

CEBADOR	T _m °C	DIR	SECUENCIAS ORIG. RnUCP1/MOLDE/ SECUENCIAS MUTADAS	MUTACIÓN INTRODUCIDA
Gly124Ala_s	77.3 °C	5'	CTTGATGACGGGTGGCGTGGCGGTATTC CTTGATGACGGGTG C CGTGGCGGTATTC	L ₁₂₁ MTGGVAVF ₁₂₉ LMTG A VAVF
Gly124Ala_r	77.3 °C	3'	GAATACCGCCACGGCACCCGTCATCAAG	LMTG A VAVF
Gly130Ala_s	77.1 °C	5'	GCGGTATTCATTGGCCAGCCACAGAG GCGGTATTCATTG C GCAGCCACAGAG	A ₁₂₆ VFIGQPT E ₁₃₄ AVFI A QPT E
Gly130Ala_r	77.1 °C	3'	CTCTGTGGGCTGCGCAATGAATACCGC	AVFI A QPT E
Pro178Val_s	77.2 °C	5'	CACTGTGAAAGGGACGACTCCTAATCTAATGAGAAATGTC CACTGTGAAAGGGACGACT G TTAATCTAATGAGAAATGTC	L ₁₇₂ WKGTTPNLMRNV ₁₈₄ LWKGT V NLMRNV
Pro178Val_r	77.2 °C	3'	GACATTTCTCATTAGATTAACAGTCGTCCTTCCACAGTG	LWKGT V NLMRNV
Gly175Leu_s	77.1 °C	5'	CTTGTCAACACTTGGAAAGGGACGACTCCTAATCTAATG CTTGTCAACACTTGGAA A CTGACGACTCCTAATCTAATG	¹⁷⁵ STLWKGTTPNLM ₁₈₁ L S TLW K L T TPN L M
Gly175Leu_r	77.1 °C	3'	CATTAGATTAGAGTCGTCAGTTCCACAGTGTGACAAG	L S TLW K L T TPN L M
Glu134Asp_s	80.2 °C	5'	GGGCAGCCACAGAGTGGTGAAGGTCAG GGGCAGCCACAG A TGGTGAAGGTCAG	G ₁₃₀ QPT E VVKV R ₁₃₉ GQPT D VVKV R
Glu134Asp_r	80.2 °C	3'	CTGACCTTCCACATCTGTGGGCTGCC	GQPT D VVKV R
Met140Phe_s	78.9 °C	5'	GGTGAAGTCCAGATCCCAAGCACAAGCCATCTGCAC GGTGAAGTCCAG A TCCCAAGCACAAGCCATCTGCAC	V ₁₃₈ KVRFQAQ S HLH ₁₄₇ VKV R FQAQ S HLH
Met140Phe_r	78.9 °C	3'	GTGCAGATGGCTTTGCTTGAATCTGACCTTCCACC	VKV R FQAQ S HLH
U2Asp138Glu_s	78.8 °C	5'	GCCCAACCTACAGATGGTAAAGGTCGG GCCCAACCTACAG A GGTAAAGGTCGG	AQPTD V VKV R AQPT E VVKV R
U2Asp138Glu_r	78.8 °C	3'	CGGACCTTACCACCTCTGTAGGTTGGGC	AQPT E VVKV R
U2Phe144Leu_s	83.1 °C	5'	GGTAAAGTCCGCTTCCAGGCCAGGCC GGTAAAGTCCG C TCCAGGCCAGGCC	V ₁₄₆ KVRFQAQ A ₁₅₄ VKV R LQAQA
U2Phe144Leu_r	83.1 °C	3'	GGGCTGGGCTGGAGGCGACCTTTACC	VKV R LQAQA

Tabla 8 Temperaturas de fusión y cambios originados por los cebadores diseñados en este segundo grupo de mutantes puntuales. Se muestran las secuencias originales de la UCP1 donde hibridan los cebadores diseñados. Las mutaciones introducidas por el proceso de mutagénesis se señalan en rojo.



CEBADOR	Tm °C	DIR	SECUENCIAS ORIG. RnUCP1/MOLDE/ SECUENCIAS MUTADAS	MUTACIÓN INTRODUCIDA
Hx3_A_s	66 °C	5'	CTTTGGGAAGCAAGATCTCGGCTGGCTTGTATGACGGGTGGCGTG CTTTGGGAAGCCGCTCTCTGCTGGCAGCACCACGGGTGGCGTG	S ₁₁₁ LGSKISAGLMTGGV ₁₂₅ SLGSRLLAGSTGGV
Hx3_A_r	66 °C	3'	CACGCCACCCGTGGTGTGCCAGCCAGGAGGGCGGCTTCCCAAAG	SLGSRLLAGSTGGV
Q-Hx3_s	66 °C	5'	TGATGACGGGTGGCGTGGCGGTATTTCATTGGGCAGCCACAGAG GCACACGGGTGGCGTGGCGGTATTTCATTGGGCAGCCACAGAG GCACACGGGTGCCGCGGTAGCTGTGCCACGCCACAGAG	S ₁₁₁ LGSKISAGLMTGGVAVFIGQPT _{E134} SLGSRLLAGSTGALAVAVAQPT _E
Q-Hx3_r	66 °C	3'	CTCTGTGGGCTGGGCCACAGCTACCGCCAGGGCACCCGTGGTGC	GALAVAVAQPT _E
Q-Hx4_s	76 °C	5'	CGACTCCTAATCTAATGAGAAATGTCATCATCAACTGTACAG CGACTCCTAATGTTGCCAGAAATGCCATCGTCAACTGTACAG	T ₁₇₇ PNLMRNVINCT ₁₈₉ TPNVARNAIVNCT
Q-Hx4_r	76 °C	3'	CTGTACAGTTGACGATGGCATTCTGGCAACATTAGGACTCG	TPNVARNAIVNCT
Q-Hx3/Hx4_s	76 °C	5'	CGACTCCTAATCTAATGAGAAATGTCATCATCAACTGTACAG CGACTCCTAATCTAATGAGAAATGTCATCATCAACTGTACAG CGACTCCTAATGTTGCCAGAAATGCCATCGTCAACTGTACAG	ISAGLMTGGVAVFIGQPT _E /TPNLMRNVINCT LLAGSTGALAVAVAQPT _E /TPNVARNAIVNCT
Q-Hx3/Hx4_r	76 °C	3'	CTGTACAGTTGACGATGGCATTCTGGCAACATTAGGACTCG	TPNVARNAIVNCT
Met140Phe_s (Lp2_D_s)	80.2°C	5'	CAGAGGTGGTGAAGTGCAGAAATGCAAGCACAAGCCATCTGCAC CAGATGTGGTGAAGTGCAGAAATGCAAGCACAAGCCATCTGCAC CAGATGTGGTGAAGTGCAGAAATGCAAGCACAAGCCATCTGCAC	G ₁₃₀ QPT _E VVVKVMQASHLH ₁₄₇ GQPT _E DVVKVRFQASHLH
Met140Phe_r (Lp2_D_r)	80.2°C	3'	GTGCAGATGGCTTTGTGCTTGAATCTGACCTTCACC	GQPT _E DVVKVRFQASHLH
Lp2_ABC_s	81°C	5'	CAGAGTTATAGCCACACAGAAGCTTGTCAACTGTGGAAAG CAGAGTTATAGCCCGCAGAGAAGCTTGTCAACTGTGGAAAG	QAQSHLHGKIPRY...RVIATTESLTLWK QAQARAGGGR.RY...RVIAREGLRLWK
Lp2_ABC_r	81°C	3'	CTTCCACAGTCTCCGCAAGCTTCTTCGCGGGGTATAACTCTG	RVIAREGLRLWK
Lp2_ABCD_s	81°C	5'	CAGCCACAGAGGTGGTGAAGTGCAGAAATGCAAGCACAAGCC CAGCCACAGAGGTGGTGAAGTGCAGAAATGCAAGCACAAGCC CAGCCACAGATGTGGTGAAGTGCAGAAATGCAAGCACAAGCC	QPT _E VVVKVMQASHLHGKIPRY...RVIATTESLTLW QPT _E DVVKVRFQARAGGGR.RY...RVIAREGLRLWK
Lp2_ABCD_r	81°C	3'	GGCTTGTGCTTGAATCTGACCTTACCACATCTGTGGGCTG	QPT _E DVVKVRFQAQA
Lp2_ABCDE_s	79°C	5'	AACCCCGCTACACTGGGACCTACATGCTTACAGAG GTCGGCGCTACACTGGGACCGTCAAGCTTACAGAG GTCGGCGCTACAGAGCACCCTCGAAGCTTACAGAG	QPT _E VVVKVMQASHLHGKIPRYTGTYNAYR QPT _E DVVKVRFQARAGGG.RRYQSTVEAYR
Lp2_ABCDE_r	79°C	3'	CTCTGTAAGCTTCGACGGTCTGCTGAGCCCGAC	RRYQSTVEAYR
Q-Lp2_s	78°C	5'	GACTACAATGCTTACAGAGTTATAGCCACACAG CACCCTCGAAGCTTACAGAGTTATAGCCCGCAAG CACCCTCGAAGCTTACAGAGTTATAGCCCGCAAG	TEVKVVMQASHLHGKIPRYTGTYNAYRVIATTESLST TDVKVRFQARAGGG.RRYQSTVEAYRTIAREGLRG
Q-Lp2_r	78°C	3'	CTTCGCGGGCTATGCTCTTGAAGCTTCGACGGTG	TVEAYKTIARE
U2Asp138Glu_s (U2Lp2_A_s)	83.1°C	5'	GCCCAACCTACAGAGGTGGTAAAGTCCCGCTCCAGGCCAGGCC GCCCAACCTACAGAGGTGGTAAAGTCCCGCTCCAGGCCAGGCC GCCCAACCTACAGAGGTGGTAAAGTCCCGCTCCAGGCCAGGCC	A ₁₄₀ QPT _E DVVKVRFQAQA ₁₅₄ AQPT _E VVVKVRLQAQA
U2Asp138Glu_r (U2Lp2_A_r)	83.1°C	3'	CGGACCTTTACACCTCTGTAGGTTGGGC	AQPT _E VVVKVRLQAQA

Tabla 9 Temperaturas de fusión y cambios originados por los cebadores diseñados en este segundo grupo de mutantes de varios aminoácidos. Se muestran las secuencias originales de la UCP1, así como las de los moldes previamente mutados. Las mutaciones introducidas se señalan con caracteres en rojo, y en verde, las mutaciones ya incorporadas en los moldes en procesos de mutagénesis anteriores.

La secuencia de los cebadores diseñados para realizar este grupo de mutantes se encuentra reflejada en las tablas 8 y 9. En todos los mutantes puntuales, salvo en U2Asp138Glu y U2Phe144Leu, se usó como molde de PCR el vector de expresión pYeDP-UCP1. Para la construcción de U2Asp138Glu y U2Phe144Leu fue pYeDP-UCP2. Para los mutantes que incluían cambios en varios aminoácidos, los moldes de PCR empleados fueron varios, y vienen reflejados en la tabla 11 de la página siguiente. El proceso de mutagénesis se desarrolló de manera análoga al realizado para los mutantes realizados a partir de pUC19, pero al variar el tamaño del molde se variaron las condiciones de PCR según las

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Fase
1	1	95 °C	30 sg.	Desnaturalización
2	18	95 °C	30 sg.	Desnaturalización
		55 °C	1 min.	Anillamiento
		68 °C	14 min.	Extensión
3	1	68 °C	7 min.	Finalización
4	1	4 °C	?	

Tabla 10 Ciclos de PCR programados para la realización de los mutantes generados a partir de pYeDP.



instrucciones del *kit* (tabla 10).

Del mismo modo que para los mutantes realizados sobre pUC19, se chequeó la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se digirieron las hebras parentales con *DpnI*. Se tomó 1 μ l de la digestión y se transformaron por choque térmico bacterias de la cepa XL1-Blue Supercompetente. Se incubaron durante toda la noche a 37°C en placas de LB con ampicilina y los clones seleccionados se amplificaron, se aislaron sus plásmidos, y llevaron a secuenciar. Chequeada la introducción de la mutación deseada, los plásmidos quimera se introdujeron en nuestra cepa de *S. cerevisiae* por transformación con acetato de litio.

Mutante	MOLDE EMPLEADO
Hx3_A	pYeDP-RnUCP1
Q-Hx3	pYeDP-Hx3_A
Q-Hx4	pYeDP-RnUCP1
Q-Hx3/Hx4	pYeDP-Q-Hx3
Lp2_D	pYeDP-Glu134Asp
Lp2_ABC	pYeDP-Lp2_C
Lp2_ABCD	pYeDP-Lp2_ABC
Lp2_ABCDE	pYeDP-Lp2_ABCD
Q-Lp2	pYeDP-Lp2_ABCDE
U2Lp2_A	pYeDP-U2Asp144Leu

Tabla 11 Moldes empleados en la construcción de los mutantes de varios aminoácidos a partir de pYeDP. Todos ellos, excepto U2Lp2_A que es una quimera de la UCP2, son proteínas quimera de la UCP1.

1.6.2.- CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES Q-121 Y Q-212

Se empleó de nuevo el *kit* "Quick change site directed Mutagénesis Kit", con el cual se generaron sobre la UCP1 y la UCP2 dos nuevos sitios de restricción:

- *PfFI* sobre UCP1 (U1Q2L12').
- *PfMI* sobre UCP2 (U1Q2L12'').

Para ello, se diseñaron cuatro nuevos cebadores cuyas secuencias se describen en la tabla 12. La mutagénesis se realizó con las mismas condiciones de PCR descritas en la tabla 10 y con los mismos chequeos que para el grupo anterior de mutantes realizados sobre pYeDP.

Una vez obtenidos y purificados los nuevos plásmidos quimera pYeDP-U1Q2L12' y pYeDP-U1Q2L12'' de XL1-Blue Supercompetente, se introdujeron en *E. coli* SCS110 por transformación por choque térmico. Se crecieron durante una noche en medio líquido LB con ampicilina, con agitación y a 37 °C, y se volvieron a aislar los plásmidos no metilados para llevarlos a secuenciar. Comprobadas las secuencias, se digirieron los plásmidos con *PfFI* y *PfMI* durante 16 horas a 37 °C y se intercambiaron los fragmentos de ambos vectores uniéndolos con ADN ligasa de T4 a 16°C durante la noche (ver sección 3.2.3 de Resultados Experimentales).

CEBADOR	Tm °C	DIR.	SECUENCIAS ORIGINALES UCP / MUTADAS	MUTACIÓN INTRODUCIDA
Q12's	65.8	5'	GATTGGCCTCTACGATACGGTCCAAGAGTACTTC RnUCP1 GATTGGCCTCTACGACTCTGTCCAAAGAGTACTTC PfFI	I ₉₂ GLYDVTVQEYF ₁₀₂ IGLYDSVQEYF
Q12'r	65.8	3'	GAAGTACTCTTGGACAGAGTCGTAGAGCCAATC	IGLYDSVQEYF
Q12's	76.4	5'	GATACTCTCCTGAAAGCCAACCTCATGACAGACGACCTCCCTTG MmUCP2 GATACTCTCCTGAAACACCACATACTGCGAGACGACCTCCCTTG PfMI	D ₂₀₂ TLLKANLMTDDL _{P215} DTLLKHHILADDLP
Q12'r	76.4	3'	CAAGGGAGGTCGTCTGCCAGTATGTGGTGTTCAGGAGAGTATC	DTLLKHHILADDLP

Tabla 12 Temperaturas de fusión y cambios originados por los cebadores. Se reflejan las secuencias originales y las mutaciones introducidas (en rojo se las introducidas en la mutagénesis).



Con 1 μ l de la ligación se transformaron bacterias TG1 α por choque térmico y se crecieron en placas de LB ampicilina a 37°C toda la noche. A la mañana siguiente se seleccionaron varios clones de cada quimera y se incubaron a 37 °C con agitación durante 12 horas. De este modo se amplificaron los plásmidos y se llevaron a secuenciar, tras lo cual, del mismo modo que en el caso de los mutantes realizados a partir de pYeDP, se introdujeron en *S. cerevisiae* por transformación con acetato de litio.

1.6.3.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE Lp1_A

El protocolo de mutagénesis que se utilizó para la construcción de estos mutantes es el descrito en Di Donato *et al.* [1993]. Para ello, se diseñaron cuatro nuevos cebadores mutagénicos cuyas secuencias se muestran en la tabla 15 de la página siguiente.

En primer lugar se generó con una primera PCR un "core template" con los oligos Lp1_A1_s y Lp1_A1_r. El ADN se amplificó en 100 μ l de mezcla de reacción que contenía: dNTPs (220 μ M de cada uno), los cebadores (0.2 μ M de cada uno), las polimerasas *Ampli Taq* (5 U/ μ l) y *Pfu* (2.5 U/ μ l) (0.5 μ l de cada una), 5 μ l de tampón comercial para Taq (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.0, Triton[®] X-100 1%) y otros 5 μ l del de *Pfu* (KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100mM, Tris-HCl 200 mM pH 8.75, MgSO₄ 20 mM, Triton[®] X-100 1%, SAB 1mg/ml), MgCl₂ (1.5 mM) y SAB (0.1 mg/ml). Las condiciones fijadas para esta PCR fueron las descritas en la tabla 13. A continuación, con los oligos Lp1_A2_s y Lp1_A2_r, y partiendo de 5 μ l de la primera reacción, el fragmento generado se amplificó con una nueva PCR con condiciones ligeramente diferentes (tabla 14).

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Fase
1	1	96 °C	1 min.	Desnaturalización
2	20	96 °C	40 sg.	Desnaturalización
		58 °C	1 min.	Anillamiento
		72 °C	1 min. 30 sg.	Extensión
3	1	72 °C	7 min.	Finalización
4	1	4 °C	?	

Tabla 13 Ciclos programados para la primera de las PCR realizadas en el proceso de generación de Lp1_A. Con estos se creó el denominado "core template".

Se obtuvo así un fragmento quimera TMGVKIFSAGVSA~~CLADIIITFPLDT-~~AKVRLQIQGES~~SOGLVRTAA~~TIRYKGVLTITTLA (F1) que contenía secuencia de la UCP2 (~~SOGLVRTAA~~) flanqueada por secuencia de la UCP1. Este fragmento se clonó en pUC19 entre dianas *Sma*I con ADN ligasa de T4 y dio lugar a pUC19-F1 que se introdujo, en TG1 α por choque térmico. De manera paralela, se clonó el gen de la UCP1 en pUC19 entre dianas *Eco*RI y se introdujo también en TG1 α . Ambas transformaciones se sembraron en placas de LB con ampicilina y se crecieron toda la noche a 37 °C. A la mañana siguiente se seleccionaron varios de los clones transformados y se crecieron en LB líquido con ampicilina para amplificar y aislar los plásmidos. A continuación se digirieron ambos con los enzimas *A*luNI y *N*coI y se separaron los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (ver sección 3.2.4 de Resultados Experimentales). Tras purificarlos con el *kit* "QIAquick Gel Extraction Kit" se unieron los fragmentos correspondientes con ADN ligasa de T4 y se originó el vector intermedio pUC19-UCPF1.



que contenían el ADNc quimera y su correspondiente fragmento en el gen salvaje (ver sección 3.2.5 de Resultados Experimentales). Ambos se unieron con ligasa de T4 y se originó el plásmido quimera pUC19-UCPF2. Con 1 μ l de la mezcla de ligación se transformó por choque térmico TG1 α y las células se sembraron en placas de LB con ampicilina durante la noche. A la mañana siguiente se seleccionaron varios clones y se incubaron con agitación durante 12 horas en medio líquido LB ampicilina a 37 °C. Se amplificó de este modo pUC19-UCPF2 y éste, junto con pUC19-UCP1, se digirieron por separado con los enzimas *Alu*NI y *Ppu*MI. Las digestiones se separaron de nuevo por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, y los fragmentos homólogos complementarios del ADNc quimera y de la UCP1 se unieron con ligasa de T4 para generar pUC19-Lp2_C.

De nuevo, con 1 μ l de la ligación se transformaron bacterias TG1 α por choque térmico y se crecieron en placas de LB ampicilina a 37°C durante 12 horas. A la mañana siguiente se seleccionaron varios clones de cada quimera y se incubaron a 37 °C con agitación durante la noche. De este modo se amplificaron los plásmidos y de la misma forma que para Lp1_A, se introdujeron por choque térmico en *E. coli* SCS110, se amplificaron, se llevaron a secuenciar y se escindieron de pUC19 con *Eco*RI para después introducir las quimeras en el vector de expresión pYeDP (ver sección 1.6.1.1). En último término, y también de modo análogo a Lp1_A se introdujo pYeDP-Lp2_C en nuestra cepa de *S. cerevisiae* por electroporación.

1.6.5.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE Lp1_A/Lp2_C

Este mutante se generó a partir de pUC19-Lp1_A y pUC19-Lp2_C. Partiendo de los plásmidos purificados y secuenciados, se digirieron ambos con *Msc*I y *Alu*NI. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis y los dos fragmentos complementarios de pYeDP-Lp1_A y pYeDP-Lp2_C que contenían las mutaciones previamente introducidas (**SQGLV**RTAA y **ARAG**GGR) se unieron con ADN ligasa de T4 (ver sección 3.2.6 de Resultados Experimentales). El vector pUC19-Lp1_A/Lp2_C se amplificó de modo análogo a pUC19-Lp1_A y pUC19-Lp2_C mediante su introducción en *E. coli* TG1 α , se purificó y se secuenció para comprobar la incorporación de ambas mutaciones. Finalmente, también se escindió de pUC19 con *Eco*RI y se clonó en pYeDP para en último término introducirlo en *S. cerevisiae* por electroporación.

1.6.6.- SECUENCIACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN Y CLONACIÓN

Para asegurarnos que no se habían introducido mutaciones en las regiones codificantes de nuestros ADNs, los plásmidos recombinantes se secuenciaron de forma rutinaria en el servicio de secuenciación automática del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB).

En el caso del vector de clonación pUC19, en la secuenciación se utilizaron los cebadores siguientes:

- M13 (-47): 5´d(CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC)3´
- M13r(-48): 5´d(AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA)3´

Con una T_m de 70 y 60 respectivamente, estos oligos hibridaban con regiones del *polilinker* y nos permitían la lectura del ADNc insertado en él (figura 32).

Como cebadores de secuenciación del vector de expresión pYeDP se diseñaron dos nuevos oligonucleótidos que presentaban las siguientes características:

- Situados en posición -72 bp a partir de la diana *EcoRI* del *polilinker* de pYeDP (y que es el punto a partir del cual se insertaron nuestros ADNs) (figura 36).
- Con una T_m media de 54°C, calculada con el programa informático *oligo.exe* versión 3.4 (Wojciech Rychlik Boreland Int.).
- De hibridación única a lo largo de la secuencia de pYeDP.
- De baja tendencia a la formación de estructuras secundarias.

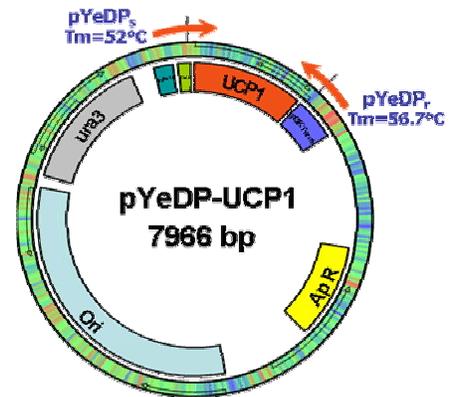


Figura 36 Representación esquemática de la hibridación de los cebadores diseñados para el chequeo de las mutaciones introducidas. Se señalan las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos diseñados.

La secuencia de éstos fue:

- pYeDP-s: 5' d(CATTAGGTCCTTTGTAGCATAAATT) 3'
- pYeDP-r: 5' d(AATAATTCCAAAGAAGCACCACCAC) 3'

En cada reacción de secuenciación fueron requeridos 3 μ l de primer a 5 μ M y 10 μ l de muestra a 0.1 μ g/ μ l.

La secuencia originada en cualquiera de los casos, se analizó con ayuda del programa informático *Chromas vers.1.43* [Conor McCarthy, Brisbane, Australia] que interpretaba los resultados del secuenciador y nos permitía leer la secuencia de nuestros ADNs.

2.- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES

2.1.- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA UCP1, UCP2 Y DE SUS FORMAS MUTADAS EN LEVADURAS RECOMBINANTES. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE GENERACIÓN INSTANTÁNEO DE LAS LEVADURAS

La actividad de la UCP1, UCP2 y de sus formas mutadas se analizó *in situ* mediante el estudio del efecto que ocasionaba su expresión en el crecimiento de las levaduras. Para el estudio del crecimiento, las levaduras se incubaron en condiciones



aerobias a 28°C y se controló su crecimiento automáticamente mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm de un cultivo que se hacía circular continuamente a través de la cubeta de un espectrofotómetro "Spectronic 1201". El método seguido para este estudio fue el siguiente:

La noche anterior al experimento se crecieron, a partir de colonias sembradas en placas de SD, preinóculos a 28°C y con agitación (275 rpm), en volúmenes de 100 ml de medio líquido SP. A la mañana siguiente se chequearon las densidades ópticas a 600 nm y los cultivos se diluyeron hasta obtener volúmenes de 100 ml a una absorbancia final a 600 nm de 0.1. Los volúmenes de inóculo en SP necesarios para tener la DO deseada se completaron hasta 50 ml con SP^{1/2} (YNB 0.67 %, fosfato potásico 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.12%, glucosa 0.05%, ácido láctico 2%, casaminoácidos 0.1%, triptófano 20 mg/l, adenina 40 mg/l, pH 4.5 ajustado con KOH) y el volumen final de 100 ml se consiguió con 50 ml más de SP₀ (YNB 0.67 %, fosfato potásico 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.12%, ácido láctico 2%, casaminoácidos 0.1%, triptófano 20 mg/l, adenina 40 mg/l, pH 4.5 ajustado con KOH). El análisis del crecimiento se inició siempre a una densidad óptica de 0.1. Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia de 0.15 unidades se indujo la expresión de las proteínas mediante adición al medio de galactosa al 0.4%. Las medidas del crecimiento se recogieron cada 5 minutos y el crecimiento se siguió durante 7 horas. Las lecturas de absorbancias se corrigieron de la turbidez con la expresión [González-Barroso, M.M., 1997]:

$$Abs_{correctada} = 1.28 \times Abs - Abs^2 + 1.59 \times Abs^3$$

Los valores de absorbancia corregida se convirtieron a un número de células de acuerdo con la expresión antes citada [González-Barroso, M.M., 1997] y se estimó la tasa de generación instantánea de las levaduras. El cálculo de esta tasa se realizó con un programa informático que promediaba los cambios de absorbancia que se producían cada seis lecturas consecutivas y que avanzaba tres datos para continuar con el siguiente cálculo.

Para estandarizar la caracterización de los mutantes se definieron dos tiempos de generación:

- "control": media aritmética entre los valores de tiempo de generación 30 minutos antes y 30 minutos después de la adición de galactosa.
- "galactosa": media aritmética de los valores de tasa de generación entre las 4.5 y 5.5 horas después de la adición de la galactosa.

2.2.- OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE LEVADURAS DE *S. cerevisiae*

Para la obtención de mitocondrias, 36 horas antes de la extracción, se creció un preinóculo en medio mínimo SP a 28 °C con agitación (275 rpm). En este medio se conseguía evitar, tanto la pérdida del plásmido, como la expresión de las proteínas a analizar. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm entre 4 y 5, se diluyó



hasta una absorbancia de 0.3 unidades y se dejó crecer toda la noche en 800 ml de medio mínimo SG. La galactosa presente en este medio constituía la única fuente de carbono para las levaduras, así como el agente de inductor de la expresión tanto de la UCP1 como de la UCP2 o de las formas mutadas.

El protocolo que se siguió para la extracción de mitocondrias de levaduras es el descrito en Arechaga *et al.* [1993], y fue el siguiente:

Las células se recogieron por centrifugación ($6000 \times g$, 2 min.) y se lavaron con agua destilada tres veces para eliminar todos los restos de medio de cultivo. El sedimento de levaduras se resuspendió en β -mercaptoetanol 0.5 M y Tris 0.1 M pH 9.3 y se incubó a 32°C. Tras 10 minutos de incubación con agitación suave (250 rpm), los restos de β -mercaptoetanol se eliminaron mediante tres lavados por centrifugación ($6000 \times g$, 2 min.) con un tampón KCl 0.5 M, Tris-HCl 10 mM pH 7. La pared celular se digirió con citohelicasa (mezcla de enzimas del tracto digestivo de *Helix pomatia*) disuelta en tampón de digestión (sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, citrato 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, a pH 5.8 ajustado con NaOH). La digestión se llevó a cabo a 32°C con agitación durante una hora. Se obtuvieron así protoplastos que se recogieron por centrifugación a $12000 \times g$ durante 5 minutos y se lavaron tres veces para eliminar los restos de enzima en un medio con sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, SAB 0.1%, Tris-maleato 10 mM, y pH 6.8 ajustado con NaOH.

Las mitocondrias se extrajeron por centrifugación diferencial tras la homogenización de los protoplastos obtenidos. El medio utilizado tanto en todas las centrifugaciones diferenciales como en la homogenización (tampón de homogenización) se preparaba fresco cada día y contenía: manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, Tris-maleato 10 mM, Na_2HPO_4 0.5 mM, SAB al 2%, fenil-metilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, pepstatin-A 1 $\mu\text{g/ml}$ y pH 6.8 ajustado con NaOH. La resuspensión final de las mitocondrias se hizo con el mismo tampón en un volumen próximo a 500 μl .

2.3.-OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE TEJIDO ADIPOSO PARDO

Se usaron hámsteres de raza siria que se adaptaban previamente a 6°C durante 2 o 3 semanas. Se mantenían con comida y agua *ad limitum*, sometiéndoles a ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Los animales se sacrificaban por decapitación y el tejido adiposo pardo utilizado provenía de las zonas interescapular, subescapular, cervical dorsal y axilar [Rial & Nicholls, 1984]. Las piezas de tejido adiposo pardo se limpiaban de tejido adiposo blanco, muscular y conectivo, y se introducían inmediatamente en un tampón a 4°C que contenía sacarosa 250 mM, NaTES 5 mM, y EDTA 1 mM; pH 7.4.

Una vez aislado, el tejido se disgregaba y se homogenizaba. El homogenizado resultante se filtraba y centrifugaba a $8500 \times g$ durante 10 min. La capa grasa y el sobrenadante se retiraban. El sedimento se resuspendía en el medio de sacarosa 250 mM, NaTes 5 mM, SAB 5 mg/ml; pH 7.4 y se centrifugaba a $2500 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se decantaba y se volvía a centrifugar a $8000 \times g$ otros 10 min. El sedimento que se obtenía se resuspendía y se sometía a una última centrifugación a 8000



$x g$ otros 10 min. Las mitocondrias en esta última centrifugación constituían el sedimento y se resuspendían en un volumen final aproximado de 500 μ l del mismo medio. Todo el proceso se realizaba a 4°C.

2.4.-VALORACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

Tras el proceso de aislamiento de las mitocondrias, se separaban alícuotas de éstas para la valoración de proteína mitocondrial. La estimación de la concentración de proteína en el sedimento se realizaba, de manera rutinaria, por el método colorimétrico de Lowry modificado por Wang & Smith [1975].

2.5.- MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN EN MITOCONDRIAS

La respiración mitocondrial se midió en un electrodo de oxígeno de tipo "Clark" (*Hansa-Tech*) como el que se observa en la figura 37. La cámara del electrodo se rellenó con un volumen de 1 ml de medio de respiración conteniendo una concentración de proteína mitocondrial de entre 0.15 a 0.20 mg/ml. Los componentes del medio de respiración, que se preparaba fresco cada día, variaron según las mitocondrias empleadas en los experimentos.

Los experimentos de mitocondrias de levaduras se realizaron a 20°C y se empleó un medio de respiración que contenía manitol 0.65 M, Tris-maleato 10 mM, EGTA 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, SAB (1, 0.625 o 0.1 mg/ml según el caso); pH 6.8. En algunas ocasiones, cuando fueron analizadas las respuestas mitocondriales a la adición de ácido retinoico se hizo otro medio de igual composición al anterior pero con SAB a 0.1 mg/ml y pH 7.3. Como sustrato respiratorio se empleó NADH de 1 a 3 mM.



Figura 37 Electrodo de oxígeno tipo "Clark" (Hansatech) empleado en los experimentos de respiración.

En el caso de las mitocondrias de tejido adiposo pardo, los experimentos se desarrollaron a una temperatura de 25°C con un medio de respiración que contenía KCl 50 mM, NaTES 10 mM, NaH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 2 mM, SAB de 0.1 a 1 mg/ml; pH 7.0. Los sustratos respiratorios empleados en estos experimentos fueron piruvato 2.5 mM y malato 2.5 mM.

3.- MEDIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS

- Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias y levaduras (base de nitrógeno, casaminoácidos, bactopectona, extracto de levaduras, etc.) se obtuvieron de *Difco*.



- Los enzimas de biología molecular fueron en su mayoría de *New England Biolabs*, excepto algunos como la fosfatasa SAP (*Amersham life sciences*), *DpnI*, *Pfu* y *PfuTurbo*[®] (*Stratagene*) y la *Ampli Taq* que fue de *Perkin-Elmer*.
- Los marcadores de peso molecular para ADN fueron, según el tamaño del ADN a analizar, de *Roche* ("DNA molecular weight marker XIV") o de *Promega* ("Lambda DNA/ *HindIII* Markers"), y el marcador de peso molecular de proteínas ("SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range") de *Bio-Rad*.
 - Los *kits* empleados provinieron de:
 - El *kit* "QIAquick Gel Extraction Kit Protocol" de *Quiagen*.
 - El *kit* "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" de *Amersham Pharmacia Biotech Inc.*
 - El *kit* "High Pure Plasmid Isolation Kit" de *Roche*.
 - El *kit* "CONCERT™ High Purity Plasmid Maxiprep System" de *GibcoBRL*[®].
 - Y finalmente, el *kit*: "Quick change site directed Mutagénesis Kit" de *Stratagene*.
 - Los tubos de congelación de los distintos *stocks* y clones de *Nalgene*.
 - La nitrocelulosa de *Bio-Rad*.
 - El anticuerpo anti-UCP2 de *Calbiochem* y el de cabra anti-Ig G de conejo conjugado con peroxidasa de *Bio-Rad*.
 - La citohelicasa de *BioSeptra*.
 - Los reactivos provinieron en su mayoría de *Sigma* y *Merck*, eligiendo siempre y en todos los casos, los productos de la mayor pureza disponible.





1.- REGULACIÓN FISIOLÓGICA DEL TRANSPORTE DE PROTONES MEDIADO POR LA UCP1

En el momento de empezar nuestro trabajo, la regulación fisiológica por ácidos grasos y nucleótidos de la UCP1 se encontraba bastante bien establecida. Por el contrario, las discrepancias a la hora de tratar de explicar su mecanismo de desacoplamiento eran notables. Como se dijo en el apartado de Introducción, existen principalmente dos teorías para tratar de explicar este mecanismo; una expuesta por Rial y Nicholls en 1989 y que sitúa a los ácidos grasos como cofactores de la UCP1 y otra, defendida por Garlid y colaboradores que afirman que el desacoplamiento es consecuencia de un ciclaje de los ácidos grasos a través de la membrana interna mitocondrial [Garlid, 1996]. Esta segunda hipótesis se basa en la observación de que la UCP1 es capaz de catalizar la translocación de un gran número de aniones [Jezek & Garlid, 1990] y propone que la UCP1 es la encargada de catalizar el regreso de la forma aniónica de los ácidos grasos hacia la cara citosólica de la membrana [Garlid *et al.*, 1998]. En este modelo los ácidos grasos son imprescindibles para la actividad transportadora de la UCP1 por lo que se infiere que, en su ausencia no debería haber desacoplamiento.

Sin embargo, hace 40 años ya se había observado que, para obtener mitocondrias de TAP acopladas, no sólo era necesario eliminar los ácidos grasos de las preparaciones, sino que también se requería añadir nucleótidos [revisión Rial & González-Barroso, 2001]. Garlid y colaboradores explicaron la observación de mitocondrias desacopladas en ausencia de nucleótidos como consecuencia de la existencia de ácidos grasos residuales que se unían a las mitocondrias durante el proceso de homogenización del tejido y que, posteriormente, como consecuencia de un proceso de histéresis, la albúmina era incapaz de retirarlos de la preparación. Para apoyar esta explicación, afirmaron que si el proceso de homogenización se realiza en presencia de 2 a 5 mg/ml de albúmina el desacoplamiento de las mitocondrias se reduce a niveles indetectables. Sin embargo no aportaron datos, y olvidan experimentos similares que datan de los años 60, en los cuales se llegaron a utilizar hasta 25 mg/ml de albúmina en el proceso de homogenización, sin conseguir un incremento significativo en el rendimiento de la fosforilación oxidativa [Smith & Horwitz, 1969].

1.1.- INFLUENCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS ENDÓGENOS EN LOS EXPERIMENTOS DE RESPIRACIÓN

Debido a que se debía resolver esta controversia, y a que actualmente hay disponible albúmina prácticamente libre de ácidos grasos (menos de un 0.02%), como punto de partida se diseñó un experimento para establecer *in vitro* la influencia real que pudiese tener la generación de los ácidos grasos endógenos en los resultados obtenidos en los distintos experimentos de respiración. Para ello, se aislaron mitocondrias de TAP por el método convencional según se describe en la sección 2.3 de Materiales y Métodos (sin SAB durante la homogenización y con 5 mg/ml de SAB durante el aislamiento) y acto seguido se analizó su comportamiento en el electrodo de oxígeno en un medio de respiración sin albúmina. Los resultados se recogen en la figura 38 y en ella se observa que la UCP1 muestra una gran actividad. Cuando las mitocondrias se aíslan y mantienen en presencia de SAB hasta su estudio en el electrodo de oxígeno, la incubación de estas

en un medio de respiración sin SAB hace que muestren una elevada velocidad de respiración ($321 \text{ nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), que puede inhibirse por GDP ($47 \text{ nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Sin embargo, la repetición del experimento después de tres horas a 40°C , muestra una disminución de la capacidad de inhibición de la respiración por GDP (de 175 a $125 \text{ nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Esta disminución del efecto inhibitor del GDP puede explicarse por un aumento de la concentración de los ácidos grasos en un medio de respiración sin albúmina (debido a la actividad de las fosfolipasas), ya que la adición de 1 mg/ml de SAB, retira rápidamente los ácidos grasos endógenos generados y restaura el control respiratorio a unos valores similares a los observados en el experimento anterior ($34 \text{ nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

La disminución del valor absoluto de las tasas de respiración iniciales mostradas en la figura 38, ha sido explicada como una consecuencia de la generación de lisoderivados tóxicos que inhiben la respiración y que pueden ser retirados por la albúmina [Nicholls, 1974b]. Por lo tanto, estos resultados indican que la generación de ácidos grasos en las preparaciones de mitocondrias es un factor determinante a la hora de analizar los resultados que se obtienen en estos experimentos. Sin embargo, la presencia de albúmina en el medio de incubación, o su adición a posteriori, controla el efecto desacoplante que ejercen sobre las mitocondrias.

1.2.- ELIMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ENDÓGENOS

Garlid y colaboradores afirman que sin albúmina en el medio de homogenización los ácidos grasos que se generan se unen con una afinidad elevada a la mitocondria que hace imposible su eliminación posterior [Garlid *et al.*, 1998]. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indicaban lo contrario, por lo que para comprobar estas afirmaciones se diseñó un aislamiento de mitocondrias en presencia de altas concentraciones de albúmina.

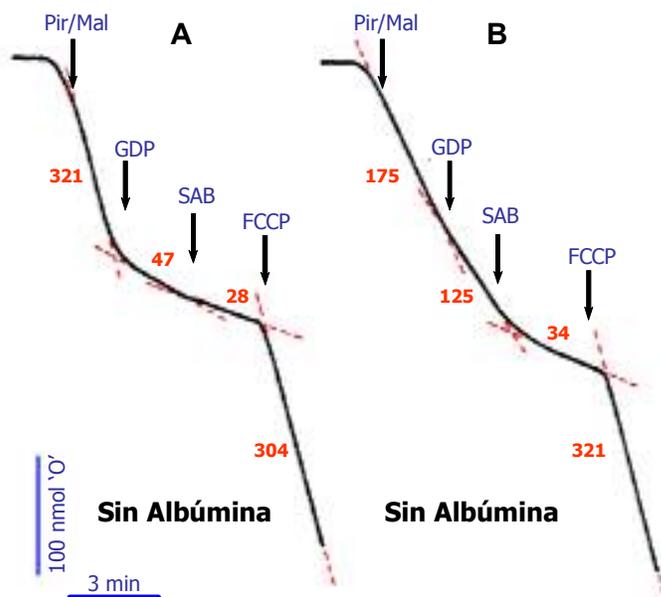


Figura 38 Experimento representativo de la respiración de mitocondrias de TAP en un electrodo de oxígeno en ausencia de SAB. Las mitocondrias se aislaron siguiendo el protocolo estándar. **(A)** Inmediatamente después de su aislamiento, las mitocondrias se pusieron en la cámara del electrodo en un medio de respiración que contenía 50 mM de KCl , 1 mM de EGTA , 2 mM de fosfato potásico, 2 mM de MgCl_2 , 10 mM de KTES , $\text{pH } 7.0$. La respiración se inicia con la adición de 5 mM de piruvato más 5 mM de malato. El GDP (3 mM), la SAB ($16 \text{ } \mu\text{M}$) y el FCCP ($10 \text{ } \mu\text{M}$) se añadieron donde indican las flechas. **(B)** Repetición del experimento anterior, tres horas después. Las figuras representan las tasas respiratorias en $\text{nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Así, se aislaron mitocondrias de TAP por el método convencional según se refleja en Materiales y Métodos (sección 2.3), pero dividiendo el TAP diseccionado en dos lotes (figura 39). Uno se resuspendió en el medio de homogenización estándar (sin albúmina), y el otro en el mismo medio suplementado con SAB a una concentración de 10 o 50 mg/ml. Tras la homogenización en sus respectivos tampones se continuó con el proceso de aislamiento resuspendiendo, bien en un medio KCl 50mM Tes 10 mM pH 7.0, o en uno modificado con 5 o 10 mg/ml de SAB para las mitocondrias homogenizadas con 50 mg/ml de SAB. Para minimizar la generación de ácidos grasos en las preparaciones debido a la actividad de las fosfolipasas, todos los experimentos se realizaron inmediatamente después del aislamiento de las mitocondrias y todos ellos se finalizaron en menos de una hora. Los resultados se recogen en la tabla 16 de la página siguiente. Un estudio detallado de ellos revela que incluso en el caso del aislamiento a las mayores concentraciones de albúmina (figura 40), las tasas de respiración iniciales se asemejan a las observadas en presencia del desacoplante inespecífico FCCP. Además, en todos los casos, la adición de GDP restaura rápidamente el control respiratorio provocando en las mitocondrias una disminución de la tasa de respiración de hasta diez veces.

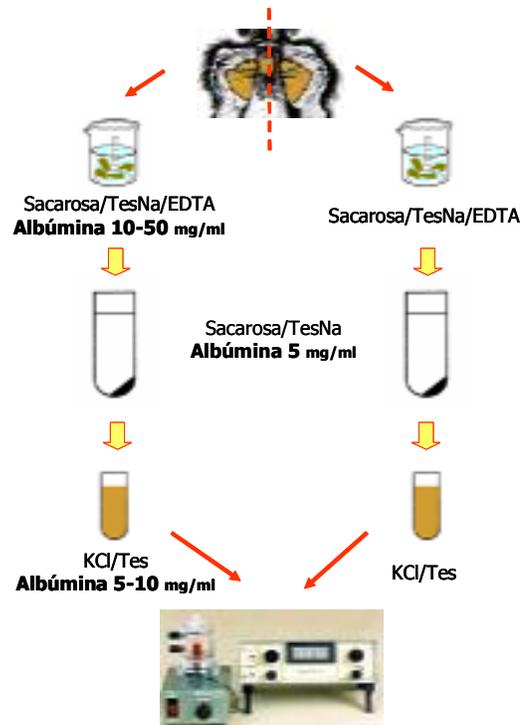


Figura 39 Esquema del proceso de aislamiento de mitocondrias de TAP realizado para comprobar la incidencia de la presencia de SAB en la generación de ácidos grasos en las preparaciones. Las condiciones de los experimentos se detallan en el texto.

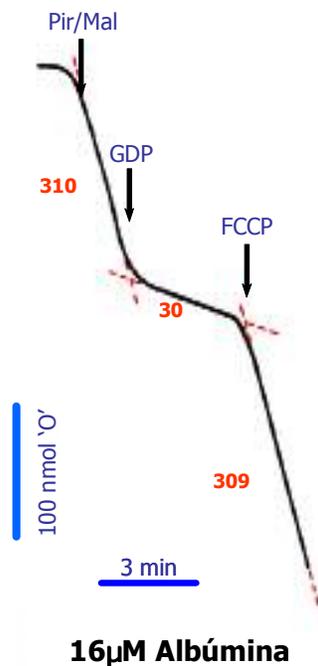


Figura 40 Experimento representativo de la respiración de mitocondrias de TAP en un electrodo de oxígeno en presencia de SAB. En este caso el TAP se homogenizó en presencia de SAB 50 mg/ml y las mitocondrias se aislaron en medio con 10 mg/ml de SAB. Inmediatamente después de su aislamiento, las mitocondrias se pusieron en la cámara del electrodo en un medio de respiración que contenía 50 mM de KCl, 1 mM de EGTA, 2 mM de fosfato potásico, 2mM de MgCl₂, 10 mM de KTes, pH 7.0 y SAB 1mg/ml. La respiración se inicia con la adición de 5mM de piruvato más 5 mM de malato. El GDP (3mM) y FCCP (10 μM) se añadieron donde indican las flechas. Las figuras representan las tasas respiratorias en nmoles O' min⁻¹ mg⁻¹.

A partir de estos datos, queda claro que el desacoplamiento observado en estas mitocondrias no es debido a la presencia de ácidos grasos en las preparaciones. La presencia de elevadas concentraciones de albúmina en el proceso de homogenización y aislamiento asegura su eliminación, y sin embargo, las mitocondrias de TAP no sólo se muestran desacopladas, sino que presentan una actividad respiratoria cercana a la máxima (FCCP). Estos resultados nos confirman que la UCP1 muestra una elevada actividad transportadora en ausencia de nucleótidos que no precisa de ácidos grasos.



1.3.- LA IMPORTANCIA DE LA ALBÚMINA EN LOS EXPERIMENTOS DE RESPIRACIÓN

Ya en 1976 se descubrió que las mitocondrias de TAP presentaban una sensibilidad a ácidos grasos mayor que las de otros tejidos [Heaton & Nicholls, 1976; Nicholls, 1979]. La acción de las fosfolipasas en las preparaciones genera concentraciones de ácidos grasos que son significativas y que incrementan el consumo de oxígeno en mitocondrias que expresan UCP1. Estos ácidos grasos afectan a las tasas respiratorias observadas y pueden retirarse del medio mediante la adición de SAB. Sin embargo, la mayoría de los experimentos realizados para estudiar sus efectos en mitocondrias son realizados en ausencia de albúmina o a concentraciones de lo más variado [revisión Rial *et al.*, 2004]. Era pues necesario determinar la posible influencia de la concentración de SAB en los resultados obtenidos por los distintos autores, y determinar si la alta afinidad de las membranas biológicas por los ácidos grasos hace poco relevante la concentración de SAB en los medios de estudio de las muestras. Para ello se aislaron mitocondrias de TAP siguiendo el protocolo convencional y se estudiaron sus capacidades respiratorias en un medio de respiración con distintas concentraciones de SAB (0.4, 1 y 2 mg/ml).

El análisis de los datos obtenidos tras realizar experimentos de respiración en el electrodo de oxígeno reveló una aparente ausencia de correlación entre el palmitato añadido y la tasa de respiración de las mitocondrias estudiadas en los distintos medios de respiración (figura 41.A). Sin embargo, la representación de estos datos teniendo en cuenta la relación molar palmitato:albúmina presente en los experimentos, mostró que sí que existía una relativa correlación con la tasa de respiración observada (figura 41.B). Esta relación aparente presentaba un ligero desplazamiento vertical de los datos que, probablemente, podría ser consecuencia de la presencia de los ácidos grasos endógenos que se habían generado en los distintos medios de incubación.

Para comprobar este punto, se estimaron las concentraciones de ácidos grasos endógenos presentes en cada uno de los medios. Este cálculo partió de la base de considerar que el flujo de protones en estas mitocondrias de TAP está determinado por dos componentes; un componente basal que es independiente de la UCP1 y otro que depende de ella. Este componente dependiente se asume que sigue una cinética tipo Michaelis-Menten en la cual los ácidos grasos unidos a la membrana son los que determinan la velocidad de respiración [Gonzalez-Barroso *et al.*, 1998].

La determinación de la cantidad de ácido graso unido se realizó tomando como base estudios anteriores. En 1986, Cunningham *et al.* mostraron que el cálculo de los ácidos grasos que se unen a las membranas mitocondriales, y que

Homogenización	No SAB	SAB 10 mg/ml	SAB 50 mg/ml
Aislamiento	5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
Respiración inicial	345±10	380±10	271±43
Respiración inhibida (GDP)	37.8±5.1	33.2±3.0	35.4±2.1
Respiración máxima (FCCP)	303±17	314±13	302±35

Tabla 16 Tasa de respiración de mitocondrias de TAP aisladas en presencia de cantidades variadas de SAB. Las medidas se realizaron en los 15 minutos siguientes al aislamiento. El medio de respiración en todos los casos contenía 1 mg/ml de SAB. Los valores representan la media±error estándar de tres a cinco experimentos independientes realizados por duplicado y están expresados en nmoles `O` consumidos por minuto y miligramo de proteína mitocondrial. La concentración empleada de GDP y FCCP fue de 3 mM y 10 µM respectivamente.

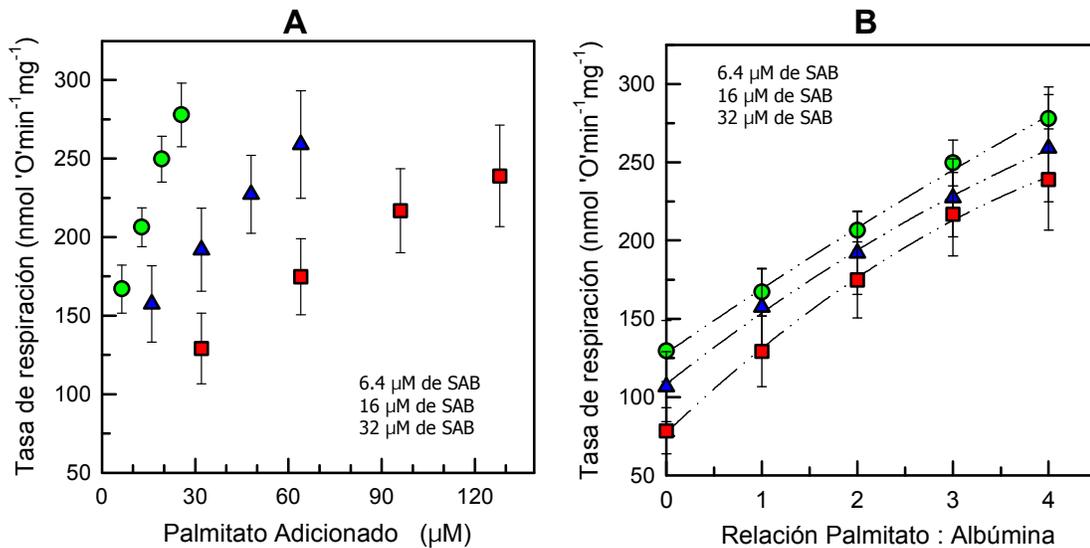


Figura 41 (A) Efecto de los ácidos grasos sobre la tasa de respiración de mitocondrias de TAP. (B) Relación Palmitato:SAB con la tasa de respiración de mitocondrias de TAP. La composición de los medios de respiración empleados en estos experimentos fue la misma que se describe en la figura 40 pero variando en cada caso la concentración de SAB en el medio. Los valores representados muestran los datos de al menos tres experimentos realizados por duplicado y van acompañados del error estándar medio de las muestras (ESM).

son los que realmente podrán actuar sobre la UCP1, se podía llevar a cabo teniendo en cuenta la relación molar existente entre la concentración ácidos grasos totales y la albúmina presente en las preparaciones. Años más tarde, en nuestro laboratorio se realizó una estimación de la concentración de palmitato unido a membrana según la relación molar palmitato:albúmina presente en el experimento [Gonzalez-Barroso *et al.*, 1998]. Este valor correlaciona linealmente con los valores de palmitato libre obtenidos a partir de las constantes de unión palmitato unido/libre determinadas por Richieri *et al.* [1993].

A partir de los datos de palmitato unido de Gonzalez-Barroso *et al.* [1998], y de los obtenidos a partir de nuestros experimentos (figura 41), para cada concentración de SAB se realizó un ajuste no lineal por mínimos cuadrados a la siguiente expresión:

$$V_{resp} = V_o + \frac{V_{max}([B] + [E])}{K_m + [B] + [E]}$$

Donde "V_{resp}" es la velocidad de la respiración, "V_o" la velocidad de respiración del estado 4 independiente de la UCP1, "V_{max}" la velocidad de respiración máxima dependiente de la UCP1, "K_m" la constante de afinidad del palmitato, "B" la concentración de palmitato unido a la membrana y "E" los ácidos grasos endógenos unidos. De este modo se estimaron los ácidos grasos endógenos presentes en los experimentos a distintas concentraciones de SAB. Los valores se muestran en la tabla

SAB ->	0.4 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
Vo	75.7	61	68
Vmax	259	228	218
Km	3.04	2.3	2.27
E	0.81	0.5	0.2
Relación E/SAB	0.82	0.53	0.22
Concentración E	5.25 μM	8.48 μM	7.04 μM

Tabla 17 Resultados obtenidos en la estimación de los distintos parámetros cinéticos que determinan la velocidad de respiración de mitocondrias que expresan UCP1. Ver texto para explicación.



17. El promedio de los valores obtenidos fue de $6.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$. Recalculando la relación molar ácidos grasos:albúmina observada en la figura 41.B teniendo en cuenta el valor hallado de los ácidos grasos endógenos, se obtiene una correlación exacta entre la relación molar ácido graso:albúmina y la tasa respiratoria (figura 42).

Todos estos datos revelan la utilidad de la albúmina para mantener una baja concentración de ácidos grasos libres. Esta concentración vendrá determinada, no por la relación ácido graso:proteína mitocondrial, sino por la relación ácido graso:albúmina presente en la preparación.

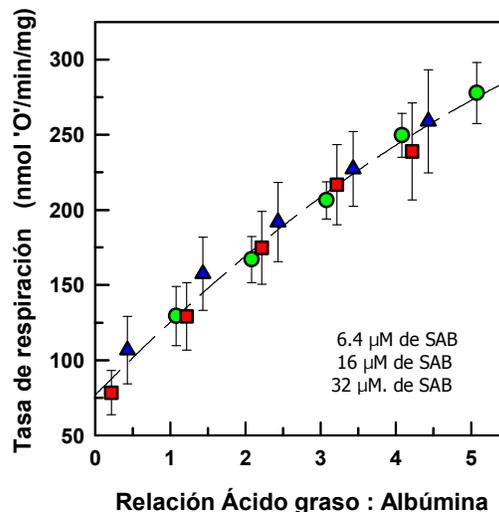


Figura 42 Correlación entre la tasa de respiración y la relación molar ácidos grasos:albúmina considerando la presencia de $6.9 \mu\text{M}$ de ácidos grasos endógenos. Los resultados representan la media (\pm e.s.m.) entre los valores de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada representa la regresión lineal ($r^2 = 0.987$), y las tasas respiratorias se expresan en $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

2.- ACTIVACIÓN DE LA UCP1 POR ÁCIDO RETINOICO Y OTROS ÁCIDOS ORGÁNICOS

La UCP1 presenta una especificidad relativamente baja hacia sus especies activadoras. Únicamente se requiere un esqueleto carbonado con un grupo carboxílico libre y una determinada solubilidad en medio lipídico para que un compuesto incremente la conductancia a protones mediada por la UCP1 [revisión Klingenberg & Huang, 1999]. Varios han sido los grupos que han realizado *screening* de compuestos activadores de la UCP1 [Rial *et al.*, 1983; Jezek *et al.*, 1997b] pero hasta el momento los resultados no habían establecido claramente los requerimientos estructurales de éstos. Por una parte, Garlid y colaboradores para explicar su teoría de ciclaje de los ácidos grasos, testaron su modelo comparando la activación de la UCP1 con un grupo de compuestos orgánicos cuya forma aniónica podía hacer *flip-flop* a través de la membrana. Afirmaron que todos los compuestos que habían mostrado actividad en sus experimentos eran capaces de permear a través de las bicapas lipídicas y postularon que la estructura del anillo de benceno o sustituyentes voluminosos hacia el final de una cadena carbonada impedían que compuestos como el ácido fenilhexanoico realizara *flip-flop* y que, por lo tanto, mostrara una capacidad activadora del transporte mediado por la UCP1 [Jezek *et al.*, 1997a, 1997b].

Por el contrario Klingenberg y su grupo, al estudiar el ácido fenilhexanoico o ácidos grasos (palmítico) con sustituyentes voluminosos y altamente hidrofílicos, como el glucopiranosido introducido en posición ω , sí observaron una estimulación de la actividad transportadora de la UCP1 a pesar de que estos compuestos deberían ser incapaces de hacer *flip-flop* [revisión Klingenberg & Huang, 1999]. De manera análoga en nuestro laboratorio se descubrió que el ácido *todo-trans* retinoico era un potente activador de la UCP1 expresada en mitocondrias de levaduras a pesar de que presentase en su fórmula un anillo voluminoso al final de la cadena carbonada (figura 43) [Rial *et al.*, 1999].

La mayoría de estos estudios habían sido realizados en liposomas con proteína reconstituida que, como se comentó la Introducción, se caracterizan por presentar un gradiente de potencial mucho menor que el observado en las mitocondrias. En éstas, durante la respiración, se genera un elevado potencial de membrana que puede determinar el comportamiento del sistema frente a los diversos compuestos.

Era pues necesario contrastar los resultados obtenidos por los distintos autores y comprobar si estos datos eran extrapolables a sistemas localizados dentro de un contexto más fisiológico como son las mitocondrias. Para ello se seleccionaron varios compuestos orgánicos que introducían en su fórmula anillos aromáticos (ver figura 43) y se estudiaron sus efectos sobre la UCP1 expresada en levaduras. Incluimos también en el estudio al ácido retinoico, que activa la transcripción del gen de la UCP1 de hámster y que en nuestro laboratorio se descubrió que activa la UCP1 de mitocondrias de TAP [Rial *et al.*, 1999]. Como control de los experimentos se empleó ácido palmítico y mitocondrias control. De este modo, se aislaron mitocondrias de levaduras por el método convencional descrito en la sección 2.2 de Material y Métodos y se analizó su comportamiento respiratorio en un medio de respiración estándar con SAB 1.6 μM (0.15 mg/ml de proteína; NADH 1mM; pH 6.8).

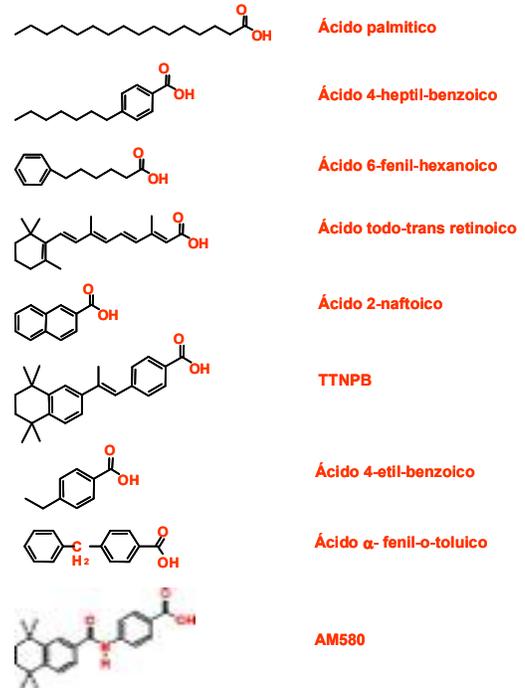


Figura 43 Fórmula molecular de los distintos compuestos seleccionados para su estudio en mitocondrias de TAP.

Los resultados se recogen en las figuras 44 y 45. En ellas se observa que el activador más potente de la UCP1 es el TTNPB (figura 44). Tan sólo se requiere una concentración de 4.8 μM para que se duplique la tasa respiratoria de las levaduras que expresan UCP1. Esta concentración no debe considerarse en valor absoluto y debe

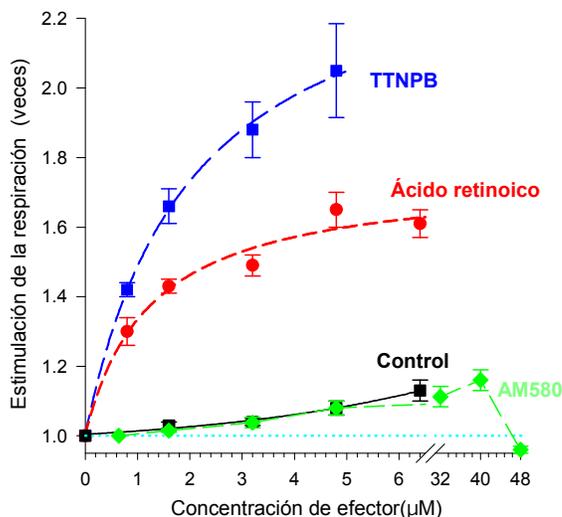


Figura 44 Efecto provocado en la respiración de mitocondrias que expresan UCP1, del *todo-trans* retinoico, del TTNPB y del AM580. El sustrato respiratorio fue NADH 1 mM y el medio contenía 1.6 μM de seroalbúmina a pH de 6.8. Los resultados se presentan como el incremento de la respiración en estado 4 provocado por los distintos compuestos. Los datos representan la media de tres a seis experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de las medidas.

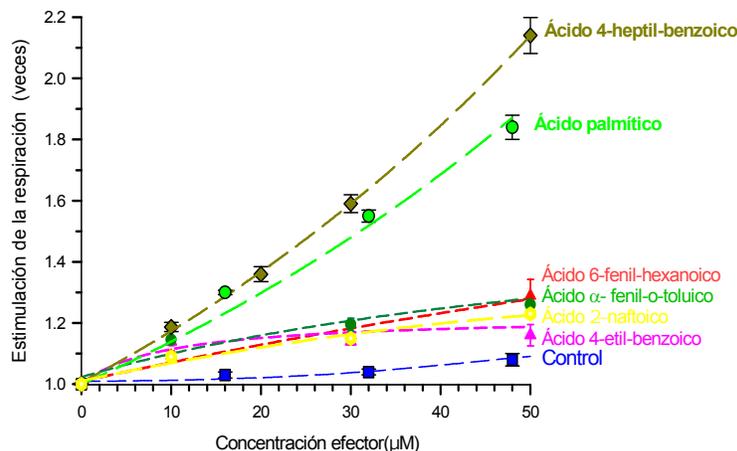
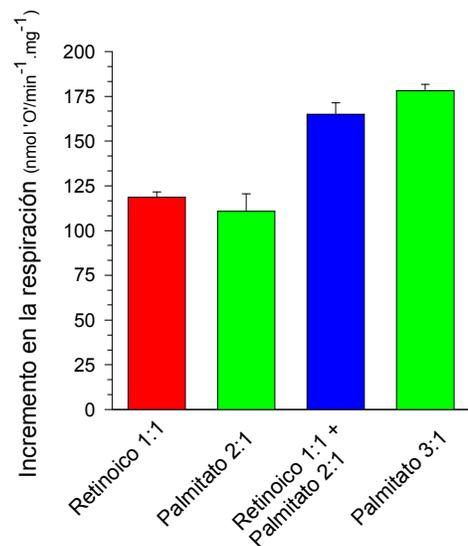


Figura 45 Efecto provocado sobre la respiración de mitocondrias de levaduras que expresan UCP1 del resto de los compuestos estudiados. Las condiciones de los experimentos fueron las mismas que las del experimento anterior con la diferencia que el medio de respiración en este caso contenía SAB 16μM. Al igual que en la gráfica anterior, los datos representan la media acompañada del ESM de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado.

entenderse más bien desde un punto de vista cualitativo, ya que del efector añadido únicamente una parte se unirá a la membrana mitocondrial y actuará sobre la UCP1 [Gonzalez-Barroso *et al.*, 1998]. En general se asume, que a las concentraciones empleadas en nuestros estudios, el valor absoluto de las concentraciones de efectores que actuarán sobre la UCP1 variaran siempre en un rango del orden de nanomolar, si bien una estimación más precisa desde el punto de vista cuantitativo, requeriría de un estudio detallado de su interacción con la albúmina. Es muy notable también el efecto activador que provocan tanto el ácido retinoico como el ácido 4-heptil benzoico y el ácido palmítico (figuras 44 y 45). En el caso de los dos últimos ácidos, la adición de 50 μM ocasiona un aumento de la tasa respiratoria por encima del 80% de la respiración basal. Mientras, el ácido retinoico tiene un efecto cuantitativamente menor, pero destaca la baja concentración requerida (6.4 μM) para obtener un incremento en la respiración basal del 61% (figura 44). Considerando que para clasificar un compuesto como activador de la UCP1, el efecto estimulador de la respiración debe situarse por encima del 20% de la respiración basal que se observa en las mitocondrias control, el estudio de los demás compuestos no reveló ningún efecto significativo sobre la respiración. Nuestros datos señalan que, al contrario de lo que afirmaron Klingenberg y colaboradores [Klingenberg & Huang, 1999] y de acuerdo con lo observado por Jezek y su grupo [Jezek *et al.*, 1997b], la UCP1 expresada en mitocondrias no es estimulada por el ácido 6-fenil hexanoico (figura 45). En las condiciones de experimentación utilizadas en este trabajo, tampoco se observa un efecto sobre las mitocondrias UCP1 del resto de los compuestos analizados, ya sea el ácido α-fenil-o-toluico, el ácido 4-etil benzoico o el retinoide AM580. Es más, en el caso de este último retinoide, se observa una inhibición de la respiración a partir de concentraciones superiores a 40 μM (figura 44).

Un estudio más detallado de los efectos de los ácidos palmítico y retinoico en las mitocondrias de levaduras que expresan UCP1, reveló que la cinética de activación de ambos compuestos era diferente. A partir de la figura 44 se observa que el ácido *trans* retinoico muestra una cinética de alta afinidad y rápida saturabilidad, mientras que en la activación por palmitato no se observa una saturación tan rápida y se alcanza un nivel de estimulación sensiblemente superior al obtenido con retinoico. Este efecto activador de la respiración de los retinoides, al igual que el provocado por el palmitato, se muestra inhibible por GDP por lo que en principio podría tener una relevancia fisiológica como vía alternativa a la estimulación de la UCP1 por ácidos grasos (ver sección 3.3.4 de Introducción).

A partir de estos resultados se puede observar que la incorporación de un anillo voluminoso u aromático en una posición alejada del grupo carboxilo no impide la activación del transporte de protones a través de la UCP1 ya que tanto el ácido *todo-trans* retinoico como el TTNPB lo poseen en su fórmula y son unos potentes activadores de la respiración. Estas observaciones no encajan con la teoría del ciclaje de los ácidos grasos propuesta por Garlid y colaboradores [Jezek *et al.*, 1997a] ya que, en principio, la estructura química de estos retinoides activadores no les permitiría hacer *flip-flop* a través de la membrana interna mitocondrial y no deberían activar la respiración en estas mitocondrias.



Relación molar efector : Albúmina

2.1.- SINERGISMO ENTRE LOS ÁCIDOS RETINOICO Y PALMÍTICO

Al observar el efecto desacoplante provocado por ambos reguladores de la UCP1, uno de los primeros aspectos que había que resolver era saber si el ácido retinoico y el ácido palmítico presentaban efectos sinérgicos o aditivos. Para ello se analizó el efecto de distintas adiciones conjuntas de retinoico y palmitato. Los resultados se recogen en la figura 46, a partir de la cual, se llegó a la conclusión de que tras la adición de retinoico 1.6 μM (o relación molar 1:1 respecto a la albúmina) y obtener una estimulación cercana a la máxima, la adición de palmitato 3.2 μM incrementaba la tasa de consumo de oxígeno de manera adicional, pero no hasta un nivel superior al que se obtendría tras una adición molarmente equivalente de palmitato (3:1). Lo mismo ocurría en el caso de estimular la mitocondrias con ácido palmítico 3.2 μM ; la adición de ácido retinoico a la preparación en concentraciones crecientes incrementaba la tasa de respiración, pero nunca a un nivel superior al obtenido con ácido palmítico 3:1 (figura 47).

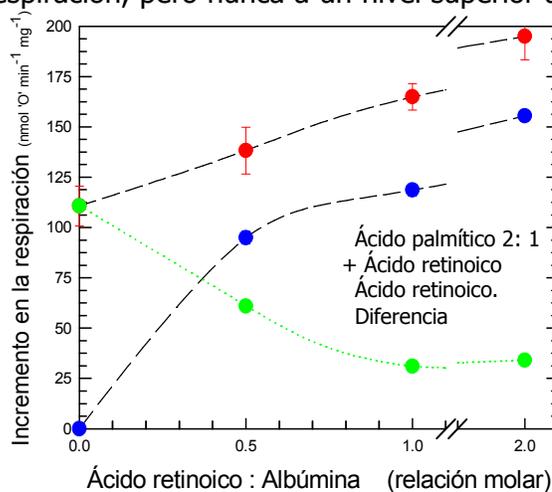


Figura 47 Estudio del efecto de adiciones sucesivas de ácido retinoico en presencia o ausencia de palmitato 3.2 μM en mitocondrias que expresan UCP1. Como en el experimento anterior el sustrato respiratorio fue NADH 1 mM y el medio de respiración se preparó con 1.6 μM de seroalbúmina a pH 6.8. Los resultados se presentan como el incremento de la respiración en estado 4 en función de la relación molar de ácido retinoico respecto de la seroalbúmina. Los datos representan la media \pm el error estándar medio (ESM) de tres a seis experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado.

Figura 46 Estudio del efecto de adiciones conjuntas de ácido palmítico y ácido retinoico sobre la tasa de respiración de mitocondrias de levaduras que expresan UCP1. El sustrato respiratorio era NADH 1 mM y el medio contenía 1.6 μM de seroalbúmina a un pH de 6.8. Los histogramas muestran el valor medio \pm ESM obtenido después de dos preparaciones independientes de mitocondrias en las cuales los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

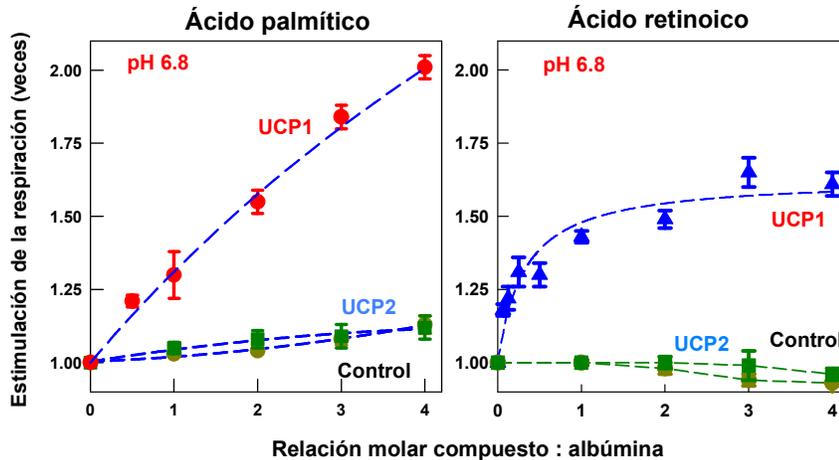


Figura 48 Efecto del ácido palmítico y ácido retinoico sobre la tasa de respiración mitocondrial de mitocondrias de levaduras que expresan UCP1, UCP2 y mitocondrias control. Los experimentos se realizaron de modo análogo a los previamente realizados, en un medio de respiración estándar a un pH de 6.8 y con una concentración de SAB de $1.6 \mu\text{M}$. Los datos mostrados representan la media de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado e incluyen los errores estándar de las medidas (ESM).

La representación en la misma figura de la diferencia de estimulación provocada por las distintas adiciones confirma que la estimulación por palmitato es cuantitativamente mayor a la provocada por el retinoico y que ambas estimulaciones nos son aditivas ni sinérgicas. Todos estos resultados señalan hacia un posible sitio de unión en la UCP1 común para ambos reguladores en el cual interaccionarán con una determinada afinidad provocando un mayor o menor efecto activador de la respiración.

2.2.- ACTIVACIÓN DE LA UCP2 POR ÁCIDO RETINOICO

El hecho que el ácido retinoico sea un potente activador tanto de la expresión de la UCP1 como de su actividad (ver Introducción), hizo que se estudiase su posible efecto sobre las nuevas proteínas homólogas a la UCP1 descubiertas recientemente [Rial *et al.*, 1999]. Para ello, se aislaron mitocondrias de levaduras control, UCP1 y UCP2, y se analizó el comportamiento de estas mitocondrias que incorporan UCP2 en presencia de los distintos reguladores fisiológicos descritos para la UCP1 (figuras 48 y 49). De este modo se observó que, bajo las mismas condiciones de experimentación, las mitocondrias UCP2 no se comportaban de la misma forma que las UCP1, ya que no respondían ni a palmitato ni eran inhibidas por nucleótidos. Los resultados obtenidos al estudiar el efecto del ácido palmítico y retinoico se muestran en la figura 48. La repetición del experimento a pH fisiológico (7.3) reveló una situación bastante distinta y se muestra en la figura 49 de la página siguiente. A este pH, mientras que el ácido palmítico seguía sin mostrar efecto sobre la tasa de respiración de mitocondrias de levaduras que expresaban el gen de la UCP2 (datos no mostrados), el ácido retinoico provocaba un aumento en la respiración en un nivel incluso superior al que se observaba en la UCP1 [Rial *et al.*, 1999]. Este descubrimiento es la base para el desarrollo de este trabajo ya que, teniendo en cuenta la alta homología de secuencia que existe entre la UCP1 y la UCP2, ambas muestran una regulación muy diferente.

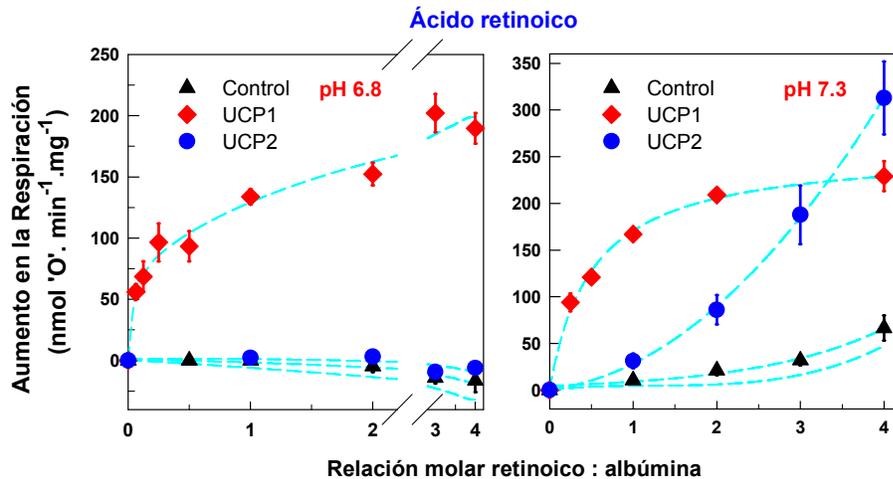


Figura 49 Efecto del ácido retinoico sobre la tasa de respiración mitocondrial de mitocondrias de levaduras que expresan UCP1, UCP2 y mitocondrias control a los distintos pHs. Las condiciones de los experimentos son las mismas que se muestran en la figura 48 salvo que el medio de respiración en la figura de la izquierda se ha preparado a pH 6.8 y la de la derecha a 7.3. Los datos mostrados son la media de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado y van acompañados del ESM.

3.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA UCP1

La mutagénesis dirigida es una técnica muy valiosa que nos permite estudiar las relaciones estructura función de las proteínas, y con ello, obtener información acerca de su posible mecanismo molecular. La ausencia de genes homólogos a las UCPs en el genoma de levaduras hizo que desde un primer momento estos microorganismos fueran escogidos como un sistema más fisiológico para el estudio de la actividad de la proteína. En nuestro laboratorio, esta aproximación se ha utilizado desde hace más de una década, y fruto de ello los resultados han sido numerosos [Arechaga *et al.*, 1993; González-Barroso *et al.*, 1996, 1997; 1998; 1999]. Por ello, al comienzo de este trabajo se decidió continuar con esta línea y se proyectó generar por mutagénesis dirigida mutantes del gen de la UCP1 que incorporaran residuos de la UCP2.

3.1.- ELECCIÓN DE LOS MUTANTES DE LA UCP1

Como se citó en el apartado de Introducción, los transportadores de membrana interna mitocondrial presentan una estructura tripartita (sección 2.2). En el caso de las UCPs, y según se observa en la figura 29, esta estructura se caracteriza por presentar un elevado grado de conservación de secuencias. A pesar de su alta homología, la expresión de la UCP1, UCP2 y UCP3 en mitocondrias de levaduras y el estudio de estas proteínas en sistemas reconstituidos han demostrado que su regulación es diferente. Para tratar de explicar este fenómeno, algunos autores trataron de establecer la importancia de los dominios de la UCP1 mediante la realización de quimeras formadas por una mezcla de dominios de la UCP1 y UCP3 [Hagen & Lowell, 2000]. Tras la generación de varios mutantes y su posterior estudio en levaduras, estos autores afirmaron que el segundo



dominio de la UCP1 es vital para que la proteína en presencia de palmitato muestre una tasa de transporte de H^+ acelerada y que el tercero es imprescindible para la regulación por nucleótidos de la proteína. Un año después, Chomiki *et al.* [2001] realizaron un trabajo similar intercambiando el tercer dominio de la UCP1 por el dominio homólogo correspondiente de la UCP2 y viceversa. Tras sobreexpresar estas proteínas en bacterias y reconstituirlas en liposomas, analizaron su comportamiento y observaron que la quimera generada con los dos primeros dominios de la UCP1 y el tercer dominio de la UCP2 (Q-112) mostraba tanto activación por ácidos grasos como regulación por nucleótidos. Por el contrario, la quimera inversa (Q-221) no presentaba ni activación por palmitato ni inhibición nucleótidos, pero mantenía su capacidad de activación por ácido retinoico. Un posterior estudio por RPE mostró que la exposición a ATP de la UCP1, UCP2 y las quimeras de ambas, provocaba cambios estructurales en todas ellas. Esto indicaba que los nucleótidos se unían, y les llevó a afirmar que tanto la UCP1 como la UCP2 presentan un sitio de unión al nucleótido en su extremo N-terminal, pero que la inhibición del transporte de H^+ mediada por estas proteínas sólo es observada cuando los dos primeros dominios de la UCP1 están presentes [Chomiki *et al.*, 2001].

En los comienzos de esta tesis, el diseño de mutantes no se enfocó hacia un dominio en concreto de la proteína, y se basó principalmente en el análisis de la conservación de los residuos tanto en la UCP1 como la UCP2. La elección de las mutaciones, se basó en el estudio las secuencias disponibles del gen de la UCP1 y de la UCP2 que, si bien presentaban una homología de secuencia del 59%, su expresión en levaduras originaba proteínas que mostraban un mecanismo de regulación muy distinto. Para obtener todas las secuencias se utilizó un sistema informático de consulta con los bancos de datos *SwissProt + PIR + GenBank + EMBL + PDT* [Altschul *et al.*, 1997]. Se extrajeron del servidor *Expasy* (<http://us.expasy.org/sprot/>) la secuencia de seis de las especies de UCP1 y UCP2 y se realizó un alineamiento de ellas con el programa informático *Multalin* [Corpet, F., 1988]. El resultado se refleja en la figura 50. Se analizaron y se trataron de seleccionar residuos susceptibles de ser importantes para la regulación de la UCP1, apoyándonos en su naturaleza química, grado de conservación y en su ausencia en las secuencias de las UCP2 (resaltados en verde en la figura 50). De este modo se diseñaron tanto mutantes puntuales como de varios aminoácidos que sustituyeron residuos conservados de la UCP1 por los residuos conservados de la UCP2 localizados en una posición homóloga.

Sin embargo, a partir de la publicación de los trabajos de Lowell, Warden y colaboradores, nuestro trabajo de mutagénesis se dirigió hacia el segundo dominio de la UCP1 ya que había mostrado ser importante para la actividad de la proteína [Hagen & Lowell, 2000; Chomiki *et al.*, 2001]. La primera de las cuestiones que era necesario contrastar era si lo observado por Lowell y su grupo con la UCP1 y UCP3 era extensible a quimeras generadas a partir de UCP1 y UCP2, y de ser así, intentar localizar los residuos o regiones del segundo dominio de la UCP1 que podían determinar su actividad. En todos los casos, para escoger las mutaciones en el segundo dominio de la UCP1 se tomaron como modelo las secuencias conservadas del segundo dominio de la UCP2 y se fueron introduciendo progresivamente hasta conseguir una quimera de la UCP1 con el segundo dominio completo de la UCP2.

El diseño de los mutantes se fue desarrollando según los resultados obtenidos en los sucesivos experimentos pero para una mayor comprensión, para la redacción



de esta memoria se muestran agrupados en cuatro grupos de quimeras. Fueron los siguientes:

- *Mutantes mayores.* Se incluyeron aquí los mutantes denominados Q-121 y Q212. Ambos mutantes se realizaron sobre la UCP1 y UCP2 respectivamente según el protocolo previamente descrito en el apartado de Materiales y Métodos (sección 1.6.2). Consistieron en el cambio completo del segundo dominio de ambas proteínas. En el caso de Q-121 se sustituyeron los aminoácidos 97-203 de la UCP1 por los aminoácidos 102-206 de la UCP2. (figura 51) y en Q-212 el cambio realizado fue el inverso, del aminoácido 104 al 211 de la UCP2 por los aminoácidos del 99 al 208 de la UCP1.
- *Mutantes del loop II.* Constituyen el grupo mayoritario de los mutantes de este trabajo. Se integran en este grupo los mutantes puntuales Glu134Asp y Met140Phe y los mutantes de varios residuos Lp2_A, Lp2_B, Lp2_C, Lp2_D, Lp2_AB, Lp2_ABC, Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE y Q-Lp2. Todos ellos fueron incorporando progresivamente mutaciones en el *loop* II de la UCP1 hasta convertirlo completamente en el *loop* II de la UCP2 (figura 52). Para comprobar alguno de los resultados obtenidos tras el estudio de estas quimeras, se diseñaron algunos mutantes sobre la UCP2. Al igual que para la UCP1, las mutaciones se escogieron seleccionando residuos conservados en la UCP2 y se sustituyeron por sus correspondientes en la UCP1. De este modo, aparte de la quimera mayor Q-212, se realizaron tres quimeras, dos puntuales como U2Asp138Glu y U2Phe144Leu y otra que incluía ambas mutaciones y que se denominó U2Lp2_A. Todas ellas se situaron en la región del *loop* II de la proteína (figura 55).
- *Mutantes transmembrana.* Las quimeras incluidas en este grupo se diseñaron para cambiar progresivamente los segmentos transmembrana del segundo dominio de la UCP1 hasta convertirlos en los segmentos transmembrana de la UCP2. Aquí se incluyeron mutantes del segmento transmembrana III como Gly124Ala y Gly130Ala (puntuales) o Hx3_A y Q-Hx3 (varios aminoácidos), y del segmento IV como Q-Hx4. Las mutaciones introducidas por todos ellos se reunieron en la quimera Q-Hx3/Hx4 de modo que esta proteína constituye una UCP1 quimera con los segmentos transmembrana III y IV de la UCP2 (figura 53).
- *Mutantes estructurales y quimeras de los dominios I y III de la UCP1.* Fueron las primeras quimeras que se generaron. Dentro de este grupo se incluyeron proteínas quimera UCP1/UCP2 y otros mutantes puntuales como Gly175Leu (*loop* II, figura 52), Pro178Val (transmembrana IV, figura 53) Thr259Arg o Ala264Arg (*loop* III), que se realizaron para terminar una serie de experimentos de mutagénesis iniciados previamente en nuestro laboratorio [González-Barroso *et al.*, 1999]. Al igual que en los grupos anteriores, las quimeras se diseñaron atendiendo al análisis de las secuencias mostradas en la figura 50, y siempre sustituyeron regiones conservadas en los dominios I o III de la UCP1, por las secuencias homólogas de la UCP2. De este modo, en el primer tercio de la UCP1 se

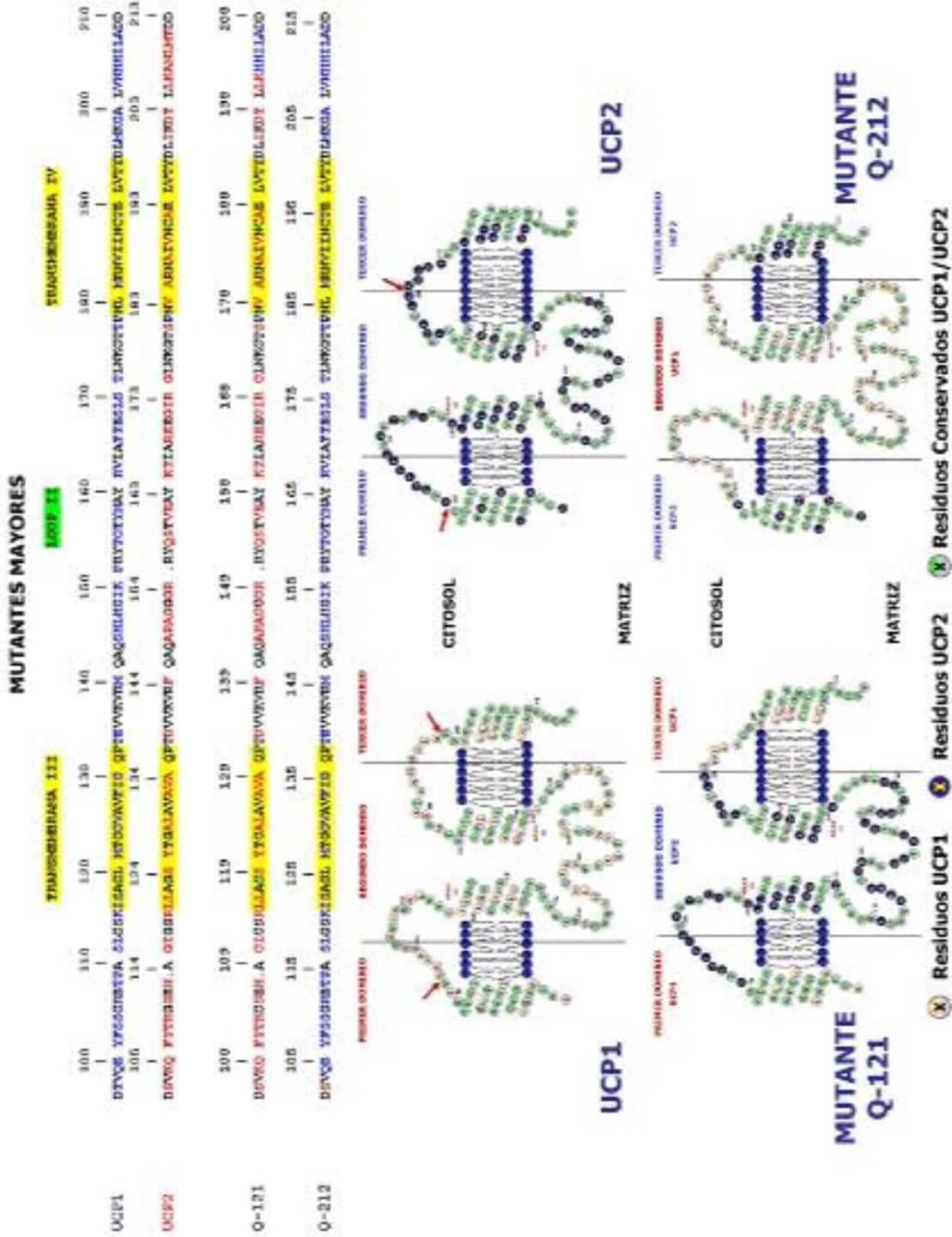


Figura 51. Esquema y secuencias de las quimeras mayores diseñadas en este trabajo para determinar la importancia del segundo dominio de la UCP1. En la parte superior se representan en azul las secuencias de la UCP1, en rojo las secuencias de la UCP2 y en negro las que se conservan en ambas proteínas. En el esquema inferior las flechas en rojo indican las regiones donde tiene lugar la transición de la secuencia de una proteína a la otra (ver texto).

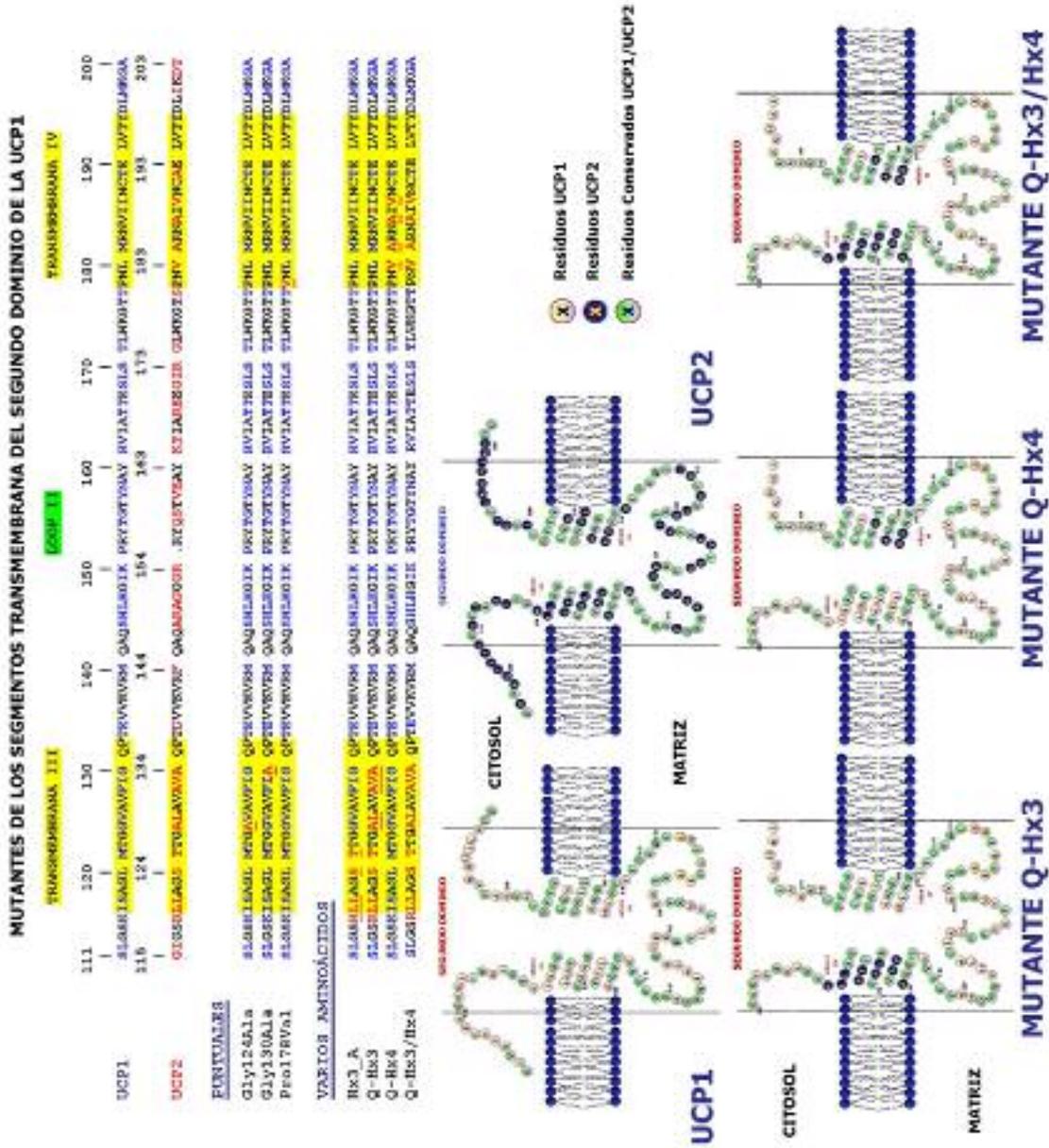


Figura 53 Mutantes realizados en los segmentos transmembrana III y IV de la UCP1. Se remarcan en amarillo las regiones transmembrana predichas. Se señalan en azul las secuencias características de la UCP1, en rojo las de la UCP2 y en negro las conservadas en ambas. Al igual que en la anterior figura, en las secuencias quimera, los caracteres en rojo reflejan los residuos mutados y los subrayados los residuos específicamente introducidos en ese mutante progresivo. En el esquema de la parte inferior se representan las quimeras completas de los segmentos transmembrana.

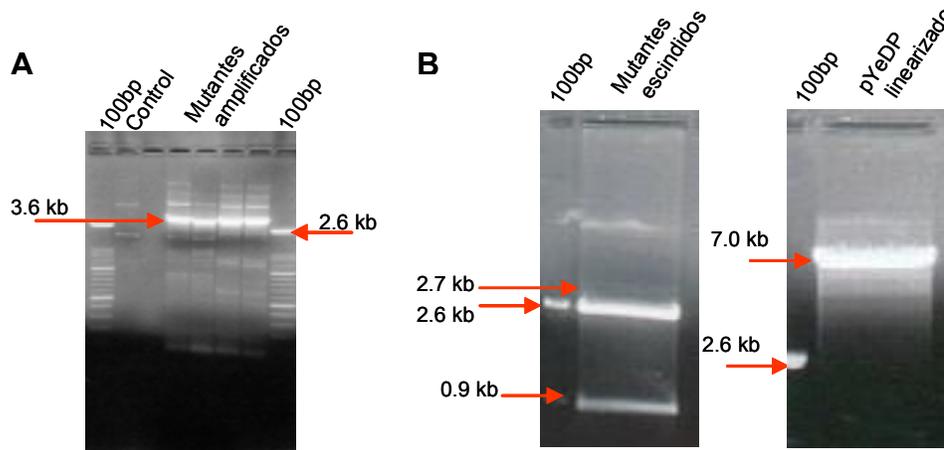


Figura 54 (A) Chequeo de la amplificación del ADN tras la PCR realizada con pUC19-UCP1 y los cebadores mutagénicos. Como control se empleó una muestra de molde con una concentración de ADN equivalente a la añadida a la mezcla de PCR. **(B) Chequeo de la escisión del ADNc mutado del vector de clonación y linealización del vector de expresión.** Posteriormente se cortaron las bandas de 0.9 y 7 kb y se purificaron.

generó la quimera puntual Pro78Val (región de la hélice α transmembranal II) y las de varios aminoácidos Lp1_A y Lp1_B (*loop*). Finalmente se diseñaron Lp1_A/Lp2_C, que reunió las mutaciones introducidas en las quimeras Lp2_C del *loop* II y Lp1_A, y Lp3_A, que se diseñó sobre el *loop* del tercer tercio de la proteína (figura 55).

3.2.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para la generación de todos los mutantes se emplearon las diversas técnicas que se describen en Materiales y Métodos. Según el molde empleado se utilizaron unas u otras técnicas por lo que el proceso de mutagénesis varió ligeramente.

3.2.1.- MUTANTES REALIZADOS A PARTIR DE PUC19

A partir del vector de expresión pUC19 con el ADNc de la UCP1 se realizaron varias quimeras puntuales como Pro78Val, Ala264Arg y Thr259Arg. El mismo molde se empleó también para la construcción de algunas de las quimeras de varios aminoácidos de este trabajo, entre las que se encuentran Lp2_A, Lp2_B, Lp1_B y Lp3_A. Lp2_AB se incluye también en este grupo, pero tiene la particularidad de que el molde usado en este caso, en vez de pUC19-UCP1, fue pUC19-Lp2_A. El proceso de mutagénesis se describe detalladamente en Material y Métodos (sección 1.6.1.1). En todos los casos, la primera de las comprobaciones necesarias tras la PCR con los cebadores mutagénicos, fue chequear la amplificación del ADN en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. Una vez observada la presencia de una banda amplificada de 3.6 kb como se observa en la figura 54.A y tras secuenciar y amplificar la muestra en *E.coli* XL1-Blue, se digirió con *Eco*RI tanto pYeDP vacío como el vector de clonación con las formas mutadas de la UCP1. Se separaron las digestiones y se purificaron las bandas de 0.9 kb y 7 kb que correspondían al ADNc mutante y al vector de expresión linealizado. A continuación se unieron los fragmentos purificados y se introdujo el vector de expresión con el ADNc mutante

MUTANTES DE OTRAS REGIONES DE LA UCP1												
	80	80	75	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
UCP1
UCP2
VARIANTALES												
UCP1Val
VARIOS AMINOACIDOS												
Ip1_A
Ip1_B
Ip1_A/Ip1_C
	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210
	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210
UCP1
UCP2
VARIANTALES												
TAL259AArg
ALAF4Arg
VARIOS AMINOACIDOS												
Ip3_A
MUTANTES DEL SEGUNDO DOMINIO DE LA UCP2												
	109	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
	109	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
UCP1
UCP2
VARIANTALES												
U2Phe144Ieu
VARIOS AMINOACIDOS												
U2Ip3_A

Figura 55 Mutantes realizados en los dominios I y III de la UCP1 y en el dominio II de la UCP2. Se remarcan en amarillo las regiones transmembrana predichas. Se representan con caracteres en azul las secuencias características de la UCP1, en rojo las de la UCP2 y en negro las conservadas en ambas. Los caracteres en rojo o en azul que presenta cada quimera indican los residuos característicos de la UCP2 o UCP1 que incorpora cada una de ellas. En las quimeras progresivas se subrayan en rojo o azul las mutaciones incorporadas en la creación de ese mutante.



generado en TG1 α para amplificar las muestras. Se incubaron en medio con antibiótico y, de los clones crecidos, se seleccionaron varios para analizar el patrón de migración de su contenido celular tras un proceso de lisis ácida (figura 56).

Tras seleccionar los clones que migraban en gel de agarosa al 0.7% de modo similar a pYeDP-UCP1, se aisló su ADN plasmídico y se digirió con *Nco*I. Este enzima presenta dianas únicas en pYeDP y en la UCP1 (o en los mutantes) por lo que, según la orientación en que el ADNc mutante se hubiera insertado, la digestión generaba dos posibles patrones de bandas (figura 57):

- *Orientación correcta o codificante:* Una banda de 6606 pb y otra de 1336 pb.
- *Orientación incorrecta o no codificante:* Según el número de fragmentos insertados y la orientación en que lo hiciesen aparecían bandas variadas, pero las más usuales eran de 2199 y 5743 (inserción de un fragmento en orientación invertida).

Finalmente los plásmidos que originaban la banda de 1.3 Kb se seleccionaron (figura 57), secuenciaron, y se introdujeron en W303 por electroporación como se describe en Materiales y Métodos (sección 1.5.1).

3.2.2.- MUTANTES REALIZADOS A PARTIR DE pYeDP

Al comenzar este trabajo se pensó que el realizar la mutagénesis directamente a partir del vector de expresión pYeDP era un proceso bastante arriesgado. El tamaño del vector con la UCP1 inserta era bastante considerable (casi 8 kb) por lo que, a pesar que el enzima *Pfu*Turbo[®] aseguraba introducir un número muy bajo de mutaciones al azar, se desechó esta metodología. Sin embargo, las numerosas manipulaciones necesarias para conseguir los mutantes a partir de pUC19 también podían constituir una importante fuente de mutaciones. Por ello, después de realizar nuestros primeros mutantes, se reconsideró la situación y se decidió comprobar si era

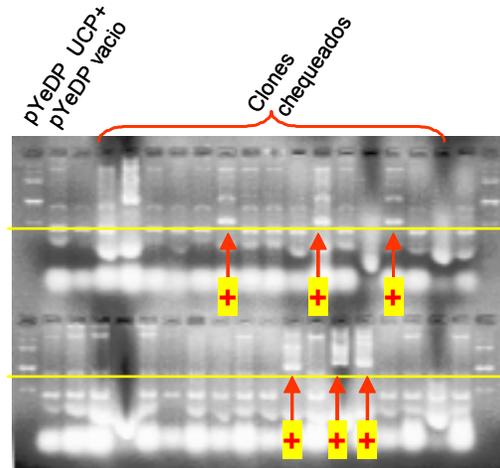


Figura 56 Chequeo de la migración del ADN total de los clones seleccionados tras lisis ácida del contenido celular bacteriano. Por comparación con el patrón de migración de pYeDP-UCP1, se señalan con flechas rojas los clones seleccionados como probables positivos

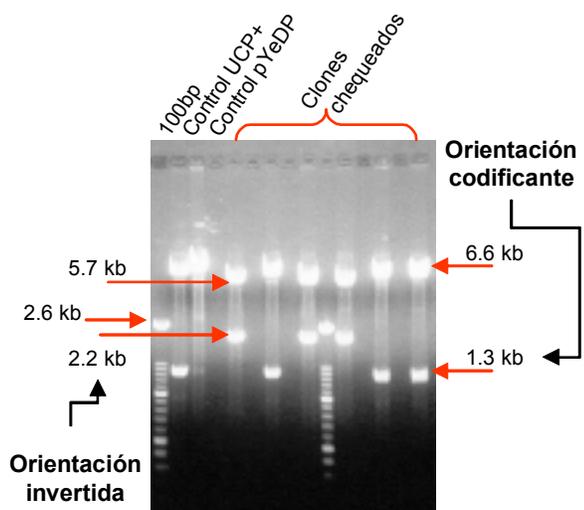


Figura 57 Chequeo de la orientación de inserción del ADNc mutado en el vector de expresión. Los clones que tras la digestión con *Nco*I originaban una banda de 1.3 kb eran considerados positivos y seleccionados para la posterior transformación de levaduras.

viable adoptar esta metodología. Así pues, se tomó como molde pYeDP-UCP1 y se comprobó la efectividad del proceso con uno de los nuevos mutantes diseñados. Tras un proceso de mutagénesis con algunas modificaciones como se describe en Materiales y Métodos (sección 1.6.1.2) se chequeó la amplificación del ADN mutado y se comprobó que, si bien se observa una menor amplificación debido a una mayor longitud del molde a replicar, el ADN mostraba una concentración suficiente como para continuar el proceso (figura 58). De este modo, tras transformar *E. coli* XL1-Blue y amplificar el vector, se llevó la muestra a secuenciar y se comprobó tanto que la mutación se había incorporado como que el resto del gen de la UCP1 se encontraba inalterado. La posterior introducción en levaduras mediante transformación con acetato de litio nos permitió crecer levaduras y analizar la expresión de la proteína en las mitocondrias. Los resultados obtenidos reflejaron unos niveles de expresión similares a los de las quimeras preparadas a partir de pUC19, por lo que consideramos que el proceso era válido.

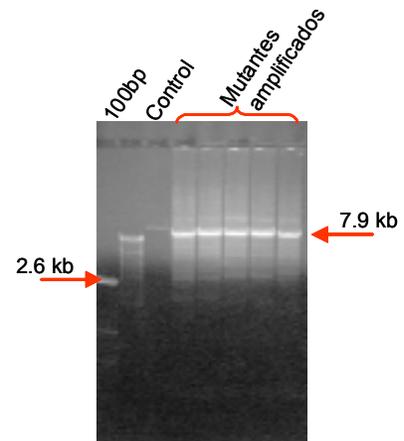


Figura 58 Chequeo de la amplificación del ADN tras la PCR realizada con pYeDP-UCP1 y los cebadores mutagénicos. Como control se empleó una muestra de ADNc molde (UCP1) equivalente a la cantidad de ADN antes de amplificar.

A partir de entonces, con esta metodología se realizaron la mayoría de las quimeras generadas en este trabajo. En un gran número de ellos el molde empleado fue pYeDP-UCP1, salvo en el caso de U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A donde se partió del ADNc de la UCP2 inserto en pYeDP. Dentro de las quimeras que emplearon como molde pYeDP-UCP1 hay que citar mutantes puntuales como Gly124Ala, Gly130Ala, Pro178Val, Gly175Leu, Glu134Asp o Met140Phe y mutantes múltiples como Hx3_A, Q-Hx4, Lp2_A, Lp2_B o Lp2_C. El resto de las quimeras realizadas también utilizaron pYeDP como molde, pero con el ADNc de la quimera de la cual derivan inserto (ver tabla 9 de Materiales y Métodos).

3.2.3.- CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES Q-121 Y Q-212

En el año 2000 Lowell y colaboradores afirmaron que la segunda repetición de la UCP1 era la responsable de la activación del transporte de H⁺ por palmitato. Para llegar a esta conclusión realizaron una quimera de la UCP3 que tenía sustituido su segundo dominio por el dominio homólogo correspondiente de la UCP1 y la introdujeron en levaduras. El estudio de estas mitocondrias en un electrodo de oxígeno mostró que la adición de palmitato regeneraba en la proteína quimera un incremento en la respiración que no se observaba en las mitocondrias que expresaban UCP3. Este descubrimiento nos pareció muy interesante por lo que decidimos investigar si ocurría lo mismo al introducir el segundo dominio de la UCP1 en la UCP2, o si al realizar el proceso inverso, la UCP1 se convertía en una proteína carente de regulación.

Para la construcción de estas quimeras, lo primero que se hizo fue estudiar la secuencia de ambos genes para comprobar si los enzimas de restricción *Pf*MI y *Th*II

presentaban dianas en los genes de la UCP1 y la UCP2 respectivamente. Comprobado que así es, se diseñaron los cebadores correspondientes para crear una diana *ThdIII* en la UCP1 y una *PfMI* en la UCP2 (sección 1.6.2 de Materiales y Métodos). Seguidamente, se realizó la mutagénesis de pYeDP-UCP1 y pYeDP-UCP2 con el *kit* de mutagénesis y se chequeó la correcta amplificación (figura 58). A continuación, los ADNc quimeras se introdujeron en *E. coli* XL1-Blue y posteriormente en *E. coli* SCS110. Se generó así un ADNc no metilado que se digirió de modo secuencial con *PfMI* (sensible a la metilación *dcm*) y *ThdIII*. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se purificaron para posteriormente unir el dominio central de pYeDP-UCP2 (fragmento D) con los dominios I y III de la UCP1 (fragmento A) y generar Q-121. Los fragmentos B (dominio II de la UCP1) y C (dominios I y III de la UCP2) se unieron del mismo modo y dieron lugar a la otra de las quimeras mayores que se denominó Q-212 (figura 59).

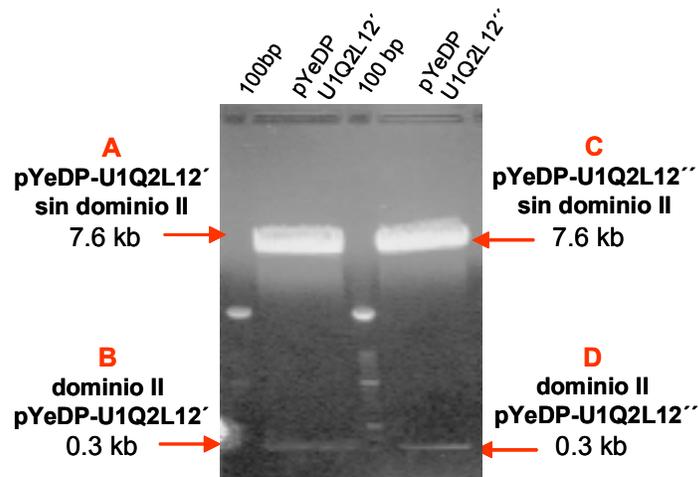


Figura 59 Generación de los mutantes Q-121 y Q-212. Como paso intermedio se generaron dos plásmidos quimera U1Q2L12' y U1Q2L12'' que se digirieron con *PfF1* y *PfMI*. Los productos de esta digestión son los cuatro fragmentos de la fotografía. La unión de los fragmentos A y D generó el mutante Q-121 y la de los fragmentos B y C el mutante Q-212.

3.2.4.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE Lp1_A

El análisis de las secuencias de la UCP1 y la UCP2 de la figura 50 nos reveló que en las UCP2 descritas existía una región del primer *loop* (SQGLVVRTAA) que se conservaba en varias de las especies, mientras que en las UCP1 se mostraba ausente (ver figura 50). Para comprobar si esta región podía ser importante en la regulación de la UCP1 se decidió generar un mutante de la UCP1 que incluyese esta región.

Debido a la complejidad de la mutación a generar (cambio de 9 aminoácidos), no se pudo emplear el *kit* de *Stratagene* por lo que se tuvo que diseñar una estrategia de mutagénesis. Esta estrategia se basó en la descrita por Di Donato *et al.* [1993] y el protocolo se describe detalladamente en Materiales y Métodos (sección 1.6.3). Para esquematizar el proceso se muestra la figura 60, que describe desde la amplificación y generación del fragmento quimera F1, hasta la de obtención del vector de clonación intermedio pUC19-F1. Todos los pasos sucesivos y comprobaciones realizadas para obtener la quimera Lp1_A inserta en pUC19 se muestran gráficamente en la figura 61 de la página 114. Llegados a este punto se procedió de forma análoga a lo descrito en el punto 3.2.1: se escindió Lp1_A de pUC19, se introdujo en pYeDP, se seleccionaron los clones positivos por digestión con *NcoI* y, tras secuenciar, pYeDP-Lp1_A se introdujo en levaduras por electroporación.

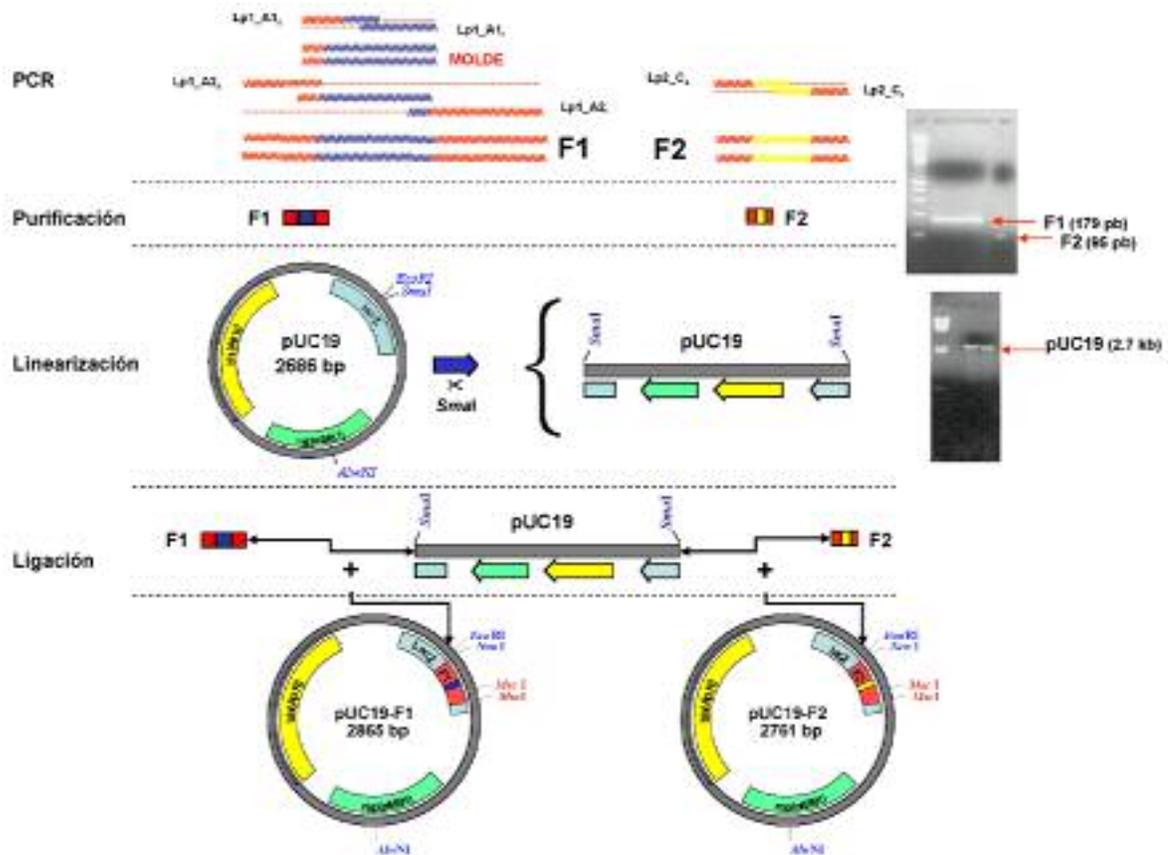


Figura 60 Esquema de la generación y chequeos de los vectores intermedios pUC19-F1 y pUC19-F2. Estos vectores constituyen un paso intermedio para la generación de Lp1_A y Lp2_C respectivamente.

3.2.5.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE Lp2_C

En 1998 Klingenberg y colaboradores afirmaron que el transporte de H⁺ mediado por la UCP1 dependía del par de histidinas 145 y 147 que se localizan en la región del *loop* II de la proteína [Bienengraeber *et al.*, 1998]. La ausencia de ambos residuos en la UCP2 y la presencia de únicamente la histidina 145 en la UCP3 hizo que estos autores afirmasen que estas proteínas no transportaban H⁺. Estos llamativos resultados se obtuvieron a partir de UCP1 reconstituida en liposomas por lo que era necesario contrastarlos en un sistema de estudio más fisiológico como son las mitocondrias de levaduras.

Para ello, se generó una quimera de la UCP1 que sustituyó la región del *loop* de las UCP1 donde se localizaban ambas histidinas (SHLHGIKP) por la región homóloga correspondiente de la UCP2 (ARAGGRR) y que, curiosamente, también se mostraba muy conservada (figura 50). Esta quimera, en total cambió 7 de los aminoácidos del *loop* II de la UCP1 por lo que para realizarla tampoco se pudo emplear el *kit* de mutagénesis. Para

realizar esta quimera se diseñó un cebador que contenía la secuencia de la región mutada y se amplificó por PCR. Se generó así un fragmento de ADN (F2) que se introdujo en pUC19 para originar un vector intermedio que se denominó pUC19-F2 (figura 60). Una vez obtenido este vector, se desarrolló el protocolo descrito en la sección 1.6.4 de Materiales y Métodos y que se esquematiza en la figura 63. Se obtuvo de esta forma la quimera Lp2_C inserta en pUC19 que posteriormente se introdujo en pYeDP mediante un proceso idéntico al descrito en la sección 3.2.1. Finalmente pYeDP_Lp2_C se introdujo en levaduras por electroporación.

3.2.6.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE Lp1_A/Lp2_C

Esta quimera reunió las mutaciones introducidas en Lp1_A y Lp2_C. Se construyó a partir del ADNc de ambas quimeras inserto en pUC19 (pUC19-Lp1_A y pUC19-Lp2_C). Tras la doble digestión del ADNc de ambos plásmidos con los enzimas de restricción *Ava*NI y *Bsm*I, se generaron cuatro fragmentos de ADN de diferente tamaño que se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Tras visualizar con bromuro de etidio al 1% las bandas generadas, se seleccionaron las de 2.3 y 1.3 kb que provenían de de Lp1_A y Lp2_C respectivamente (figura 62). A continuación se unieron con ADN ligasa de T4 y se originó de este modo un plásmido quimera con Lp1_A/Lp2_C inserto. El protocolo seguido se describe detalladamente en Materiales y Métodos (sección 1.6.5) y el esquema del proceso se muestra en la figura 62. Con el vector de clonación quimera generado (pUC19-Lp1_A/Lp2_C), se realizaron las mismas comprobaciones y chequeos descritos en el punto 3.2.1. Se obtuvo así pYeDP-Lp1_A/Lp2_C, que se introdujo en levaduras mediante electroporación.

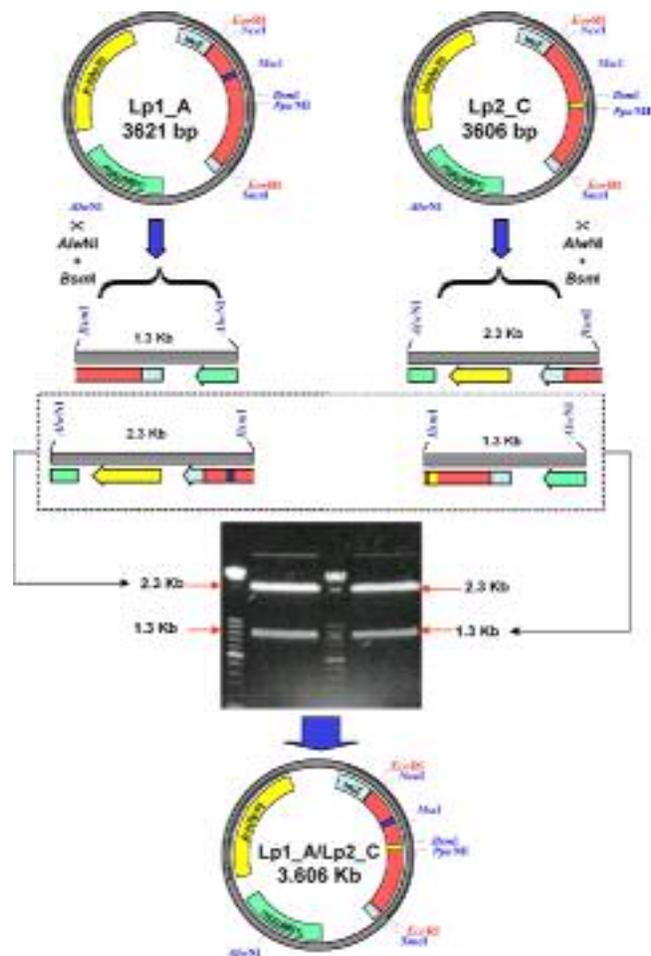


Figura 62 Construcción de pUC19-Lp1_A/Lp2_C. Se señalan los enzimas empleados en las distintas etapas así como las bandas generadas y escogidas para generar el ADNc quimera. Las digestiones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio al 1%. Se adjunta la imagen de los fragmentos obtenidos tras la separación.

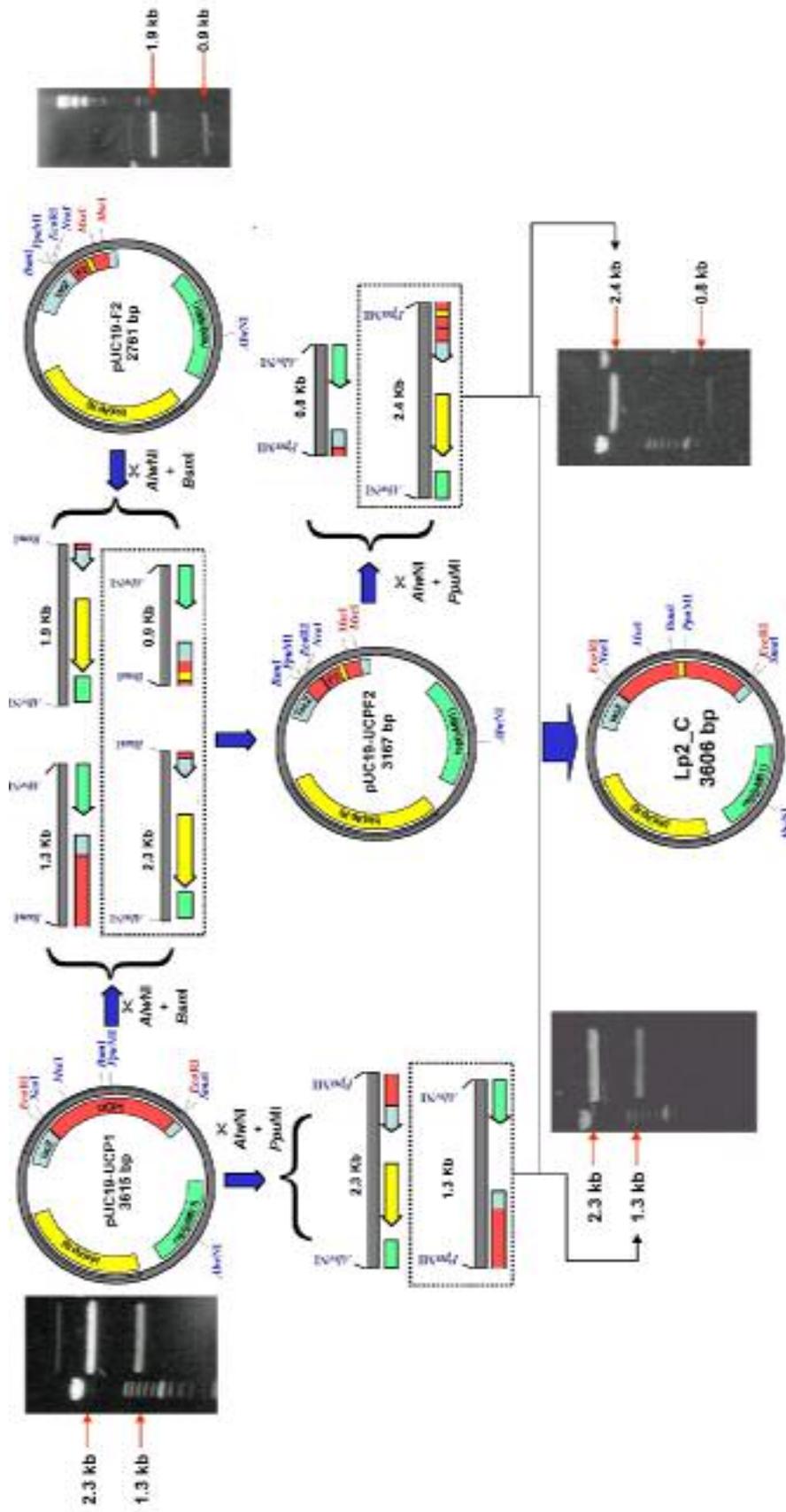


Figura 63 Esquema de la construcción de pUC19-Lp2_C. Se señalan los enzimas de restricción empleados en las digestiones así como los fragmentos generados y seleccionados para la realización de la quimera. Adjuntas se muestran las imágenes de los fragmentos obtenidos tras las distintas electroforesis.

4.- ESTUDIOS *in situ* CON LEVADURAS

4.1.- ESTANDARIZACIÓN DE VALORES DE LAS CEPAS REFERENCIA

4.1.1.- COMPORTAMIENTO BAJO CONDICIONES RESPIRATORIAS DE LAS MITOCONDRIAS REFERENCIA

En nuestro laboratorio, durante mucho tiempo se han estudiado los parámetros bioenergéticos que caracterizan la respiración mitocondrial de levaduras control, UCP1 y UCP2, y se ha demostrado que presentan características que permiten diferenciarlas. Los distintos valores de los parámetros bioenergéticos se recogen en la tabla 18 y se representan en las figuras 64, 65 y 66.

El denominado estado 4 de la respiración mitocondrial es la respiración basal que se observa tras la adición del sustrato NADH a las mitocondrias estudiadas (figura 64). Al comparar los estados 4 de las mitocondrias referencia se observan las primeras diferencias. Las mitocondrias UCP1 presentan un mayor valor de consumo de oxígeno en estado 4 (217 ± 5 nmoles $\text{O}'\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) que las mitocondrias UCP2 (156 ± 6 nmoles $\text{O}'\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), y éstas a su vez uno mayor que las mitocondrias control (136 ± 5 nmoles $\text{O}'\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

La respiración en presencia de un desacoplante inespecífico como el FCCP (carbonilcianuro *p*-trifluorometoxifenilhidrazona), va a producir un colapso en el potencial de membrana y, por tanto, nos va a dar una idea de la capacidad respiratoria máxima de estas mitocondrias (figura 64). La relación FCCP/estado 4 nos muestra el grado de acoplamiento de las mitocondrias estudiadas, y refleja la existencia de "fugas" de protones (del inglés *leaks*) en la membrana interna mitocondrial que permiten la reentrada de los H^+ a la matriz. Analizando nuestras cepas referencia, se observa que la adición de desacoplante provocaba un incremento en la velocidad de la respiración en todas las mitocondrias, pero este incremento era mayor en mitocondrias control (5.84 ± 0.16) y UCP2 (5.15 ± 0.13) que en las UCP1 donde la estimulación era la menor (3.72 ± 0.14). Este efecto es debido a la presencia de la UCP1, cuya expresión provoca un mayor valor de estado 4, y por lo tanto, el desacoplamiento que provoca el FCCP es aparentemente menor.

Al añadir ADP 0.1 mM tras la adición del sustrato, el potencial de membrana disminuye y la respiración se estimula en todas las mitocondrias (figura 64) pasando al llamado estado 3 de la respiración. Conforme el ADP se va fosforilando en la ATPsintasa, la

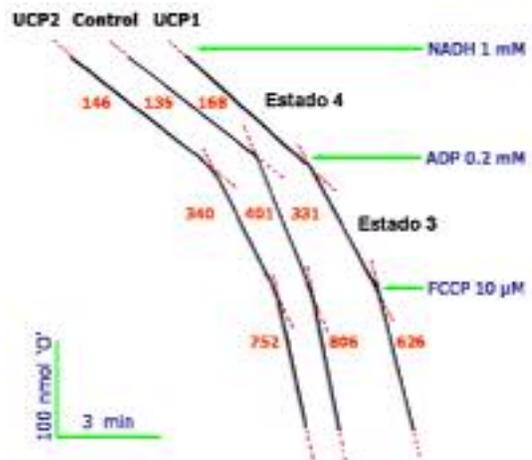


Figura 64 Trazado representativo de la respiración, en el electrodo de oxígeno y en presencia de NADH y ADP, de las mitocondrias de levaduras empleadas como cepas referencia en los experimentos. La respiración se inició con la adición de 1 mM de NADH. El RCR se calculó dividiendo la velocidad de respiración inducida por la adición de ADP 0.2 mM por la velocidad de respiración basal (estado 4). La adición de FCCP 10 μM nos mostró la capacidad respiratoria máxima de esas levaduras. La SAB se empleó a una concentración de 10 μM . Las figuras representan las tasas respiratorias en nmoles $\text{O}'\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

mitocondria va recuperando tanto el potencial de membrana como la velocidad de respiración basal. El control respiratorio (RCR del inglés *respiratory control ratio*) es el cociente entre el consumo de oxígeno en el estado 3 y el estado 4, y representa el grado de acoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP. En otras palabras, el RCR nos da una idea de la eficiencia del proceso de fosforilación oxidativa. Por lo tanto, la capacidad de respuesta de las mitocondrias a la adición de ADP depende también de su grado de acoplamiento ya que a mayor cantidad de "fugas", menor rendimiento energético. Lógicamente en este caso, las mitocondrias control fueron las que mostraron el mayor valor (3.02 ± 0.05) (figura 64) de las tres cepas control. Mientras, las mitocondrias UCP2 presentaron un valor intermedio de 2.39 ± 0.03 , sensiblemente menor a las control, pero superior a las mitocondrias UCP1, que presentaron el RCR más bajo de los tres (1.97 ± 0.06). Estos resultados indicaron que las levaduras que expresaban UCP1 presentaban un rendimiento energético menor que las otras dos cepas referencia.

Si se añade GDP 1mM a estas mitocondrias, la velocidad de respiración mostraba un ligero incremento tanto en el caso de las mitocondrias control ($8 \pm 3.7\%$) como en el de las mitocondrias UCP2 ($10 \pm 4.7\%$) (figura 65.A). Este incremento de la velocidad de respiración basal es provocado por el efecto residual del GDP sobre la citocromo *c*-oxidasa [Prieto *et al.* 1995]. Por el contrario, en mitocondrias UCP1 el GDP ocasionaba una disminución de la velocidad de respiración del $29 \pm 2.1\%$. Esta disminución es consecuencia de una inhibición de la actividad de la UCP1, y por lo tanto del transporte de H^+ hacia la matriz mitocondrial. Los valores obtenidos en nuestros experimentos concuerdan con los obtenidos en nuestro laboratorio en estudios anteriores [González-Barroso *et al.*, 1998].

Como se comentó en la sección 3.3 de la Introducción, tanto el ácido palmítico como el ácido retinoico son otros dos de los reguladores de la actividad de la UCP1. Esto no es extensible a la UCP2, ya que mientras el ácido palmítico no afecta su actividad, el retinoico sí lo hace, aunque de modo dependiente al pH [Rial *et al.*, 1999]. Para los ensayos, y de acuerdo con lo observado en estudios anteriores, se emplearon unas concentraciones de reguladores en una relación molar 3:1 frente a SAB del medio ($10 \mu M$).

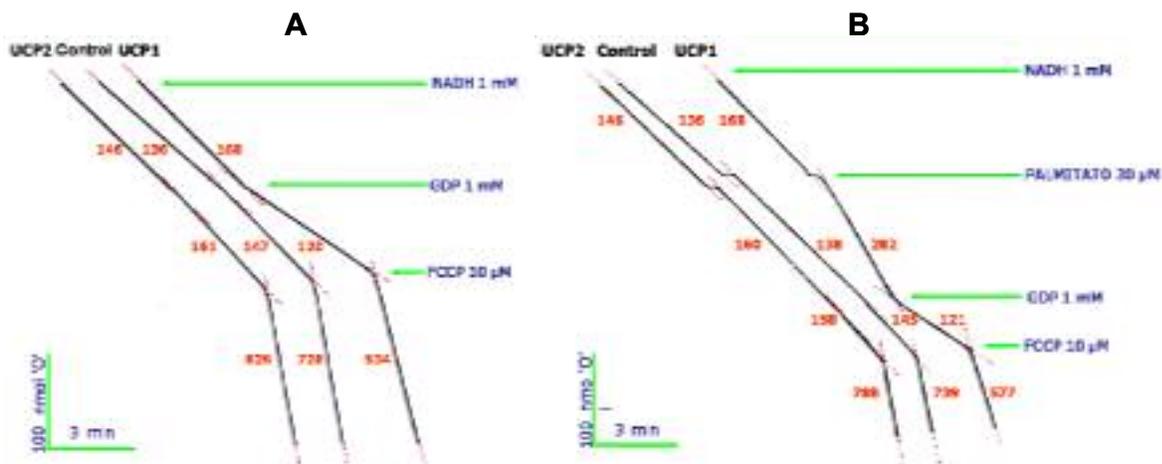


Figura 65 Trazado representativo de la respiración de las cepas referencia en presencia de GDP y palmitato en el electrodo de oxígeno. Las condiciones de ambos experimentos fueron las mismas que la de la figura 64. **(A)** La adición de GDP 1 mM provoca la inhibición de la respiración únicamente en el caso de las mitocondrias UCP1. En las mitocondrias control y UCP2 se observa un ligero efecto activador. **(B)** De igual modo, la adición de palmitato 30 μM activa la respiración únicamente en mitocondrias UCP1. Las figuras representan las tasas respiratorias en $\text{nmoles } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Esta proporción era adecuada para observar un efecto desacoplante cercano al máximo (figura 65.B), pero sin llegar a ocasionar efectos inespecíficos (ver figuras 48 y 49). El estudio de las cepas controles confirmó que ácido palmítico no provocaba una estimulación de la velocidad de la respiración ni en las mitocondrias control (1.02 ± 0.04) ni en las UCP2 (1.03 ± 0.04), sin embargo, en mitocondrias UCP1 ocasionaba un incremento de la velocidad de respiración de 1.68 ± 0.04 veces (figura 65.B). Un efecto similar se observaba al añadir ácido *todo-trans* retinoico a estas mitocondrias en un medio de respiración a pH 6.8 (figura 66.A). Mientras que en mitocondrias control (0.98 ± 0.06) y UCP2 (0.93 ± 0.05) la respiración no sólo no se estimulaba sino que se mostraba ligeramente inhibida, en el caso de mitocondrias UCP1 la velocidad de respiración se incrementaba, de modo reversible por GDP, hasta 1.72 ± 0.05 veces el valor del estado 4. Estos valores, si bien no pueden considerarse iguales a los obtenidos en TAP, permanecen en un mismo rango (ver figura 40).

Sin embargo, como antes citamos, la respuesta a la adición de ácido *todo-trans* retinoico a mitocondrias UCP2 variaba según el pH del medio de respiración [Rial *et al.*, 1999] (figura 49). Las mismas adiciones de ácido retinoico a pH 7.3, provocaban un incremento en la velocidad de respiración de estas mitocondrias de 1.72 ± 0.04 veces. Este efecto no se observaba ni en mitocondrias control, donde permanecía una ligera inhibición cercana al 10%, ni en mitocondrias UCP1 donde se mantenía una activación de la velocidad de respiración, aunque en este caso, como consecuencia de un incremento en el estado 4, con valores aparentemente menores (1.34 ± 0.06) (figura 66.B).

Todos estos datos, se recogen en la tabla 18, y nos permitieron establecer unos valores controles o referencia con los que se analizaron los efectos de las distintas mutaciones sobre las características bioenergéticas de la UCP1. Todos los mutantes se analizaron de modo análogo a los controles, estudiando su comportamiento en el electrodo de oxígeno.

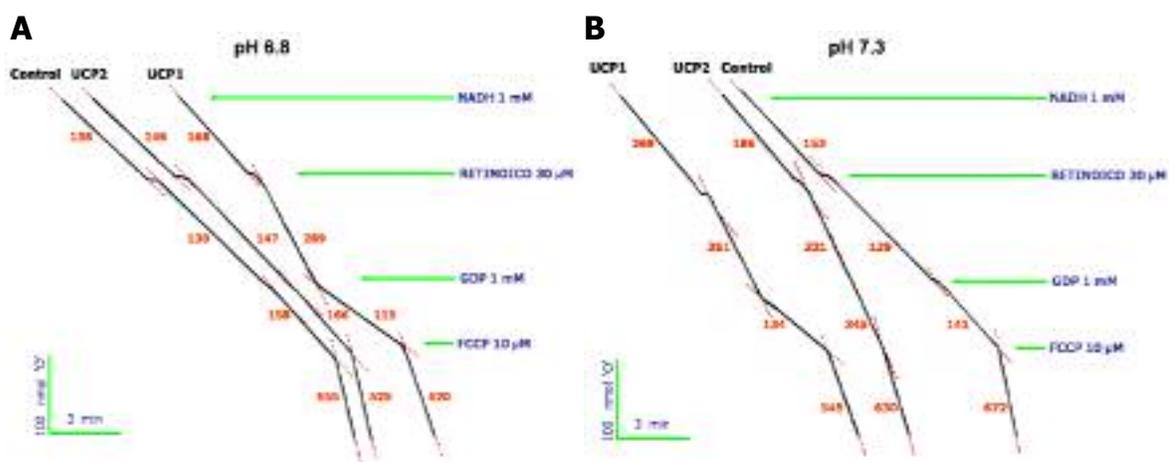


Figura 66 Trazado representativo del comportamiento en el electrodo de oxígeno de las cepas referencia en presencia de ácido retinoico a diferentes pHs. Las condiciones de ambos experimentos fueron las mismas que la de la figura 64. **(A)** A pH 6.8, la adición de retinoico 30 µM únicamente estimulaba la respiración de las mitocondrias UCP1, en las otras dos cepas o no se observaba efecto o se observaba una ligera inhibición. La adición de GDP a las mitocondrias UCP1 revierte el efecto estimulador del retinoico. **(B)** A pH 7.3, mientras que las mitocondrias UCP1 y control se comportan cualitativamente del mismo modo que a pH 6.8, las UCP2 muestran un incremento de respiración de hasta el 75% su tasa de respiración basal. Las figuras representan las tasas respiratorias en $\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

4.1.2.- EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EXÓGENAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS

La actividad de la UCP1, de la UCP2 o de las quimeras puede modificar el crecimiento de las cepas que las expresan [González-Barroso *et al.*, 1999]. Para estimar el efecto que causaba la expresión de las quimeras diseñadas, se estudió el crecimiento de las cepas referencia en medio con galactosa y se establecieron unos valores de tasa de generación que nos permitieron una posterior comparación con los datos obtenidos para las quimeras. Un caso extremo que ejemplifica esta modificación del crecimiento es el de la quimera UCP Δ 9 caracterizada en nuestro laboratorio [Bouillaud *et al.*, 1994]. Su expresión retrasa de modo severo el crecimiento de las levaduras, y alcanza el máximo efecto entre las 4 y 6 horas posteriores a la inducción con galactosa. A partir de las 7 horas de crecimiento en medio con galactosa, el tiempo de generación en estas levaduras disminuye. Este fenómeno sólo ha sido observado en esta cepa y es consecuencia de una pérdida selectiva del plásmido que provocaba la aparición de revertientes en el medio de cultivo [Bouillaud *et al.*, 1994].

La incubación e inducción de la expresión de las proteínas se realizó como se describe en Materiales y Métodos (sección 2.1). Como paso previo para estimar los posibles efectos se calculó la tasa de generación en presencia de la glucosa inicial, es decir, sin expresión de las proteínas referencia. Este valor indicaba el estado general de la cepa estudiada y nos servía para detectar cualquier anomalía en el crecimiento de la cepa que no era atribuible a la expresión de las proteínas insertas en nuestro vector de expresión. Para su cálculo, se realizaron las medias aritméticas de los valores obtenidos 30 min antes y 30 min después de la adición de la galactosa y, teniendo en cuenta el valor obtenido para las 34 cepas de levaduras estudiadas, se estableció que su valor promedio era de 3.25 ± 0.07 h ($n=30$).

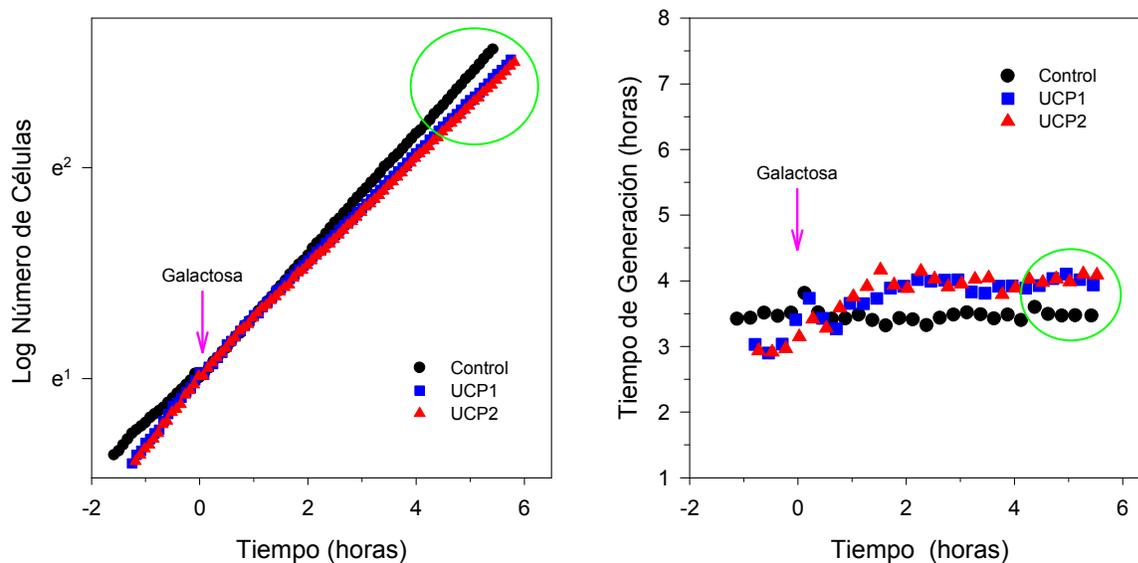


Figura 67 Efecto de la inducción de la expresión con galactosa en el crecimiento de las levaduras. **(A)** Variación en el número de células por ml en levaduras control, UCP1 y UCP2. El crecimiento se determinó a partir de la lectura de la absorbancia de los cultivos cada 5 minutos, la galactosa se añadió en el tiempo 0. **(B)** Efecto de la expresión de la UCP1, UCP2 y del control en el tiempo de generación de las levaduras. Los datos mostrados pertenecen a uno de los 11, 6 o 4 experimentos independientes realizados en cada caso y representan los valores corregidos según las expresiones mostradas en el apartado de Materiales y Métodos (ver texto para más detalles).

La inducción con galactosa tenía lugar tras aproximadamente dos horas de crecimiento en medio con glucosa muy diluida, y se monitorizaba durante 7 horas. La figura 67 muestra el crecimiento de las tres cepas de levaduras controles y la variación de la tasa de generación con el tiempo (ver sección 2.1 de Material y Métodos para una explicación de su cálculo). A partir de estas gráficas se definieron los tiempos de generación "galactosa", que se calcularon como la media de las tasas de generación obtenidas entre las 4,5 y 5,5 horas después de la inducción. La tasa de generación obtenida con la cepa control (3.60 ± 0.09 horas) nos indicó que el crecimiento de estas levaduras en un medio con galactosa se retrasa independientemente de la expresión de las UCPs. Sin embargo, comparando los tiempos obtenidos para las tres cepas referencia, se observó que la expresión de la UCP1 (3.94 ± 0.03 horas) o UCP2 (3.84 ± 0.12 h) provocaba un crecimiento más lento que el que se apreciaba en las cepas control (3.60 ± 0.09 horas). Estos resultados concuerdan con lo afirmado por otros autores [Bathgate *et al.*, 1992], e indican que el rendimiento de la fosforilación oxidativa de estas células UCP1 o UCP2 debe haber disminuido. Estos valores fueron considerados como los valores de referencia que nos permitieron estimar el efecto que, sobre el crecimiento, provocaba la expresión de las distintas quimeras.

4.2.- ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS QUIMERAS MAYORES

4.2.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS

Tal y como se describe en Materiales y Métodos, como paso previo a cualquier estudio bioenergético con mitocondrias aisladas, siempre se chequeó por *Western Blotting* la correcta expresión de las proteínas en las mitocondrias (sección 1.5.3). La figura 68 muestra la inmunodetección con anticuerpos anti-UCP1 y anti-UCP2 de las cepas referencia. La presencia de una ligera señal en la muestra de mitocondrias UCP2 cuando se emplea anticuerpo anti-UCP1 (figura 68.A), y su ausencia en el experimento inverso (figura 68.B), es consecuencia de la naturaleza de los anticuerpos. Anti-UCP2 es un anticuerpo generado contra un péptido de 14 aminoácidos específico de la UCP2 por lo que no es de esperar que reconozca ninguna región de la UCP1. Por el contrario, anti-UCP1 se genera contra la proteína completa y ello implica que, debido a la gran homología de ambas proteínas, probablemente existan anticuerpos que reconozcan regiones presentes en ambas. En la figura 69 se muestra la inmunodetección conjunta de las cepas referencia y las quimeras mayores. Una vez descartado cualquier posible defecto en la expresión de las proteínas, se estudió su comportamiento en el electrodo de oxígeno de modo análogo al empleado para caracterizar las cepas referencia y se establecieron sus características bioenergéticas. Los datos obtenidos, junto con los de las cepas control, UCP1 y UCP2 se recogen en la tabla 18.

El análisis de la actividad transportadora basal de las quimeras generadas junto con las proteínas controles viene representados en la gráfica 71.A. En ella se observa que las mitocondrias que

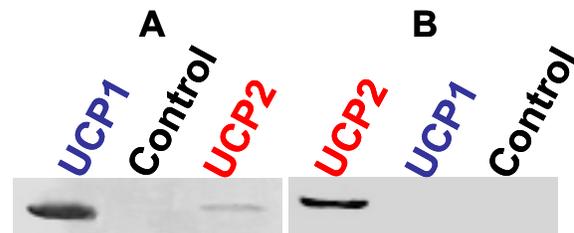


Figura 68 Patrón de expresión estudiado por *Western blotting* de las cepas control. (A) Con anticuerpo anti-UCP1. (B) Con anticuerpo anti-UCP2.

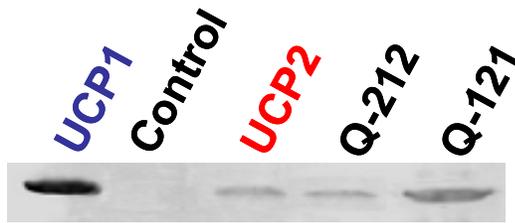


Figura 69 Inmunodetección conjunta de las cepas referencia y de las quimeras mayores con anticuerpo anti-UCP1.

ellas las mitocondrias de la quimera Q-121. Las mitocondrias de la otra de las quimeras mayores, Q-212, presentan un RCR inferior al de las mitocondrias control y UCP2.

A partir de la gráfica C de la figura 71 se observa que únicamente las mitocondrias UCP1 presentan una regulación por nucleótidos. En ambas quimeras mayores la regulación por nucleótidos desaparece.

La última de las gráficas de la figura 71 (D), reúne los efectos que los activadores de la UCP1 y UCP2 provocan sobre las cepas que expresan las quimeras mayores y las proteínas referencia. Llama la atención el fenotipo que muestra la quimera Q-212 ya que, aunque no muestre sensibilidad a GDP, esta proteína derivada de la UCP2 adquiere una capacidad de respuesta a retinoico y palmítico muy parecida a la UCP1. En la otra quimera mayor (Q-121) ocurre lo contrario y adopta un fenotipo típico de la UCP2 caracterizado por una capacidad de respuesta a ácido retinoico mayor a pH 7.3 que a 6.8.

Finalmente el análisis de la tasa de generación en presencia de galactosa de las levaduras que expresan las quimeras mayores reveló un ligero incremento en los valores de la tasa de crecimiento.

4.2.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS MAYORES

Los resultados obtenidos hasta el momento nos habían indicado que, para la UCP1 y UCP2, la sustitución de su segundo dominio provocaba la pérdida de su fenotipo característico. Sin embargo, para ponderar la importancia de las mutaciones introducidas era necesario determinar si se habían generado unas proteínas inactivas o quimeras con características semejantes a la UCP1 o UCP2. Existía también la posibilidad de que, como ocurrió en su momento con los mutantes UCP Δ 9 o Gly76 Δ [González-Barroso *et al.*, 1997; 1999],

expresan UCP1 y Q-212 muestran el valor de estado 4 más elevado. Q-121 por su parte se caracteriza por un estado 4 de valor intermedio entre el mostrado por las mitocondrias control y las mitocondrias UCP2.

La figura 71.B muestra que los valores de RCR oscilan entre el mayor, característico de las mitocondrias control, y el menor mostrado por las UCP1. En un valor intermedio se sitúan las UCP2 y muy cerca de ellas las mitocondrias de la quimera Q-121.

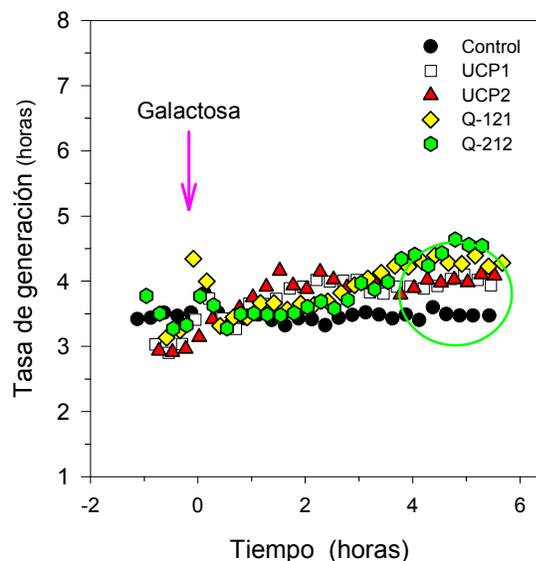


Figura 70 Efecto de la expresión de la UCP1, UCP2, antisentido de la UCP1 y de las quimeras Q-121 y Q-212 en el tiempo de generación de las levaduras. Los valores mostrados son representativos y muestran los datos corregidos según las expresiones descritas en la sección 1.5.3 de Materiales y Métodos.

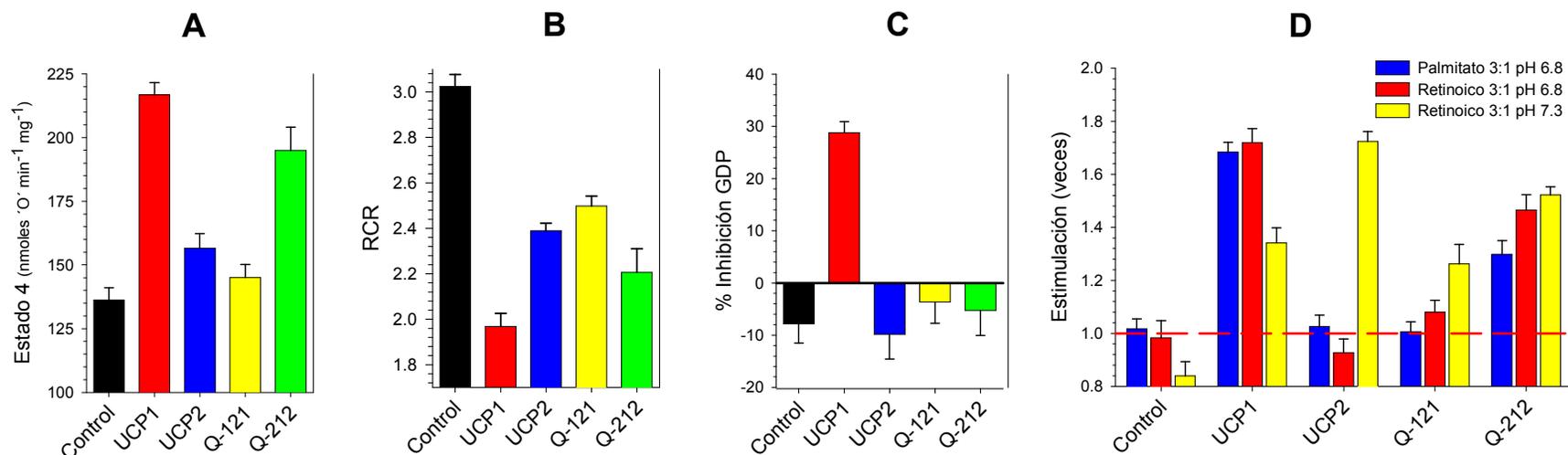


Figura 71 Representación de los principales parámetros bioenergéticos que caracterizan la funcionalidad de las cepas referencia y las quimeras mayores Q-121 y Q-212. (A) Estados 4 en presencia de NADH 1mM. (B) Cociente de control respiratorio (RCR) calculado en presencia de ADP 0.2 mM. (C) Capacidad de inhibición de los nucleótidos. Los valores se expresan como un porcentaje de inhibición respecto al estado 4 tras la adición de GDP 1mM. (D) Estimulación por ácido palmítico y retinoico 30 μ M. Todos los experimentos se realizaron en un medio de respiración que contenía SAB 10 μ M. Los datos mostrados representan la media de al menos 6 experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM).

	n	Estado 4 pH 6.8	RCR	Inhibición GDP	Respiración Palmitato 3:1	Respiración Palmitato 3:1+GDP	Estimulación Palmitato 3:1	Respiración Retinoico 3:1 pH 6.8	Respiración Retinoico 3:1+GDP pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1 pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1 pH 7.3	Tasa de generación (horas)
Control	15	136 \pm 4.8	3.02 \pm 0.05	-7.8 \pm 3.7	139 \pm 5.6	145 \pm 6.1	1.02 \pm 0.04	134 \pm 12.6	132 \pm 18.1	0.98 \pm 0.06	0.84 \pm 0.05	3.39 \pm 0.09
UCP1	13	217 \pm 4.8	1.97 \pm 0.06	28.8 \pm 2.1	365 \pm 11.6	156 \pm 5.3	1.68 \pm 0.04	373 \pm 18.3	141 \pm 8.1	1.72 \pm 0.05	1.34 \pm 0.06	3.84 \pm 0.12
UCP2	9	157 \pm 5.6	2.39 \pm 0.03	-9.8 \pm 4.7	161 \pm 7.5	170 \pm 8.8	1.03 \pm 0.04	145 \pm 10.3	159 \pm 12.4	0.93 \pm 0.05	1.72 \pm 0.04	3.94 \pm 0.03
Q-121	13	145 \pm 5.2	2.50 \pm 0.04	-3.7 \pm 4.0	146 \pm 5.7	148 \pm 5.5	1.01 \pm 0.04	157 \pm 8.0	158 \pm 9.7	1.08 \pm 0.05	1.26 \pm 0.07	4.36 \pm 0.10
Q-212	6	195 \pm 9.1	2.21 \pm 0.10	-5.3 \pm 4.8	253 \pm 11.1	248 \pm 15.2	1.30 \pm 0.05	286 \pm 13.5	266 \pm 8.7	1.46 \pm 0.06	1.52 \pm 0.03	4.47 \pm 0.20

Tabla 18 Resumen de los principales parámetros bioenergéticos que caracterizan la funcionalidad de las cepas referencia y las quimeras mayores Q-121 y Q-212. Los valores de respiración y de estado 4 vienen expresados en nmoles 'O' min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. La inhibición por GDP representa el porcentaje de inhibición de la respiración en estado 4. Todos los datos mostrados en la tabla representan la media de los "n" experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado y van acompañados del error estándar medio (ESM).



las quimeras realizadas originasen proteínas o tipo poro o tipo "desregulado". Por ello fue necesario realizar un análisis exhaustivo de los datos y tratar de definir las características de los distintos fenotipos para, de este modo, poder clasificar las quimeras generadas.

4.2.2.1.- Definición de los fenotipos bioenergéticos posibles

A modo de resumen y a partir de los resultados obtenidos en nuestros experimentos, las mitocondrias referencia bioenergéticamente se definen por las siguientes características:

Mitocondrias UCP1

- Presentan un elevado estado 4 inicial, o lo que es lo mismo, una elevada actividad desacoplante basal en comparación con las mitocondrias UCP2 y control. Esto se refleja también en un RCR bajo.
- La actividad de la proteína es inhibible por nucleótidos de purina.
- Muestran una activación de la respiración en presencia de ácido palmítico y retinoico a pH 6.8. Esta activación se caracteriza por ser sensible a nucleótidos.

Mitocondrias UCP2

- La tasa de respiración basal o estado 4 inicial que muestran es similar al de las mitocondrias control, y por tanto, se caracterizan por un RCR alto.
- No sólo no muestran inhibición por nucleótidos de purina sino que, en presencia de éstos, incluso muestran una ligera estimulación de la respiración.
- No se activan por el ácido palmítico. En presencia de ácido retinoico a pH 6.8 la respiración se muestra parcialmente inhibida, pero a 7.3 se activa de manera clara y no sensible a GDP.

Mitocondrias que expresan proteína inactiva (control)

- Muestran un estado 4 bajo, y por tanto, un RCR muy alto.
- Carecen de inhibición por nucleótidos y puede incluso observarse una estimulación de la respiración en presencia de ellos.
- En presencia de ácido retinoico la respiración se muestra parcialmente inhibida y con palmítico la respiración se ve ligeramente activada pero de un modo no sensible a GDP.



Estas características permitieron clasificar los fenotipos que mostraron las distintas cepas quimera, pero la generación de mutantes podía originar otro, el llamado fenotipo "desregulado". Este fenotipo fue caracterizado en nuestro laboratorio tras la generación de varios mutantes del tercer tercio de la UCP1 [González-Barroso *et al.*, 1999]. Un ejemplo de mitocondrias que presentan este fenotipo son las que expresan el mutante Gly76 Δ , y que se caracterizan por:

- La respiración basal de estas proteínas es elevada y por lo tanto muestran un RCR muy bajo.
- No muestran regulación por nucleótidos o si lo hacen esta inhibición es muy baja.
- Debido a su elevada respiración basal y a la falta de regulación por nucleótidos, los tiempos de generación de estas levaduras se incrementan claramente por encima de las 5 horas [González-Barroso *et al.*, 1999].

4.2.2.2.- Clasificación del fenotipo de las quimeras mayores

Definidas las características bioenergéticas de las mitocondrias de las cepas referencia, los resultados obtenidos para las quimeras mayores se analizaron para tratar de clasificarlas.

La representación de la inhibición por GDP y los estados 4 de cada cepa (figura 72.A) indicó que las dos quimeras mayores presentaban una tasa de respiración basal menor que la UCP1. Ambas quimeras no mostraron un estado 4 regulado por nucleótidos. Las tasas de generación observadas en ambas quimeras son mayores que las de las cepas referencia, pero no tanto como las que se obtienen en quimeras que muestran un fenotipo desregulado (figura 72.B) [González-Barroso *et al.*, 1999].

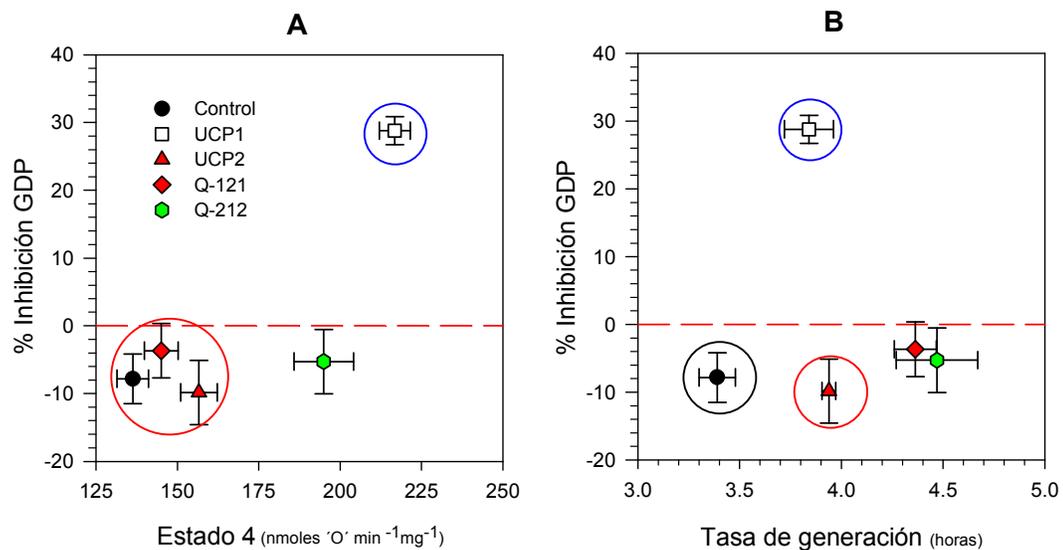


Figura 72 (A) Relación entre los valores obtenidos de inhibición por GDP y del estado 4 de la respiración (B) Relación entre la inhibición por GDP y la tasa de generación de las cepas referencia y quimeras mayores. Los valores mostrados representan la media de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.

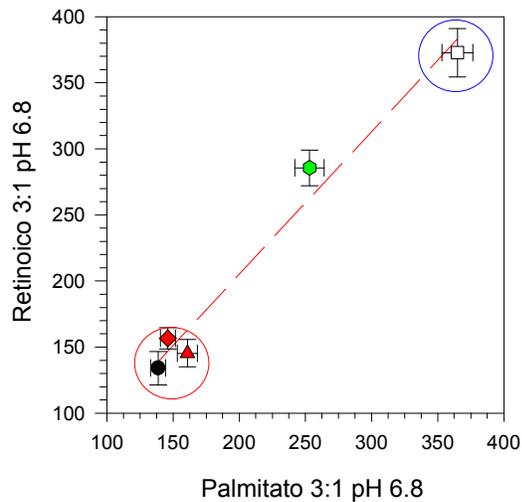


Figura 73 Relación de la respiración mitocondrial en presencia de ácido palmítico y retinoico de las cepas referencia y quimeras mayores. La leyenda de los símbolos empleados es la misma que la de las figuras 72 y 74. Los valores representados vienen expresados en nmoles O' min⁻¹ mg⁻¹ y son la media de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error muestran el ESM de las medidas.

La figura 73 analiza la respuesta a palmitato y ácido retinoico. De las dos quimeras mayores, únicamente las mitocondrias Q-212 muestran una elevada tasa de respiración en presencia de ambos ácidos. Sin embargo, el análisis de esta activación (figura 74.A) indicó que esta activación no se encontraba regulada por GDP, y que sólo las mitocondrias UCP1 presentan un componente sensible a nucleótidos.

La propiedad característica de las mitocondrias UCP2 es la estimulación por retinoico a pH 7.3. La figura 74.B representa las diferencias de estimulación por retinoico a pH 6.8 y 7.3 frente al componente sensible a GDP y muestra que la quimera Q-121, que no respondía a retinoico ni palmitato a pH 6.8, sí que es estimulada a pH 7.3. Esto no se observa en las mitocondrias control.

Todos estos datos señalaban que el segundo dominio de la UCP1 es clave para la regulación de la proteína. Su cambio por el dominio homólogo de la UCP2 en la quimera Q-121, genera una proteína que pierde el fenotipo UCP1 acercando su comportamiento al de las mitocondrias UCP2 (adquiere una estimulación por retinoico a pH 7.3). Sin embargo, el fenotipo UCP1 no reside únicamente en este segundo dominio, ya que el

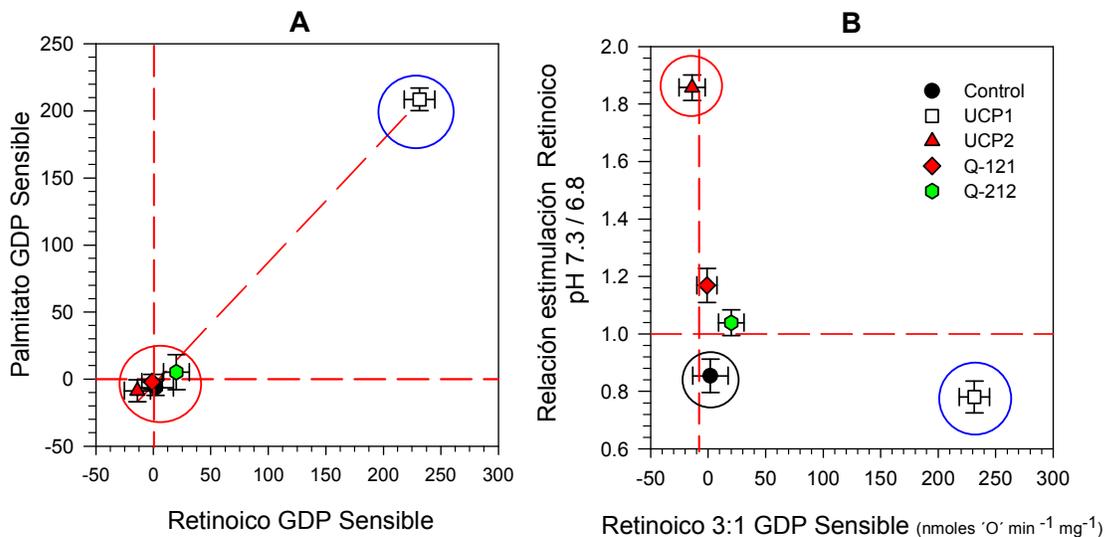


Figura 74 (A) Representación de la relación entre el componente sensible a GDP que muestra la estimulación por ácido palmítico y retinoico. Los valores mostrados se expresan en nmoles O' min⁻¹ mg⁻¹. **(B) Relación entre el cociente de la estimulación inducida por ácido retinoico a pH 7.3 y 6.8 y el componente sensible a GDP.** Los datos muestran los valores medios de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado y van acompañados del error estándar medio (ESM) de ambas medidas.

cambio análogo del segundo dominio de la UCP2 por este dominio de la UCP1 (Q-212) genera una nueva quimera con alguna de las características propias de la UCP1, como la capacidad de estimulación por ácido retinoico y palmítico a pH 6.8, pero no restaura la sensibilidad a nucleótidos.

4.3.- ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS MUTANTES DEL *LOOP* II DE LA UCP1 y UCP2

Una vez observado que el segundo dominio era clave para el comportamiento de la proteína, era importante tratar de determinar si dentro del segundo tercio de la UCP1 había alguna región determinante de la respuesta a ácidos grasos y retinoico. Para investigar este punto se fueron realizando una serie de quimeras que fueron cambiando progresivamente regiones del tercio central de la UCP1 por las regiones homólogas del segundo tercio de la UCP2 (ver figura 50). En esta sección se presenta el análisis de la región del *loop* (figura 52). Finalmente, y para comprobar los resultados obtenidos en el análisis de la quimera Lp2_D, se realizó la quimera recíproca en la UCP2 (figura 55).

4.3.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS

Al igual que para los mutantes mayores, lo primero que se analizó fue la correcta expresión de las quimeras por *Western-Blotting*. De este modo, para las quimeras realizadas a partir de la UCP1 o UCP2 se utilizó anticuerpo anti-UCP1 o anti-UCP2 respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 75.A y 75.B. Posteriormente, se analizó el comportamiento de todas las mitocondrias en el electrodo de oxígeno, y de modo análogo al descrito para las anteriores quimeras, se calcularon los parámetros bioenergéticos necesarios para caracterizarlos. Los valores y la representación de algunos de ellos se recogen en las figuras 76, 77 y 78 de las páginas siguientes.

El análisis de la actividad transportadora basal se muestra en la figura 76.A. El estudio de la gráfica refleja que Lp2_A, Lp2_B y Lp2_C tienen valores de estado 4 incluso mayores que los característicos de la UCP1, mientras que Lp2_D, Q-Lp2, U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A, los tienen muy parecidos a los propios de la UCP2. Entre éstos, el resto de los mutantes muestran unos valores intermedios; unos más próximos a mitocondrias UCP1 (Glu134Asp, Met140Phe, Lp2_AB y Lp2_ABC) y otros con valores más relacionados con la UCP2 (Lp2_ABCD y Lp2_ABCDE).

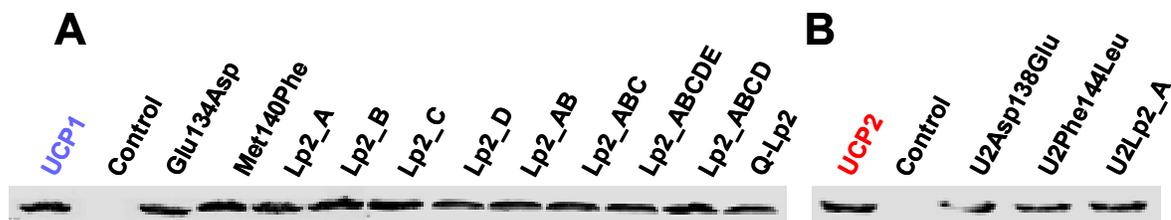
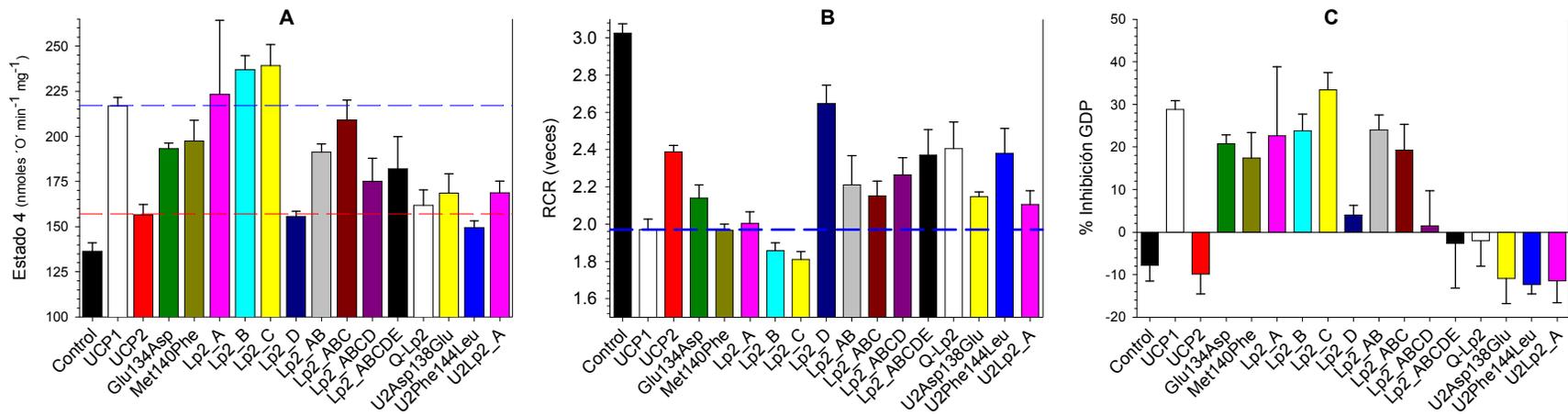


Figura 75 Inmunodetección de las quimeras del *loop* II. **(A) Mutantes UCP1.** Para el proceso de inmunodetección se empleó anticuerpo anti-UCP1. **(B) Mutantes UCP2.** Detectados con anti-UCP2. Como cepas de control positivo se emplearon las cepas UCP1 o UCP2 (según el caso) y la cepa control.



	n	Estado 4	pH	RCR	Inhibición GDP	Respiración Palmitato 3:1	Respiración Palmitato 3:1+GDP	Estimulación Palmitato 3:1	Respiración Retinoico 3:1-pH 6.8	Respiración Retinoico 3:1 +GDP-pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1 pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1 pH 7.3	Tasa de generación (horas)
Control	15	136 ± 4.8	4.8	3.02 ± 0.05	-7.8 ± 3.7	139 ± 5.6	145 ± 6.1	1.02 ± 0.04	134 ± 12.6	132 ± 18.1	0.98 ± 0.06	0.84 ± 0.05	3.39 ± 0.09
UCP1	13	217 ± 4.8	4.8	1.97 ± 0.06	28.8 ± 2.1	365 ± 11.6	156 ± 5.3	1.68 ± 0.04	373 ± 18.3	141 ± 8.1	1.72 ± 0.05	1.34 ± 0.06	3.84 ± 0.12
UCP2	9	157 ± 5.6	5.6	2.39 ± 0.03	-9.8 ± 4.7	161 ± 7.5	170 ± 8.8	1.03 ± 0.04	145 ± 10.3	159 ± 12.4	0.93 ± 0.05	1.72 ± 0.04	3.94 ± 0.03
Glu134Asp	4	193 ± 3.2	2.14 ± 0.07	20.8 ± 2.1	324 ± 15.1	159 ± 2.3	1.68 ± 0.05	318 ± 7.0	96 ± 7.0	1.64 ± 0.03	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.05	3.67 ± 0.11
Met140Phe	3	197 ± 11.5	1.97 ± 0.03	17.4 ± 6.0	333 ± 43.4	182 ± 0.8	1.69 ± 0.14	316 ± 4.8	113 ± 4.8	1.60 ± 0.04	1.39 ± 0.09	3.73 ± 0.19	
Lp2_A	3	223 ± 40.9	2.00 ± 0.06	22.6 ± 16.2	356 ± 45.2	166 ± 31.6	1.60 ± 0.19	363 ± 60.4	167 ± 35.3	1.63 ± 0.23	1.39 ± 0.20	3.50 ± 0.03	
Lp2_B	3	237 ± 7.9	1.86 ± 0.04	23.8 ± 3.9	361 ± 26.1	181 ± 15.8	1.52 ± 0.07	361 ± 15.4	175 ± 14.1	1.52 ± 0.05	1.30 ± 0.04	4.30 ± 0.09	
Lp2_C	3	239 ± 11.8	1.81 ± 0.04	33.4 ± 4.0	383 ± 30.1	157 ± 7.6	1.60 ± 0.09	406 ± 56.3	141 ± 11.5	1.70 ± 0.14	1.43 ± 0.12	3.82 ± 0.37	
Lp2_D	4	156 ± 3.0	2.65 ± 0.10	4.0 ± 2.3	244 ± 32.2	159 ± 9.6	1.57 ± 0.11	292 ± 5.1	111 ± 5.1	1.87 ± 0.03	1.44 ± 0.09	3.57 ± 0.07	
Lp2_AB	3	191 ± 4.6	2.21 ± 0.16	24.0 ± 3.5	314 ± 15.4	149 ± 9.1	1.64 ± 0.05	327 ± 26.9	150 ± 13.6	1.71 ± 0.08	1.48 ± 0.07	3.64 ± 0.06	
Lp2_ABC	4	209 ± 11.0	2.15 ± 0.08	19.2 ± 6.1	317 ± 38.1	171 ± 17.7	1.52 ± 0.12	358 ± 16.2	166 ± 11.7	1.71 ± 0.07	1.24 ± 0.19	4.58 ± 0.05	
Lp2_ABCD	4	175 ± 12.9	2.26 ± 0.09	1.5 ± 8.2	215 ± 20.3	173 ± 15.9	1.23 ± 0.09	237 ± 17.2	169 ± 13.6	1.36 ± 0.09	1.23 ± 0.08	4.16 ± 0.05	
Lp2_ABCDE	4	182 ± 17.7	2.37 ± 0.14	-2.6 ± 10.5	204 ± 14.4	188 ± 20.9	1.12 ± 0.09	210 ± 8.0	182 ± 22.0	1.15 ± 0.07	0.90 ± 0.05	3.77 ± 0.05	
Q-Lp2	4	162 ± 8.7	2.41 ± 0.14	-2.1 ± 5.9	171 ± 11.7	160 ± 12.8	1.06 ± 0.06	171 ± 3.5	159 ± 4.7	1.06 ± 0.04	1.03 ± 0.06	3.78 ± 0.12	
U2Asp138Glu	4	169 ± 10.7	2.15 ± 0.02	-10.9 ± 5.9	177 ± 10.7	185 ± 10.5	1.05 ± 0.06	140 ± 10.0	139 ± 7.9	0.83 ± 0.06	1.52 ± 0.11	3.76 ± 0.12	
U2Phe144Leu	4	150 ± 3.6	2.38 ± 0.13	-12.4 ± 2.2	163 ± 2.6	170 ± 4.0	1.09 ± 0.02	125 ± 3.1	124 ± 1.4	0.84 ± 0.02	1.38 ± 0.09	3.65 ± 0.10	
U2Lp2_A	4	169 ± 6.6	2.11 ± 0.07	-11.4 ± 5.2	184 ± 9.8	196 ± 16.9	1.09 ± 0.05	144 ± 16.9	155 ± 19.2	0.85 ± 0.07	1.52 ± 0.02	3.91 ± 0.14	

Figura 76 Representación de los principales parámetros bioenergéticos y tabla resumen de los valores que caracterizan la funcionalidad de las cepas control y de las quimeras del *loop* II de la UCP1. (A) Estados 4 en presencia de NADH 1mM. (B) Cociente de control respiratorio (RCR) calculado en presencia de ADP 0.2 mM. (C) Capacidad de inhibición de los nucleótidos en presencia de GDP 1mM. Todos los experimentos se realizaron en un medio de respiración que contenía SAB 10 μ M. Los valores de respiración y de estado 4 vienen expresados en nmoles O' min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. La inhibición por GDP representa el porcentaje de inhibición de la respiración en estado 4. Todos los datos mostrados van acompañados de los errores estándar medios (E.S.M.).

En la figura 76.B de nuevo se observa que los datos de RCR se relacionan de un modo inverso con los del estado 4. Atendiendo a su valor, Lp2_D y Q-Lp2 presentan el RCR más alto de todos, mientras que los menores valores los muestran Lp2_B y Lp2_C. El análisis de la gráfica indica que, según el RCR, se pueden establecer dos grupos de quimeras definidas: uno con valores de RCR iguales o inferiores al de mitocondrias UCP1 (Met140Phe, Lp2_A, Lp2_B y Lp2_C) y el otro con valores superiores a ésta (Glu134Asp, Lp2_AB, Lp2_ABC, Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE, Q-Lp2, U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A).

A partir de la gráfica C de la figura 76 se ve que algunas de las mutaciones introducidas en el *loop* II de la UCP1 provocan la pérdida de la sensibilidad a nucleótidos de estas quimeras. Se vuelven a observar dos subgrupos de mutantes: los que tienen una muy baja sensibilidad a nucleótidos o carecen de ella (Lp2_D, Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE, Q-Lp2, U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A) y los que retienen una sensibilidad muy parecida a la mostrada por la UCP1 (Glu134Asp, Met140Phe, Lp2_A, Lp2_B, Lp2_C, Lp2_AB y Lp2_ABC). Analizando la gráfica, se ve que la capacidad de inhibición por nucleótidos de la UCP1 disminuye un 86% cuando se introduce en la UCP1 el cambio de los residuos glutámico 134 por un aspártico y de la metionina 140 por una fenilalanina (Lp2_D). La incorporación de estas mutaciones a quimeras que retenían la capacidad de inhibición por GDP (Lp2_ABC) provoca el mismo efecto deletéreo observado en Lp2_D. Esto indica que esta mutación provoca un efecto no compensable y que su incorporación a las quimeras con sensibilidad a GDP provoca la pérdida de la regulación por nucleótidos de éstas (Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE y Q-Lp2). Es importante señalar que cuando la mutación del glutámico 134 (Glu134Asp) y de la metionina 140 (Met140Phe) es individual, no se afecta de un modo sensible a la regulación por nucleótidos de la UCP1, y es sin embargo cuando se introducen conjuntamente, cuando se provoca una reducción drástica en la capacidad de inhibición por GDP.

El análisis de los datos correspondientes a la estimulación por palmitato y retinoico que se muestra en la figura 77 revela que la mayoría de las quimeras de la UCP1

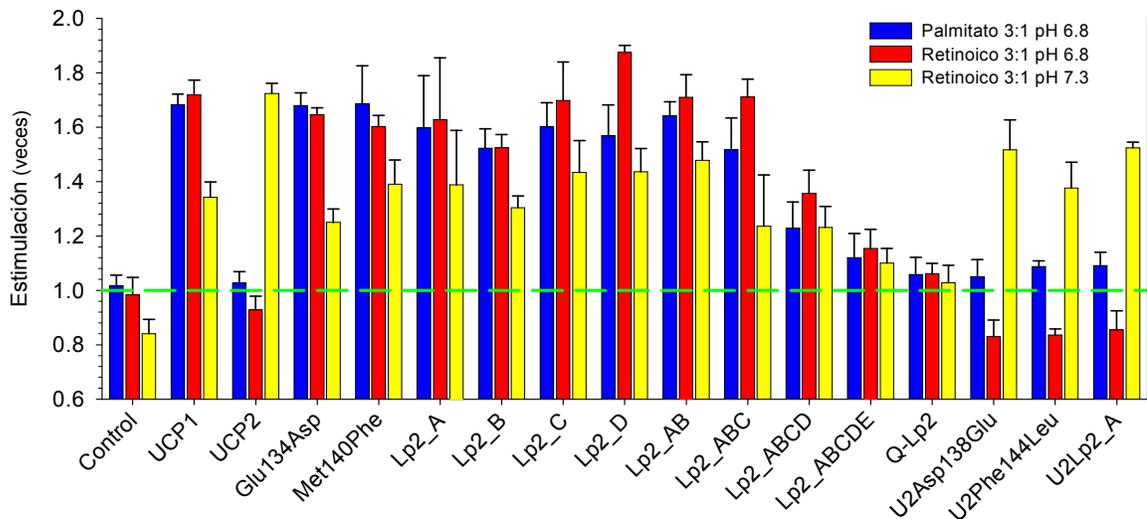


Figura 77 Representación del efecto en la respiración de los ácido palmítico y retinoico 30 μ M. Los valores de estimulación muestran la media de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno de ellos como mínimo por duplicado. Las barras de error muestran el error estándar medio de las medidas (ESM).

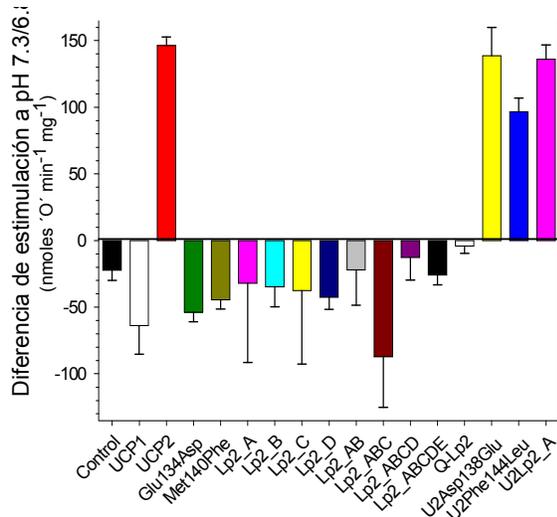


Figura 78 Representación de la diferencia de estimulación de las quimeras del *loop II* por ácido retinoico 30 μ M a los diferentes pH. Los valores de respiración (estimulación) muestran la media de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno de ellos como mínimo por duplicado (\pm E.S.M).

son estimuladas tanto por ácido palmítico como por retinoico a pH 6.8. De éstas, únicamente Lp2_ABCDE y Q-Lp2 muestran una estimulación por ácido palmítico y retinoico prácticamente residual. Las otras quimeras de la UCP2, U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A, muestran por su parte, el comportamiento característico de la UCP2. En presencia de retinoico a pH 7.3, en las quimeras de la UCP1 el efecto observado es el mismo que a pH 6.8, pero en todos los casos el valor absoluto disminuye como consecuencia del incremento en el estado de respiración basal. No ocurre lo mismo en los mutantes U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A, donde la respiración observada a pH 7.3 se incrementa hasta un 52% (ver tabla de datos en figura 76). De este modo, la representación de la diferencia de estimulación por retinoico a pH 7.3 y 6.8 de

la figura 78 muestra que las quimeras del *loop II* presentan valores negativos o positivos según deriven de la UCP1 o de la UCP2 respectivamente.

Por último, se analizó el posible efecto que la expresión de todas estas quimeras causaba en el crecimiento de las levaduras (figura 79). Las tasas de generación obtenidas indicaron que las mutaciones introducidas no provocaban la creación de ninguna proteína de gran efecto nocivo para el crecimiento de las levaduras. Los valores de los tiempos de generación de estas quimeras son similares y oscilan entre las 3.5 y 4.6 horas. Todos ellos se muestran en la tabla de la figura 76.

4.3.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS DEL *LOOP II* DE LA UCP1 Y UCP2

4.3.2.1.- Clasificación del fenotipo de las quimeras del *loop II*

La representación de la relación entre la inhibición por GDP y la tasa de respiración basal de las quimeras del *loop II* se muestra en la figura 80.A y reúne al conjunto de mutantes en dos grandes grupos: el de las quimeras con un estado 4

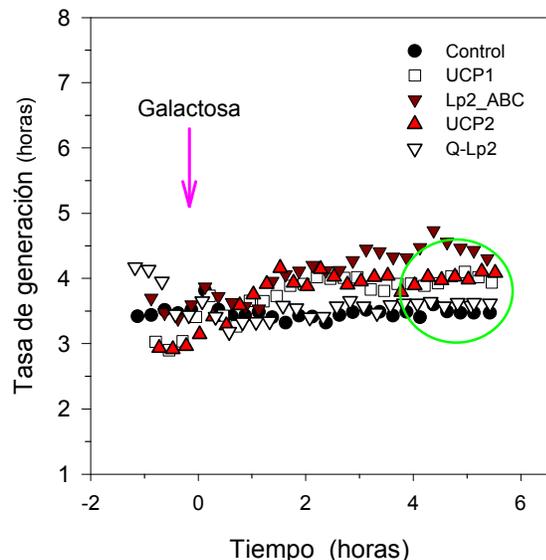


Figura 79 Curvas de crecimiento obtenidas para las cepas Lp2_ABC, Q-Lp2 y cepas referencia. Se omite la representación de las curvas de crecimiento del resto de mutantes por presentar unos tiempos de generación comprendidos entre los mostrados. Los valores para el resto de las cepas se reflejan en la tabla de la figura 76. Los datos mostrados pertenecen a uno de los al menos 4 experimentos independientes realizados en cada caso.

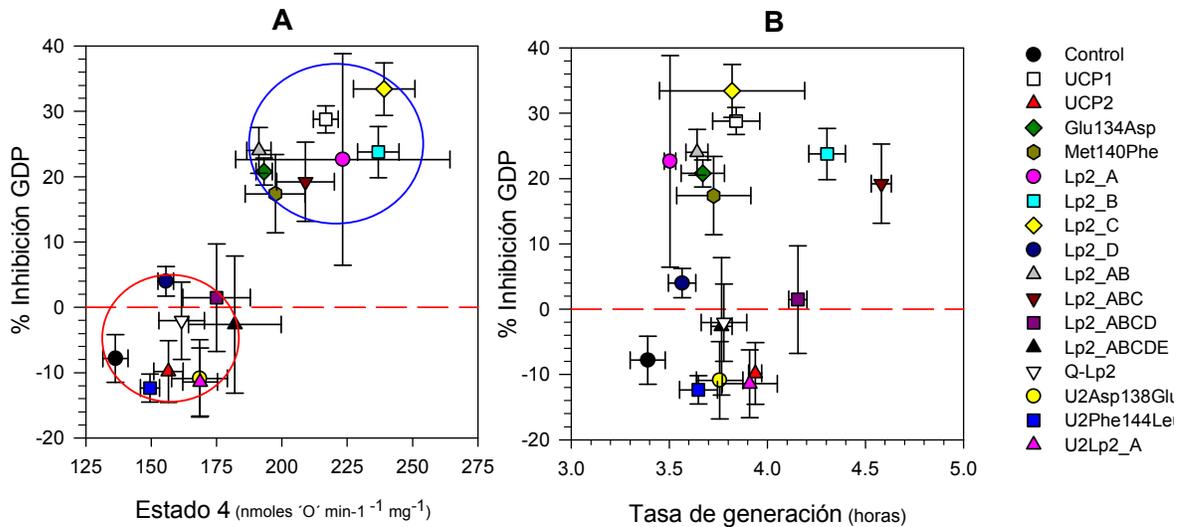


Figura 80 (A) Relación entre los valores de inhibición por GDP obtenidos y el estado 4 de la respiración (B) Relación entre la inhibición por GDP y la tasa de generación de las cepas estudiadas. Los valores mostrados representan la media de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.

elevado caracterizado por una regulación por nucleótidos muy parecida a la observada en las mitocondrias UCP1 (Lp2_A, Lp2_B, Lp2_C, Lp2_AB, Lp2_ABC), y por otro, el del resto de quimeras que muestran una tasa de respiración basal superior a la que se observa en las mitocondrias control, pero con una sensibilidad a nucleótidos muy baja o nula (Lp2_D, Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE y Q-Lp2). Estos resultados indican que es la sustitución de la región D (Lp2_D) la que conlleva los cambios más importantes. Todas las tasas de generación de las quimeras estudiadas en este grupo (figura 80.B), muestran unos valores similares a los de las cepas referencia y lejanos a los característicos de un fenotipo desregulado.

La respiración en presencia de ácido palmítico y retinoico se representa en la figura 81 y revela una correlación en la respuesta a los dos activadores en los distintos mutantes. De nuevo, un análisis detallado nos indica que la mutación en la UCP1 de los residuos glutámico 134 y metionina 140 (Lp2_D) provoca un descenso en la tasa de respiración observada con ambos activadores. La incorporación de esta mutación en las quimeras progresivas (Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE y Q-Lp2) disminuye aún más la activación de la respiración llegando en Q-Lp2 a valores similares a los observados en las cepas UCP2 y control. Hay que

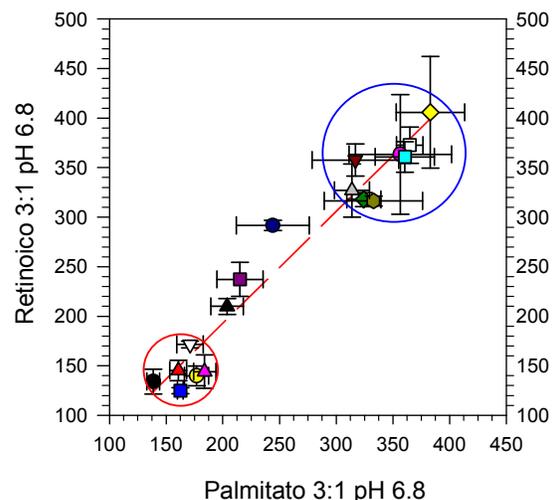


Figura 81 Relación entre los valores de estimulación por ácido palmítico y del retinoico de las cepas referencia y quimeras del loop II de la UCP1. La equivalencia de los símbolos empleados es la misma que se refleja en la figura 80. Los valores representados vienen expresados en $\text{nmoles 'O' min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, y son la media de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error muestran el ESM de las medidas.

señalar, sin embargo, que aunque en Lp2_D la tasa de respiración en presencia de palmítico o retinoico es significativamente más baja que en UCP1, el factor de estimulación frente a la respiración basal es similar al de la UCP1 y al de mutantes como Lp2_A, Lp2_B o Lp2_C. Esto puede interpretarse como que Lp2_D tiene una regulación normal, pero constituye una proteína con una actividad intrínseca menor. La baja respiración basal (similar a UCP2) y la baja inhibición por GDP de la respiración basal confirmarían esa interpretación.

El posterior estudio del componente sensible a GDP de la activación por palmítico y retinoico reveló que Lp2_A, Lp2_B, Lp2_C, Lp2_D, Lp2_AB y Lp2_ABC tienen una activación inhibible por nucleótidos. La inhibición es muy baja en Lp2_ABCD y nula en Lp2_ABCDE y Q-Lp2 (figura 82.A). Finalmente, ninguna de las quimeras que no responden a palmítico o retinoico a pH 6.8 (Lp2_ABCDE y Q-Lp2) muestran una respuesta a retinoico a 7.3 por lo que no puede decirse que tengan un fenotipo UCP2 (ver figura 82.B).

El importante efecto de la quimera Lp2_D, que implica las sustituciones Glu134Asp y Met140Phe, llevó a la preparación de cinco nuevos mutantes. Los mutantes puntuales Glu134Asp y Met140Phe en UCP1 y los recíprocos en UCP2 (U2Asp138Glu y U2Phe144Leu) así como el doble mutante en UCP2 (U2Lp2_A).

La caracterización funcional de estos mutantes reveló que todas ellas retienen las características funcionales de la proteína de la que provienen. Así Glu134Asp y Met140Phe muestran una respiración basal, que aunque es algo menor que UCP1, es sensible a nucleótidos y responden a los ácidos palmítico y retinoico a pH 6.8. La situación para los mutantes sobre UCP2 (U2Asp138Glu, U2Phe144Leu y U2Lp2_A) es análoga. Todos mantienen el fenotipo UCP2, mostrando una tasa de respiración basal similar a UCP2 e insensible a nucleótidos, así como una activación por ácido retinoico sólo a pH 7.3 (figuras 80, 81 y 82).

Todos los datos obtenidos nos permiten afirmar que el *loop* II de la UCP1 es

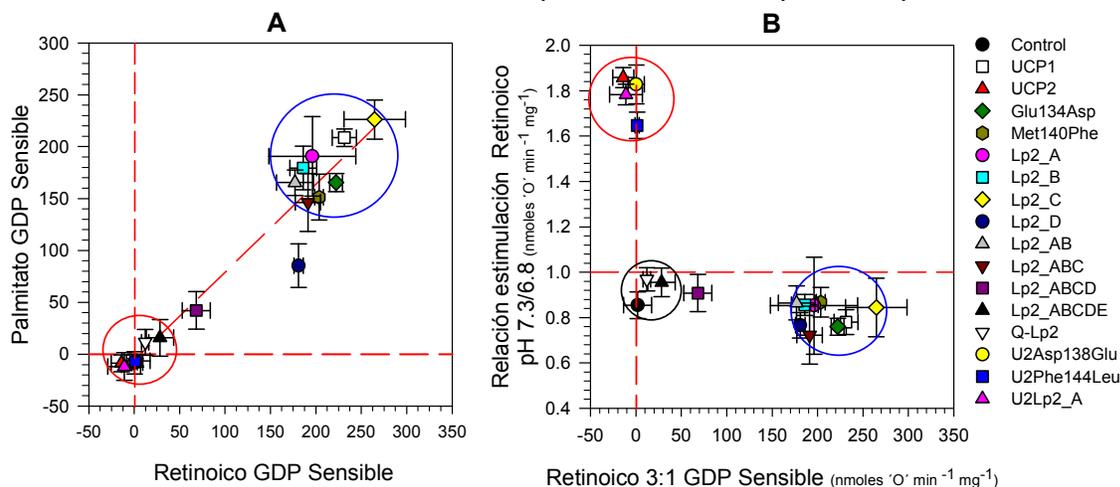


Figura 82 (A) Representación de la relación entre el componente sensible a GDP que muestra la estimulación por ácido palmítico y retinoico. Los valores mostrados se expresan en $\text{nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. (B) Relación entre el cociente de la estimulación de la respiración inducida por ácido retinoico a pH 7.3 y 6.8 y el componente sensible a GDP. Los datos muestran los valores medios de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.

imprescindible para el funcionamiento de la proteína, y que su cambio por el *loop* II de la UCP2 no convierte a la proteína en una quimera con fenotipo UCP2, sino que provoca la generación de una proteína inactiva. El análisis de las quimeras Lp2_ABCDE y Q-Lp2 así lo confirma ya que, si bien se caracterizan por unos valores de estado 4, RCR y de estimulación por palmitato que se acercan a los propios de mitocondrias UCP2, no se regenera la capacidad de estimulación de la respiración por retinoico a pH 7.3 (figura 82.B). Esta inactivación de la proteína tiene lugar de un modo progresivo ya que es la acumulación de mutaciones la que termina por destruir su actividad. Esto se apoya en la observación de que las quimeras Glu134Asp, Met140Phe, Lp2_A, Lp2_B, Lp2_C, Lp2_AB, Lp2_ABC no muestran alteradas las características propias de la UCP1, y es sin embargo a partir de la sustitución conjunta del glutámico 134 y de la metionina 140 por un aspártico y una fenilalanina respectivamente (Lp2_D), cuando se genera una proteína con las características UCP1 sensiblemente modificadas. Su incorporación en Lp2_ABC provoca la inactivación casi total de la proteína (Lp2_ABCD) y la acumulación de más mutaciones es la que termina por destruir la actividad (Lp2_ABCDE y Q-Lp2).

4.4.- ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS MUTANTES TRANSMEMBRANA DE LA UCP1

El cambio completo del *loop* II de la UCP1 por su homólogo correspondiente en la UCP2 no había regenerado el comportamiento mostrado por la quimera mayor Q-121. Por ello, era necesario determinar si las responsables del fenotipo de Q-121 eran las regiones transmembrana de la UCP1. Para conseguir este objetivo, y al igual que lo realizado con la región del *loop*, se fueron realizando una serie de quimeras que sustituyeron progresivamente las regiones transmembrana de la UCP1 por las regiones transmembrana de la UCP2 (ver figura 53).

4.4.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS

Como en los mutantes anteriores, lo primero que se analizó tras la generación de las quimeras fue su expresión en las mitocondrias de levaduras. Su estudio se muestra en la figura 83 y descartó cualquier anomalía en la expresión de estas proteínas. Los valores de los parámetros bioenergéticos de estas quimeras se muestran en la tabla 19, y se representan en la figura 84.

El estudio de los distintos estados 4 se muestra en la figura 84.A y refleja que todas ellas muestran una tasa de respiración basal elevada y superior a la que presentan las mitocondrias control. La mayoría de los valores se sitúan en torno a los valores característicos de las mitocondrias UCP1, o incluso superiores. Las únicas excepciones la constituyen Q-Hx3 y Q-Hx3/Hx4 que presenta un

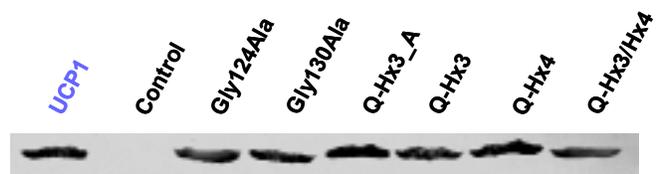


Figura 83 Inmunodetección con anticuerpo anti-UCP1 de las quimeras de los segmentos transmembrana III y IV de la proteína. Como cepas controles se emplearon las cepas UCP1 y la cepa control.

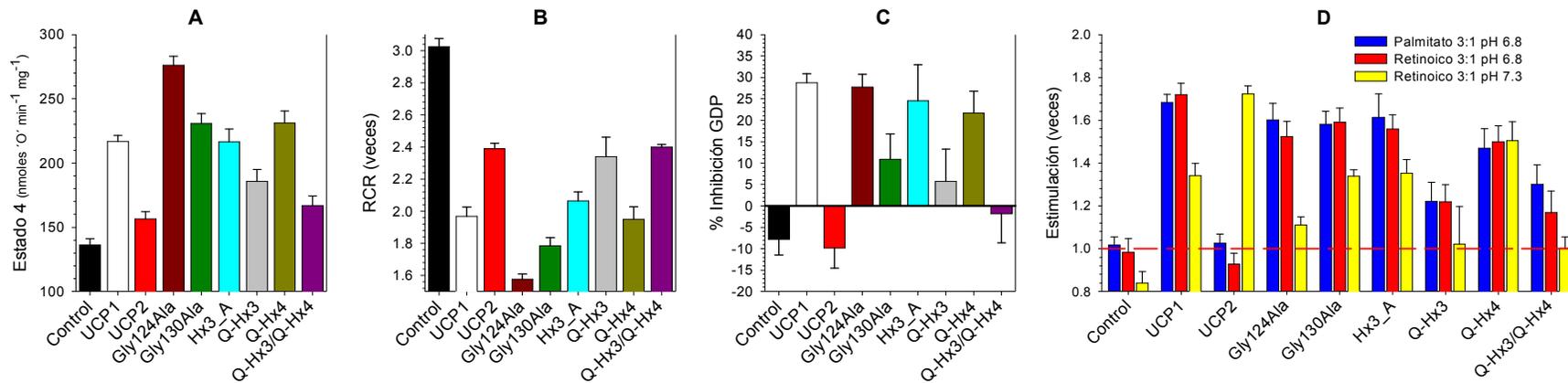


Figura 84 Representación de los principales parámetros bioenergéticos que caracterizan la funcionalidad de las cepas referencia y las quimeras de los segmentos transmembrana de la UCP1. (A) Estados 4 en presencia de NADH 1mM. (B) Cociente de control respiratorio (RCR) calculado en presencia de ADP 0.2 mM. (C). Capacidad de inhibición de los nucleótidos. Los valores se expresan como un porcentaje de inhibición respecto al estado 4 tras la adición de GDP 1mM. (D) Estimulación por ácido palmítico y retinoico 30 μ M. Todos los experimentos se realizaron en un medio de respiración que contenía SAB 10 μ M. Los datos mostrados representan la media de al menos 6 experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM).

	n	Estado 4	pH 6.8	RCR	Inhibición GDP	Respiración Palmitato 3:1	Respiración Palmitato 3:1+GDP	Estimulación Palmitato 3:1	Respiración Retinoico 3:1 pH 6.8	Respiración Retinoico 3:1 +GDP-pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1 pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1 pH 7.3	Tasa de generación (horas)
Control	15	136 ± 4.8	3.02 ± 0.05	-7.8 ± 3.7	139 ± 5.6	145 ± 6.1	1.02 ± 0.04	134 ± 12.6	132 ± 18.1	0.98 ± 0.06	0.84 ± 0.05	3.39 ± 0.09	
UCP1	13	217 ± 4.8	1.97 ± 0.06	28.8 ± 2.1	365 ± 11.6	156 ± 5.3	1.68 ± 0.04	373 ± 18.3	141 ± 8.1	1.72 ± 0.05	1.34 ± 0.06	3.84 ± 0.12	
UCP2	9	157 ± 5.6	2.39 ± 0.03	-9.8 ± 4.7	161 ± 7.5	170 ± 8.8	1.03 ± 0.04	145 ± 10.3	159 ± 12.4	0.93 ± 0.05	1.72 ± 0.04	3.94 ± 0.03	
Gly124Ala	4	276 ± 6.9	1.58 ± 0.03	27.7 ± 3.0	442 ± 35.2	205 ± 8.1	1.60 ± 0.08	421 ± 32.1	212 ± 14.4	1.52 ± 0.07	1.11 ± 0.04	3.74 ± 0.04	
Gly130Ala	5	231 ± 7.7	1.79 ± 0.05	10.9 ± 5.9	365 ± 21.0	213 ± 22.0	1.58 ± 0.06	367 ± 23.0	173 ± 52.5	1.59 ± 0.07	1.34 ± 0.03	3.69 ± 0.17	
Hx3_A	3	217 ± 9.9	2.06 ± 0.06	24.5 ± 8.4	349 ± 27.9	162 ± 16.4	1.61 ± 0.11	338 ± 8.6	164 ± 10.7	1.56 ± 0.07	1.35 ± 0.06	4.09 ± 0.07	
Q-Hx3	3	186 ± 9.2	2.34 ± 0.12	5.7 ± 7.5	227 ± 38.0	175 ± 32.3	1.22 ± 0.19	226 ± 33.8	171 ± 31.3	1.22 ± 0.18	1.02 ± 0.18	3.70 ± 0.05	
Q-Hx4	4	231 ± 9.3	1.95 ± 0.08	21.7 ± 5.1	340 ± 23.1	184 ± 26.9	1.47 ± 0.09	347 ± 15.4	182 ± 10.6	1.50 ± 0.07	1.50 ± 0.09	4.34 ± 0.08	
Q-Hx3/Q-Hx4	3	167 ± 7.4	2.40 ± 0.02	-1.9 ± 6.8	217 ± 13.1	175 ± 18.4	1.30 ± 0.09	195 ± 16.1	135 ± 15.4	1.17 ± 0.10	1.00 ± 0.05	4.74 ± 0.11	

Tabla 19 Resumen de los principales parámetros bioenergéticos que caracterizan la funcionalidad de las cepas control y las quimeras de los segmentos transmembrana de la UCP1. Los valores de respiración y de estado 4 vienen expresados en nmoles $O' min^{-1} mg^{-1}$ de proteína. La inhibición por GDP representa el porcentaje de inhibición de la respiración en estado 4. Todos los datos mostrados en la tabla representan la media de los "n" experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado y van acompañados del error estándar medio (ESM).

estado 4 más próximo al de las mitocondrias UCP2. Lógicamente, los valores de estado 4 mostrados por estas mitocondrias se correlacionan de un modo inverso con sus RCRs. Así, Q-Hx3 y Q-Hx3/Hx4 presentan el RCR más elevado mientras que Gly124Ala y Gly130Ala tienen RCR más bajo.

La gráfica C de la figura 84 nos muestra que únicamente Q-Hx3/Hx4, pierde la regulación por nucleótidos característica de la UCP1. Es importante señalar que tanto Gly130Ala como Q-Hx3 (que incluye a Gly130Ala) presentan una respuesta a nucleótidos claramente disminuida, mientras que ni Gly124Ala, ni Q-Hx3_A, que cambia los primeros aminoácidos del segmento transmembrana III (ver figura 53), presentan ninguna diferencia de sensibilidad a nucleótidos comparándola con la UCP1.

La regulación de la actividad de estas quimeras por ácido palmítico y retinoico (gráfica D de la figura 84) reveló que todas ellas son activadas por los dos ácidos a pH 6,8, si bien se observa que estas activaciones, en las quimeras Q-Hx3 y Q-Hx3/Hx4 son bastante menores. Finalmente, la expresión de estas quimeras sobre la tasa de generación de las levaduras no mostró ningún efecto drástico sobre el crecimiento de éstas (tabla 19).

4.4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS TRANSMEMBRANA DE LA UCP1

4.4.2.1.- Clasificación del fenotipo de las quimeras transmembrana

El análisis comparativo de la respuesta de estas quimeras a la adición de los diferentes reguladores de la UCP1 se muestra en las figuras 85,86 y 87. Los datos revelan que las quimeras transmembrana Q-Hx3 y Q-Hx3/Hx4 tienen una actividad basal y una inhibición por nucleótidos muy por debajo de lo observado en la UCP1 (figura 85.A). De igual modo, la respuesta a retinoico y palmitato de estos dos mutantes es muy inferior a la de la UCP1 (figura 86). El estudio comparado del componente sensible a GDP de estas

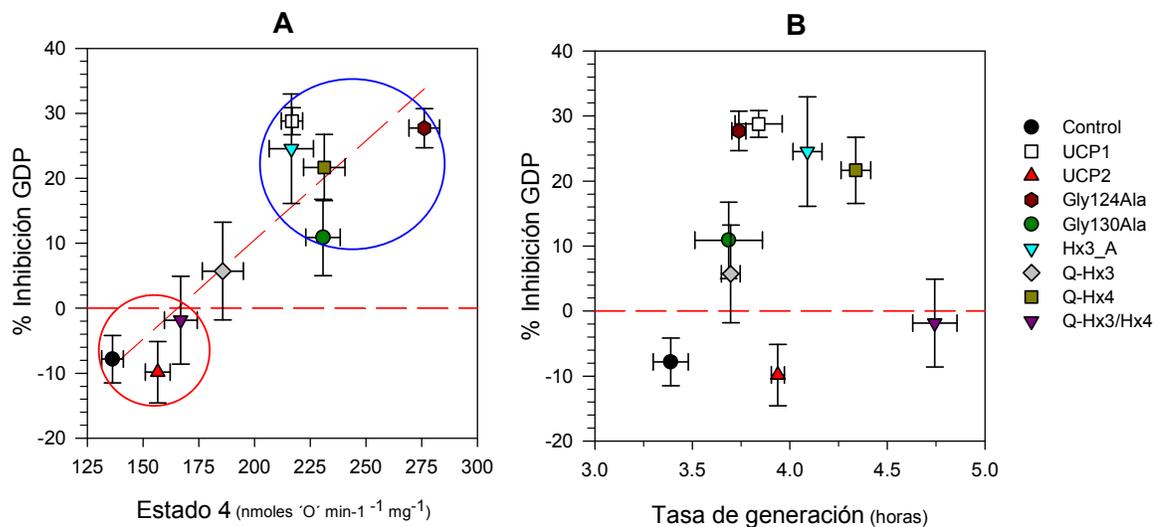


Figura 85 (A) Relación entre los valores de inhibición por GDP y el estado 4 de la respiración obtenidos para las quimeras transmembrana (B) Relación entre la inhibición por GDP y la tasa de generación. Los valores mostrados representan la media de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.

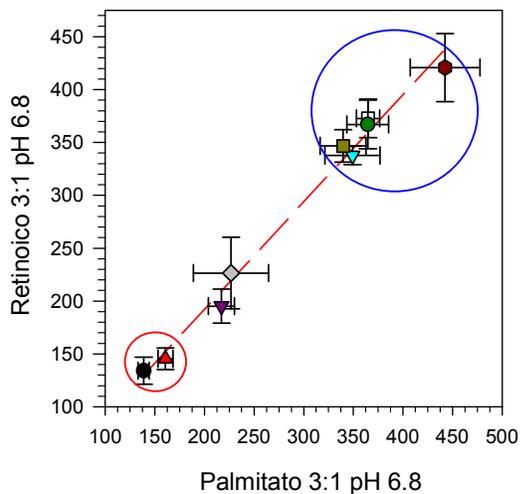


Figura 86 Relación entre los valores de estimulación por ácido palmítico y del retinoico de las cepas referencia y quimeras transmembrana de la UCP1. La leyenda de los símbolos empleados es la misma que la utilizada en la figura 85. Los valores representados vienen expresados en $\text{nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y son la media de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error muestran el ESM de las medidas.

(figura 53). De modo análogo a la que se observó en la sección anterior con el estudio de la Lp2_D, ninguno de los nuevos mutantes explicaba por sí solo el comportamiento de Q-Hx3. Conviene destacar, por otra parte, que el mutante Gly130Ala muestra una respuesta a nucleótidos casi tan baja como la que se observa en Q-Hx3 (figura 84.C). Sin embargo, su respuesta a palmitato y retinoico es muy parecida a la observada en la UCP1 (figura 86).

activaciones por retinoico y palmítico nos indica que, a pesar de lo observado en la figura 85.A, todas las quimeras mantienen una sensibilidad a nucleótidos, aunque en Q-Hx3 y Q-Hx3/Hx4, ésta se encuentra muy disminuida (pero existe) (figura 87.A). Finalmente, ninguna de las quimeras generadas en los segmentos transmembrana muestra una respiración en presencia de retinoico mayor a pH 7.3 que a pH 6.8.

Resulta evidente que los efectos de las mutaciones en Q-Hx3 se encuentran en el origen del comportamiento de la quimera Q-Hx3/Hx4. Para un estudio más detallado del papel del segmento transmembrana III, se generaron tres nuevos mutantes. Los dos primeros analizaron por separado el efecto de las sustituciones de los residuos de glicina (Gly124Ala y Gly130Ala) mientras que el mutante Hx3_A incluía 5 sustituciones

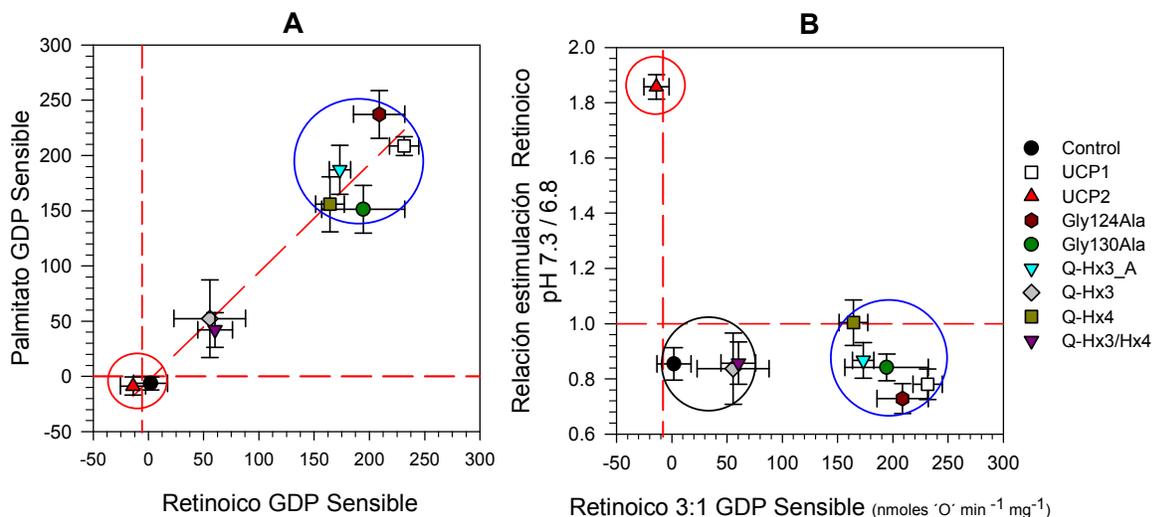


Figura 87 (A) Representación de la relación entre el componente sensible a GDP que muestra la estimulación por ácido palmítico y retinoico. Los valores mostrados se expresan en $\text{nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. **(B)** Relación entre el cociente de la estimulación de la respiración inducida por ácido retinoico a pH 7.3 y 6.8 y el componente sensible a GDP. Los datos muestran los valores medios de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.



La interpretación de los datos de estas quimeras señala que todas ellas presentan un fenotipo UCP1 más o menos modificado. Es importante señalar que el segmento transmembrana IV de la UCP1 es prácticamente idéntico al de la UCP2 (figura 53), por lo que no debe sorprender que los resultados observados en Q-Hx4 revelen que este segmento no es clave en el fenotipo de la proteína. No ocurre lo mismo con el segmento transmembrana III. Las mutaciones introducidas en las quimeras Gly124Ala y Hx3_A no implican un cambio drástico en el fenotipo UCP1, pero la sustitución de la Gly130Ala sí parece ser importante ya que muestra una aparente reducción en la sensibilidad a nucleótidos. Esta disminución no es del todo real ya que esta quimera sigue mostrando un elevado componente sensible a GDP tras su activación por retinoico o palmítico por lo que puede considerarse como tipo UCP1. Es sin embargo cuando se reúnen todas las mutaciones anteriores, y además se sustituyen la valina 125, de la fenilalanina 128 y de la isoleucina 129 por una leucina, alanina y valina respectivamente (Q-Hx3), cuando sí que se provoca una clara disminución en la sensibilidad a GDP y la consecuente pérdida de la actividad. La inclusión de este segmento III en la quimera Q-Hx4 produce una proteína prácticamente inactiva, con lo cual se demuestra que la pérdida de la actividad es progresiva y depende en gran medida del segmento transmembrana III de la UCP1.

4.5.- ESTUDIO FUNCIONAL DE MUTANTES ESTRUCTURALES Y QUIMERAS DE LOS DOMINIOS I Y III DE LA UCP1

La publicación por parte de Lowell, Warden y colaboradores de los resultados que implicaban al segundo dominio en la activación de la UCP1 por ácidos grasos, hizo que nos centrásemos en esa región [Hagen & Lowell, 2000; Chomiki *et al.*, 2001]. Sin embargo, antes de esto, nuestro trabajo de mutagénesis también buscó residuos importantes en los otros dos dominios de la proteína. Así, las primeras quimeras diseñadas en esta tesis apuntaron hacia la región del *loop* I, donde se realizaron dos mutantes, Lp1_A y Lp1_B así como la combinación de Lp1_A con Lp2_C (quimera Lp1_A/Lp2_C).

También se diseñaron mutantes en el *loop* III de la UCP1. En concreto Thr259Arg y Ala264Arg. Ambas quimeras puntuales suponían la sustitución de los residuos treonina 259 y alanina 264, residuos que previamente habían sido identificados por fotoafinidad como implicados en la interacción con el nucleótido [Mayinger & Klingenberg, 1992; Winkler & Klingenberg, 1992]. Para comprobar si la introducción de estos dos residuos cargados que se conservaban en la UCP2, eran la causa de la ausencia de regulación por nucleótidos, se diseñaron estos dos mutantes.

Finalmente, en esta primera etapa también se realizaron tres mutantes puntuales con el fin de completar una serie de trabajos de mutagénesis que se estaban llevando a cabo en nuestro laboratorio [González-Barroso *et al.*, 1999]. En estos trabajos se habían revelado una gran importancia de los residuos que se encuentran en el extremo N-terminal de las hélices II, IV y VI. En particular, la presencia de un residuo de glicina que se encuentra conservado de modo estricto en toda la familia de transportadores parecía clave para la formación de un giro β . La delección de estos residuos de glicina en el

N-terminal de la sexta y cuarta hélice α habían demostrado cambios funcionales drásticos en la UCP1 [González-Barroso *et al.*, 1999]. Con el fin de estudiar el papel de los residuos que determinan la presencia de este giro β se realizaron los mutantes Pro78Val, Gly175Leu y Pro178Val.

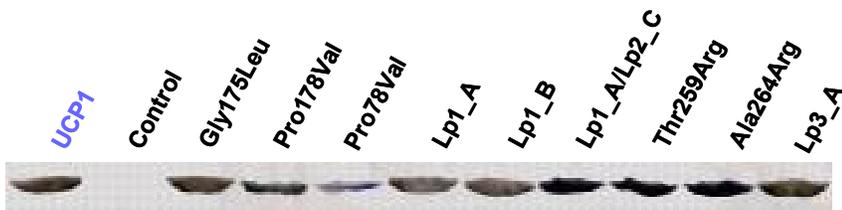


Figura 88 Inmunodetección con anticuerpo anti-UCP1 de las quimeras estructurales y de los dominios I y III de la UCP1. Como cepas controles de ambos experimentos se emplearon las cepas UCP1 y control.

4.5.1.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS

Del mismo modo que para las quimeras antes estudiadas, como método de chequeo de la correcta expresión de las quimeras, se inmunodetectaron por *Western-Blotting*. Los patrones de bandas obtenidos con anticuerpos anti-UCP1 se muestran en la figura 88, y confirman que todas ellas se expresan adecuadamente. Posteriormente se procedió al aislamiento de las mitocondrias y a su estudio en el electrodo de oxígeno. Los resultados se muestran en las figuras 89, 90 y 91.

El estudio de la actividad transportadora basal y el RCR de estos mutantes (figura 90.A) muestra que, salvo Pro78Val, todos los mutantes (Gly175Leu, Pro178Val, Lp1_A, Lp1_B, Lp1_A/Lp2_C, Thr259Arg, Ala264Arg y Lp3_A) tienen una elevada actividad respiratoria basal y en algún caso incluso por encima de los valores característicos de la UCP1. La respuesta a nucleótidos revela que el mutante Gly175Leu es la única proteína que no presenta una regulación de su actividad basal por GDP mientras que Pro78Val parece tener una sensibilidad a GDP disminuida (figura 90.C).

El análisis de la estimulación de la respiración obtenida tras la adición de

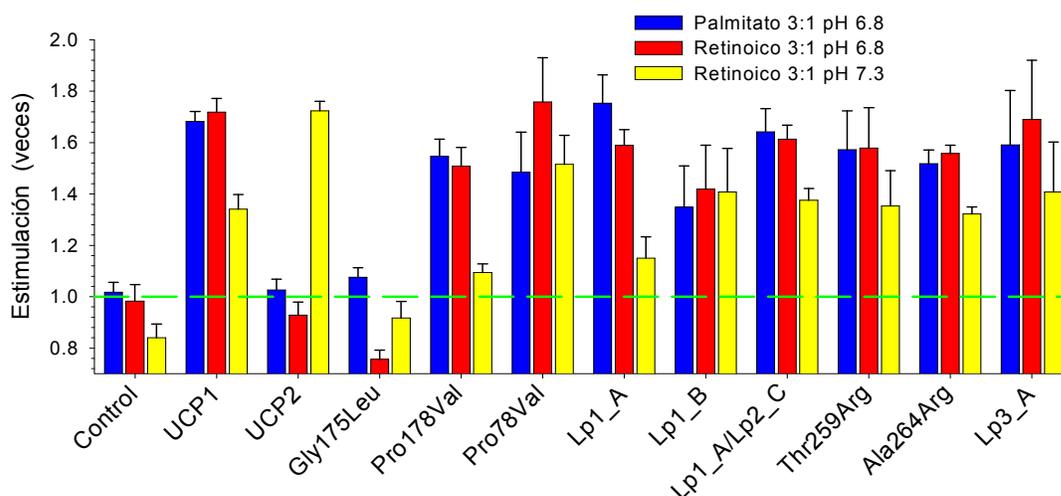
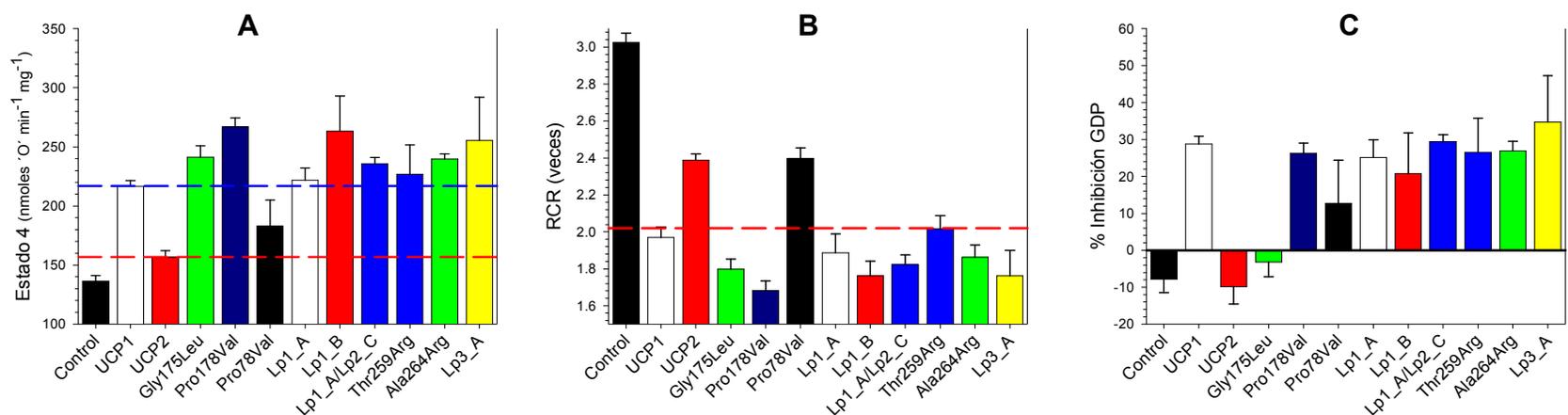


Figura 89 Representación del efecto provocado por la adición de ácido palmítico y retinoico 30 μ M en la respiración. Los valores de estimulación muestran la media de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno de ellos como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el ESM de las medidas.



	n	Estado 4	pH 6.8	RCR	Inhibición GDP	Respiración Palmitato 3:1	Respiración Palmitato 3:1+GDP	Estimulación Palmitato 3:1	Respiración Retinoico 3:1-pH 6.8	Respiración Retinoico 3:1+GDP-pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1-pH 6.8	Estimulación Retinoico 3:1-pH 7.3	Tasa de generación (horas)
Control	15	136 ±	4.8	3.02 ± 0.05	-7.8 ± 3.7	139 ± 5.6	145 ± 6.1	1.02 ± 0.04	134 ± 12.6	132 ± 18.1	0.98 ± 0.06	0.84 ± 0.05	3.39 ± 0.09
UCP1	13	217 ±	4.8	1.97 ± 0.06	28.8 ± 2.1	365 ± 11.6	156 ± 5.3	1.68 ± 0.04	373 ± 18.3	141 ± 8.1	1.72 ± 0.05	1.34 ± 0.06	3.84 ± 0.12
UCP2	9	157 ±	5.6	2.39 ± 0.03	-9.8 ± 4.7	161 ± 7.5	170 ± 8.8	1.03 ± 0.04	145 ± 10.3	159 ± 12.4	0.93 ± 0.05	1.72 ± 0.04	3.94 ± 0.03
Gly175Leu	4	241 ±	9.4	1.80 ± 0.05	-3.2 ± 4.0	260 ± 8.6	248 ± 11.7	1.08 ± 0.04	182 ± 8.2	192 ± 11.4	0.76 ± 0.04	0.92 ± 0.06	5.96 ± 0.21
Pro178Val	4	267 ±	7.6	1.68 ± 0.05	26.3 ± 2.7	413 ± 28.2	203 ± 9.1	1.55 ± 0.07	403 ± 31.4	207 ± 13.5	1.51 ± 0.07	1.09 ± 0.03	3.92 ± 0.17
Pro78Val	4	183 ±	21.8	2.40 ± 0.06	12.7 ± 11.7	272 ± 35.5	157 ± 22.0	1.48 ± 0.16	322 ± 41.4	170 ± 27.9	1.76 ± 0.17	1.52 ± 0.11	3.35 ± 0.07
Lp1_A	3	222 ±	10.3	1.89 ± 0.10	25.2 ± 4.7	389 ± 38.6	167 ± 5.1	1.75 ± 0.11	353 ± 16.2	137 ± 7.2	1.59 ± 0.06	1.15 ± 0.08	3.88 ± 0.14
Lp1_B	6	263 ±	29.7	1.76 ± 0.08	20.8 ± 11.1	355 ± 54.8	192 ± 29.2	1.35 ± 0.16	374 ± 60.8	193 ± 33.0	1.42 ± 0.17	1.41 ± 0.17	3.92 ± 0.10
Lp1_A/Lp2_C	4	236 ±	5.2	1.82 ± 0.05	29.4 ± 1.8	387 ± 37.8	162 ± 6.2	1.64 ± 0.09	380 ± 20.8	139 ± 5.4	1.61 ± 0.06	1.38 ± 0.05	3.04 ± 0.04
Thr259Arg	4	227 ±	25.0	2.02 ± 0.07	26.5 ± 9.2	356 ± 44.1	169 ± 18.3	1.57 ± 0.15	358 ± 46.4	167 ± 22.3	1.58 ± 0.16	1.35 ± 0.14	3.94 ± 0.10
Ala264Arg	4	240 ±	4.2	1.86 ± 0.07	26.9 ± 2.6	364 ± 21.4	177 ± 9.8	1.52 ± 0.05	374 ± 11.1	172 ± 8.7	1.56 ± 0.03	1.32 ± 0.03	3.52 ± 0.05
Lp3_A	4	256 ±	36.6	1.76 ± 0.14	34.7 ± 12.5	406 ± 72.4	173 ± 30.0	1.59 ± 0.21	432 ± 81.0	178 ± 32.0	1.69 ± 0.23	1.41 ± 0.20	3.51 ± 0.07

Figura 90 Representación de los principales parámetros bioenergéticos que caracterizan la funcionalidad de los mutantes y quimeras de los dominios I, II y III de la UCP1. (A) Estados 4 en presencia de NADH 1mM. (B) Cociente de control respiratorio (RCR) calculado en presencia de ADP 0.2 mM. (C) Capacidad de inhibición de los nucleótidos. Los valores se expresan como un porcentaje de inhibición respecto al estado 4 tras la adición de GDP 1mM. Todos los experimentos se realizaron en un medio de respiración que contenía SAB 10 μ M. En la tabla, los valores de respiración y de estado 4 vienen expresados en nmoles $\text{O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. La inhibición por GDP representa el porcentaje de inhibición. Todos los datos mostrados en la tabla representan la media de los "n" experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado y van acompañados del error estándar medio (ESM).



palmítico y retinoico viene mostrado en la figura 89, y nos indica que prácticamente todos los mutantes, excepto Gly175Leu, muestran una activación por palmitato, y retinoico independientemente del pH (figura 89). Gly175Leu constituye la excepción, y muestra a una proteína que no es regulada ni por palmitato ni por retinoico. Además, es destacable su comportamiento en presencia de retinoico a pH 6.8 ya que la inhibición de la respiración basal que esta quimera muestra es de casi el 25%. Curiosamente, el mutante Gly175Leu junto con la quimera Lp1_B muestran una mayor respuesta a retinoico a pH 7.3 que a 6.8.

El análisis del efecto de la expresión de estos mutantes en el crecimiento de las levaduras reveló que el mutante Gly175Leu mostraba un severo retraso en el crecimiento (5.96 ± 0.21 horas). El resto de las mutaciones no causaron ningún efecto sensible sobre el crecimiento (figura 91).

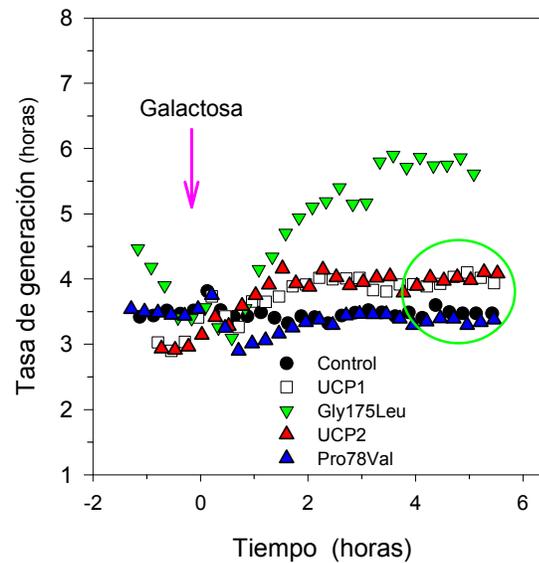


Figura 91 Curvas de crecimiento obtenidas para las cepas Gly175Leu, Pro78Val y cepas referencia. Se omite la representación del resto de curvas por presentar unos valores similares a los mostrados por las cepas referencia. Todos sus valores se muestran en la figura 90. Los datos mostrados son representativos y pertenecen a uno de los al menos 4 experimentos independientes realizados en cada caso.

4.5.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES ESTRUCTURALES Y DE LAS QUIMERAS DEL *LOOPI* Y *III* DE LA UCP1

4.5.2.1.- Clasificación del fenotipo de las quimeras de la UCP1

La figura 94.A representa la relación entre la inhibición por GDP y la respiración basal de las quimeras de esta sección. Su análisis muestra que la mayoría de ellas se caracterizan por un estado 4 elevado y una inhibición por nucleótido muy similar a la de mitocondrias UCP1 (Pro178Val, Lp1_A, Lp1_B, Lp1_A/Lp2_C, Thr259Arg, Ala264Arg y Lp3_A). Las excepciones las constituyen Gly175Leu y Pro78Val. En el caso de la primera se observa que mientras mantiene un estado 4 similar al de UCP1 no muestra ninguna regulación por nucleótido. Esta observación, junto con su alta tasa de generación que muestra, implica que nos encontramos con una proteína de fenotipo desregulado (figura 94.B). Pro78Val, por su parte, presenta una menor inhibición por GDP pero concordante con un estado 4 sensiblemente inferior al de las mitocondrias UCP1, y con una tasa de generación similar (figura 94).

El estudio de la relación entre las respiraciones en presencia de retinoico y palmítico nos reveló unos resultados análogos a los anteriores (figura 92). La mayor parte de los mutantes tienen una respuesta normal a ambos reguladores mientras que Gly175Leu se desvía de este patrón. Los datos de la figura 92 son, en este caso, algo engañosos ya que en éstos la aparente alta respiración en presencia de palmitato se debe

fundamentalmente a una alta respiración basal (figura 90.A). Destacar que Pro78Val muestra una respuesta a palmítico y retinoico que es sensible a GDP por lo que los efectos antes descritos reflejaban exclusivamente una disminución de la actividad basal de la proteína y por lo tanto su fenotipo puede considerarse como UCP1 (figura 95.A). Este mismo fenotipo es el de los mutantes Pro178Val, Thr259Arg, Ala264Arg y las quimeras Lp1_A, Lp1_B y Lp1_A/Lp2_C.

Según los resultados obtenidos es claro que Gly175Leu, tiene un importante papel estructural en la UCP1 ya que la sustitución en este caso de la glicina por una leucina, o su delección en el caso de los trabajos previos del laboratorio, provoca una proteína activa pero carente de regulación y con un fuerte efecto deletéreo [González-Barroso *et al.*, 1999]. De igual modo, se demuestra que los residuos marcados por fotoafinidad treonina 259 y 264 (alanina 264 en la UCP1 de rata) no son esenciales para la unión del GDP a la UCP1 ya que su sustitución por los residuos homólogos de la UCP2 no destruye ni modifica sensiblemente, a pesar de introducir un residuo cargado, la regulación por nucleótidos de la proteína.

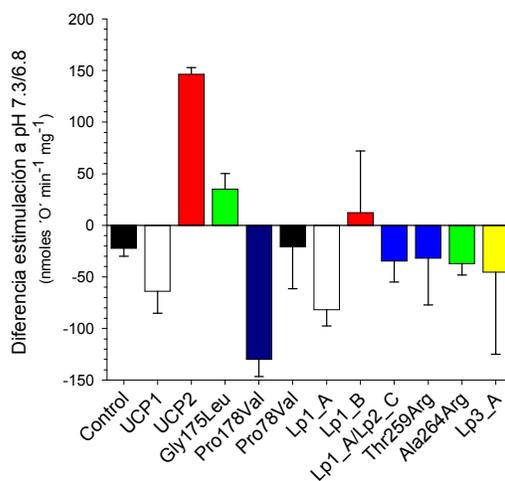


Figura 93 Representación de la diferencia de estimulación por retinoico 30 μ M a los diferentes pHs de las quimeras de los dominios I, II y III de la UCP1. Los valores de respiración muestran la media de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno de ellos como mínimo por duplicado.

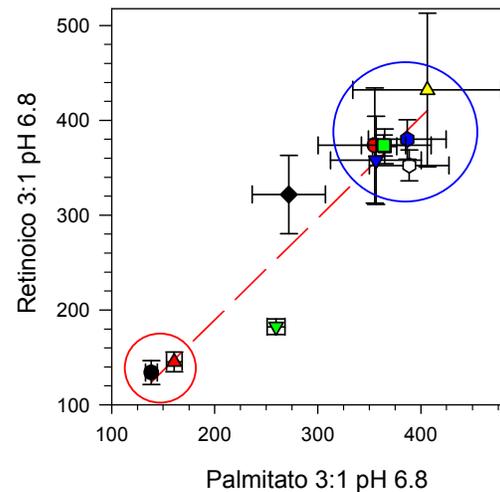


Figura 92 Relación entre los valores de estimulación de la respiración del ácido palmítico y del retinoico de las cepas controles y quimeras estudiadas en este grupo. La leyenda de los símbolos empleados es la misma que la utilizada en la figura 92. Los valores representados vienen expresados en $\text{nmoles } \text{O} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y son la media de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error muestran el ESM de las medidas.

El resto de las quimeras generadas no provocaron ningún efecto drástico sobre la actividad de la proteína. Únicamente Pro78Val generó una proteína con un aparente menor sensibilidad a GDP, pero la observación de un elevado componente sensible a GDP hace que se la considere como una UCP1 con un bajo estado 4. Esto explicaría su aparente menor sensibilidad a GDP. Finalmente Lp1_A, Lp1_B, Lp1_A/Lp2_C, y Lp3_A son quimeras que mantienen de un modo claro el fenotipo UCP1 por lo que no pueden considerarse como claves para las propiedades características de la UCP1.

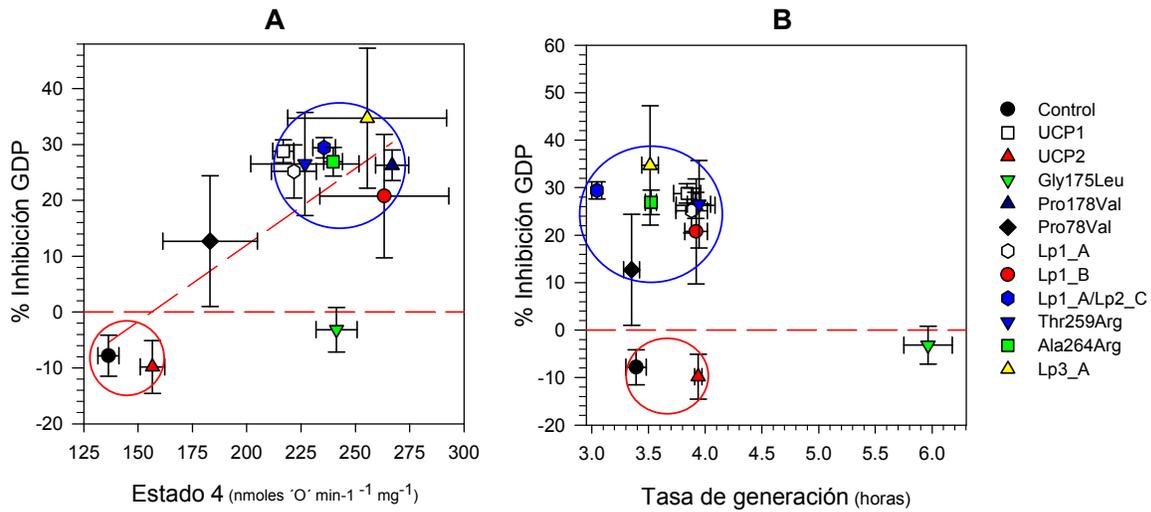


Figura 94 (A) Relación entre los valores de inhibición por GDP y el estado 4 de la respiración obtenidos para los mutantes estructurales y las quimeras de los dominios I, II y III de la UCP1 (B) Relación entre la inhibición por GDP y la tasa de generación de las cepas estudiadas. Los valores mostrados representan la media de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.

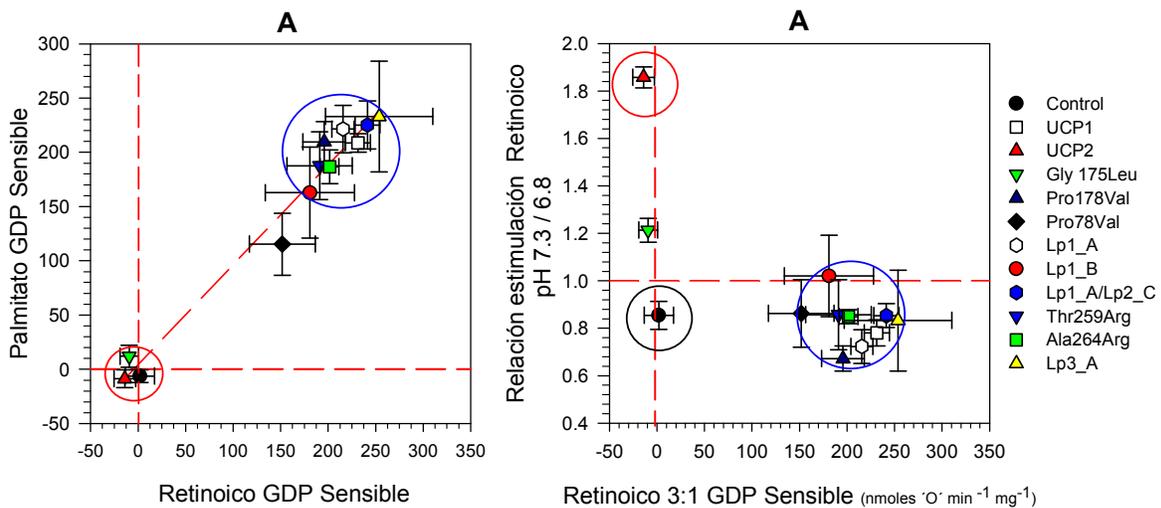


Figura 95 (A) Representación de la relación entre el componente sensible a GDP que muestra la estimulación por ácido palmítico y retinoico. Los valores mostrados se expresan en nmoles O' min⁻¹ mg⁻¹. (B) Relación entre el cociente de la estimulación de la respiración inducida por ácido retinoico a pH 7.3 y 6.8 y el componente sensible a GDP. Los datos muestran los valores medios de al menos tres experimentos independientes realizados como mínimo por duplicado. Las barras de error representan el error estándar medio (ESM) de ambas medidas.



1.- LA ACTIVIDAD DE LA UCP1 EN AUSENCIA DE ÁCIDOS GRASOS

Los primeros experimentos que muestran que las mitocondrias de TAP aisladas presentan una respiración desacoplada datan de finales de los 50 [Lepkovsky *et al.* 1959], pero no fue hasta 1966 cuando se correlacionó este desacoplamiento con la actividad termogénica del TAP [Smith *et al.*, 1966]. Poco después se demostró que el factor causante de esta menor eficiencia afectaba específicamente al TAP [Lindberg *et al.*, 1967] y que no era consecuencia de una pérdida de la maquinaria de fosforilación oxidativa [Guillory & Racker, 1968; Pedersen *et al.*, 1968; Aldridge, 1968]. Todos estos experimentos ya señalaban una mayor sensibilidad a ácidos grasos de las mitocondrias de TAP en comparación con las de hígado o cerebro y remarcaban la necesidad de la adición de albúmina para remover los restos de ácidos grasos libres. Un año después se demostró que en presencia de albúmina era necesaria la adición de ATP o GDP a las incubaciones de mitocondrias de TAP para que la eficiencia de la fosforilación oxidativa de estas mitocondrias fuese óptima [Rafael *et al.*, 1969].

La principal función del TAP es la de llevar a cabo el proceso de termogénesis, proceso que se ha asociado históricamente a la movilización y oxidación de los ácidos grasos [revisión Smith & Howitz, 1969]. Hacia finales de los 60, la rica inervación simpática del TAP hizo que se propusiera una probable regulación hormonal de la termogénesis. Así, la termogénesis se desencadena tras la estimulación del sistema nervioso simpático por situaciones de frío, dieta rica en lípidos... Esto provoca la liberación de noradrenalina en las terminales nerviosas que se encuentran en el TAP donde se unirá a los receptores β de la membrana de los adipocitos. Se activa entonces una secuencia de reacciones enzimáticas que desencadenan una cascada lipolítica y la producción de calor (ver sección 1.2.3 de Introducción). La demostración de la correlación directa entre la conductancia a H^+ de las mitocondrias de TAP y la concentración de ácidos grasos fue la prueba final de que los ácidos grasos eran reguladores fisiológicos de la UCP1 [Locke *et al.*, 1982a; 1982b; Cunningham *et al.*, 1986]. La consecuencia final de la acción de los ácidos grasos en los adipocitos del TAP, será el desacoplamiento de la respiración de las mitocondrias que expresen UCP1, lo que permitirá una oxidación más rápida de los mismos y la liberación de energía en forma de calor.

La capacidad de los ácidos grasos de desacoplar la fosforilación oxidativa en todo tipo de mitocondrias fue observada por primera vez por Pressman y Lardy [1952]. Estos primeros resultados mostraron que las altas concentraciones de ácidos grasos provocaban un efecto detergente sobre las mitocondrias, sin embargo, disminuyendo su concentración parecía que ejercían un efecto protonóforo similar al que muestran los desacoplantes clásicos [revisión Wojtczak, 1976]. Este efecto protonóforo requería de un movimiento a través de la membrana interna (*flip-flop*) en el cual la forma protonada del ácido graso pasaba de la cara citosólica a la matricial liberando un H^+ y después regresaba en forma aniónica a la cara citosólica. Sin embargo, mientras que el *flip-flop* de la forma protonada es extremadamente rápido, la tasa de *flip-flop* de la forma aniónica es bastante lenta [revisión Hamilton, 1998] por lo que este mecanismo no podía explicar el desacoplamiento provocado por los ácidos grasos.

Un importante descubrimiento tuvo lugar en 1988 cuando Skulachev y colaboradores observaron que el carboxiatractilato podía inhibir parcialmente el



desacoplamiento inducido por el palmitato en mitocondrias de hígado [Andreyev *et al.*, 1988; 1989]. Esto fue interpretado como una participación del AAC en el mecanismo de desacoplamiento de modo que el transportador facilitaría el movimiento de la forma aniónica del ácido graso a través de la membrana [Skulachev, 1991]. Poco después se describió que otros transportadores mitocondriales como el DiC [Wieckowski & Wojtzack, 1997] el AGC [Smartsev *et al.*, 1997] o el PiC [Zackova *et al.*, 2000] también podían facilitar la translocación de este anión. Todos estos datos se han interpretado como una indicación de que este desacoplamiento mediado por los transportadores podría intervenir en procesos fisiológicos como la termorregulación [Skulachev, 1991] o el control de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) [Korshunov *et al.*, 1998]. La propuesta original de Skulachev [1991] se plasmó en lo que se ha denominado "teoría del ciclaje de los ácidos grasos", que propone que la forma protonada de los ácidos grasos liberaba un H⁺ en la matriz tras hacer *flip-flop* y que los transportadores mitocondriales facilitaban el regreso de la forma aniónica a la cara citosólica (figura 15). La elevada permeabilidad a haluros y otros aniones de la UCP1 (ver sección 3.3.1 de Introducción), inhibible por nucleótidos, así como la considerable homología de esta proteína con el resto de transportadores mitocondriales, hizo que el modelo del mecanismo de ciclaje se extendiese también a la UCP1 [Jezek & Garlid, 1990].

Como se ha dicho anteriormente, experimentos de los años 60 ya habían revelado una mayor sensibilidad de las mitocondrias de TAP a los ácidos grasos. Los grupos de Nicholls y Rial han mostrado en varios trabajos la correlación existente entre la presencia de UCP1 y el aumento de la sensibilidad a los ácidos grasos [Locke *et al.*, 1982b; Rial & Nicholls, 1984; Cunningham *et al.*, 1986; González-Barroso *et al.*, 1998]. Así, por ejemplo, se ha demostrado que en mitocondrias de levaduras que expresan UCP1 se requerían concentraciones nanomolares de ácidos grasos para inducir un aumento de la respiración, mientras que para obtener el mismo efecto mediante el transporte de ácidos grasos dependiente de los transportadores (mitocondrias control sin UCP1) las concentraciones eran dos o tres órdenes superiores (micromolares) [González-Barroso *et al.*, 1998].

Niveles elevados de ácidos grasos son complicaciones generales de enfermedades como la obesidad, diabetes, etc. Su acumulación provoca efectos tóxicos que causan la interrupción de los procesos celulares normales y pueden eventualmente desembocar en el inicio de la cascada apoptótica (lipoapoptosis) [Schönfeld & Bohnenensack, 1997; De Pablo *et al.*, 1999]. Tradicionalmente se ha ligado la lipoapoptosis a una ruta dependiente de ceramida, pero la oxidación de los ácidos grasos incrementa los niveles de ROS y esto también puede desembocar en la apoptosis. Recientemente se ha demostrado que los ácidos grasos son capaces de inducir la apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP). Este efecto es sensible a ciclosporina y no requiere la acción protonófora de los ácidos grasos [Bernardi *et al.*, 2002]. Conviene recordar (ver sección 3.6 de Introducción) que los transportadores mitocondriales tienen la capacidad de transformar su mecanismo transportador a otro con propiedades tipo poro/canal [revisión Arechaga *et al.*, 2001]. La demostración de la inducción de la apertura del PTP por los ácidos grasos abre la posibilidad de que el transporte de ácidos grasos que observan algunos autores al estudiar estos transportadores sea debido, más que al transporte específico de la forma aniónica, a la transformación del mecanismo de estas proteínas a una cinética de tipo poro [Rial & González-Barroso, 2001]. Así, estos transportadores actuarían en la mitocondria como sensores de concentraciones elevadas de sustancia dañinas para la célula (ROS, NO, ácidos grasos,...) o de situaciones



energéticamente críticas (bajo potencial de membrana, disminución de los niveles de ATP, alcalinización de la matriz, aumento de los niveles de Ca^{2+} ...) provocando la apertura del PTP y el comienzo de la apoptosis [Ledesma & Rial, 2004].

La actividad transportadora de la UCP1 en ausencia de ácidos grasos es una cuestión de gran importancia debido a sus profundas implicaciones en el mecanismo molecular de transporte. Si el desacoplamiento observado en las mitocondrias del TAP residiese en la actividad transportadora de ácidos grasos de la UCP1, en su ausencia, no deberíamos observar desacoplamiento. Si por el contrario, la UCP1 es un transportador de H^+ y los ácidos grasos son simplemente su activador, no serían esenciales para la actividad de la proteína. Como antes citamos, Rafael y colaboradores señalaron en 1969 que para obtener mitocondrias acopladas no sólo era necesario retirar los ácidos grasos de las preparaciones de TAP, sino que además había que añadir nucleótidos. Sin embargo, en 1998 Garlid y colaboradores afirmaron que la observación de mitocondrias de TAP parcialmente desacopladas en presencia de albúmina y en ausencia de nucleótidos, era indicativo de la existencia residual de ácidos grasos unidos a las membranas mitocondriales. Estos ácidos grasos se unen presumiblemente a las mitocondrias durante la homogenización y, debido a un fenómeno de histéresis, la albúmina era incapaz de eliminarlos a posteriori. Estos autores defendieron que, si se mantenía albúmina durante la homogenización y el aislamiento, el desacoplamiento de estas mitocondrias se hacía indetectable [Garlid *et al.*, 1998]. Los datos que apoyaban estas afirmaciones no se presentaron en este trabajo y una publicación que citaban tampoco los contenían [Jezek *et al.*, 1994]. Tampoco hacía referencia a investigaciones que datan de los años sesenta en las cuales se habían realizado aislamientos de mitocondrias de TAP en presencia de hasta 25 mg/ml de albúmina sin haber obtenido un incremento significativo en el rendimiento de la fosforilación oxidativa de esas mitocondrias [Smith & Howitz, 1969].

Los experimentos descritos en esta memoria, en los que se han empleado durante la homogenización concentraciones de albúmina de hasta 50 mg/ml y se han tomado precauciones adicionales para minimizar la presencia de ácidos grasos endógenos, revelan que las mitocondrias de TAP en ausencia de nucleótidos muestran una tasa de respiración muy similar a la que se observa en presencia de FCCP. La tasa de respiración inicial observada dependerá de la concentración de UCP1. Para nuestros experimentos utilizamos hámsteres mantenidos a 6°C durante 10-14 días antes de su sacrificio, por lo que su contenido en UCP1 debe encontrarse en torno a 1 nmol/mg de proteína [Rial *et al.*, 1983]. Los bajos niveles de desacoplamiento referidos por Garlid y colaboradores podrían explicarse si, como parece, hubieran empleado hámsteres mantenidos a temperatura ambiente.

Estos experimentos revelan un aspecto crítico sobre la actividad de la UCP1 que debe ser entendido completamente. La tasa de respiración observada en ausencia de nucleótidos es, como antes dijimos, casi idéntica a la tasa de respiración observada en presencia de un desacoplante. Sería posible que, incluso después de un aislamiento en presencia de elevadas concentraciones de albúmina, hubiéramos sido incapaces de eliminar las últimas trazas de ácidos grasos. Sin embargo, la pregunta importante en este caso sería por qué la actividad respiratoria es máxima. Dos posibilidades podrían responder a esta cuestión:

- 1-. Que los restos de ácidos grasos representen todavía una concentración saturante y



ésto cause que la UCP1 refleje una actividad máxima

De ser este el caso, surgirían dos nuevos interrogantes: cuál es la K_m de los ácidos grasos y por qué estos ácidos grasos no se equilibran con la albúmina. La respuesta podría ser que la afinidad ácido graso-UCP1 es tan alta que los ácidos grasos permanecen unidos a la UCP1 y no se equilibran con la fase lipídica de la membrana por lo que tampoco pueden ser eventualmente retirados por la albúmina. Esta explicación haría difícil entender la regulación fisiológica de la termogénesis en el TAP en la que los ácidos grasos juegan el papel de segundos mensajeros de la noradrenalina. Además, este hecho contradeciría directamente la "teoría del ciclaje de los ácidos grasos", ya que se precisa un equilibrio entre el ácido graso y la membrana para que se pueda producirse el *flip-flop*. En cualquier caso, esta K_m tan extremadamente baja no se corresponde con los valores experimentales obtenidos [Cunningham *et al.*, 1986].

2.-. Que en ausencia de nucleótidos añadidos la UCP1 tenga una elevada conductancia a protones que sea independiente de la presencia de ácidos grasos

Esta posibilidad es la que se deduce de los resultados de los primeros experimentos con mitocondrias de TAP en los que se observa una elevada conductancia a H^+ que tiene un comportamiento óhmico [Nicholls, 1977]. Nuestro laboratorio ha defendido esta propiedad de la UCP1 desde hace años. Destacar, sin embargo, que si bien el transporte de H^+ independiente de los ácidos grasos es un proceso mecanísticamente importante, fisiológicamente es irrelevante ya que en condiciones fisiológicas el citosol del adipocito pardo presenta unos niveles de nucleótidos que mantienen inhibido el transporte de H^+ a través de la UCP1. Sólo en presencia de ácidos grasos habrá termogénesis.

La magnitud del componente sensible a GDP de la tasa respiratoria puede utilizarse para analizar la actividad de la proteína. Así, en hámsteres adaptados al frío, sus mitocondrias muestran una concentración de 1 nmol de UCP1/mg de proteína mitocondrial que es responsable de una actividad respiratoria de 300 nmoles O $min^{-1}mg^{-1}$ (media de los valores presentados en la tabla 16). La estimación de la actividad transportadora de protones de estas mitocondrias es de 40 μ moles H^+ $min^{-1}mg^{-1}$ a una temperatura de 30°C, valor que probablemente se encuentre subestimado ya que la tasa respiratoria está limitada por la actividad de la cadena respiratoria y en ausencia de nucleótidos el potencial de membrana que se observa es menor. De hecho, la tasa respiratoria en presencia de FCCP es la misma [Nicholls, 1974a; Rial & Nicholls, 1984]. De acuerdo con esta afirmación, Rial *et al.* demostraron que en conejillos de indias mantenidos a 28°C el contenido de UCP1 es de 0.10 nmoles/mg, y que pasa a 0.73 nmoles/mg tras 18 días mantenidos a 6°C. En las mitocondrias de TAP de los conejillos de indias adaptados al frío, la actividad de la UCP1 es de 70 μ moles H^+ $min^{-1}mg^{-1}$ y pasa a 120 μ moles H^+ $min^{-1}mg^{-1}$ en los animales no adaptados donde el contenido de UCP1 es menor, el potencial de membrana se mantiene más alto y la oxidación de sustrato no será limitante.

La existencia de una actividad basal (en ausencia de ácidos grasos) en la UCP1 expresada en levaduras fue cuestionada por parecer muy baja [Garlid *et al.*, 1998]. *S. cerevisiae* había sido elegida por nuestro grupo como sistema modelo para el estudio de la actividad basal de la UCP1 debido a que las levaduras no contienen depósitos de triglicéridos que podrían interferir en experimentos en los que se persiguiese estudiar la actividad de la UCP1 en ausencia de ácidos grasos [González-Barroso *et al.*, 1998]. La concentración de UCP1 presente en las mitocondrias de las levaduras recombinantes que



usamos rutinariamente en nuestros experimentos se encuentra en torno a 0.17 nmoles/mg de proteína [Arechaga *et al.*, 1993]. Cuando añadimos GDP a estas mitocondrias la disminución de la tasa respiratoria que se observa es de 62 ± 5 nmoles O^{\cdot} $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, lo que se corresponde con una actividad de la UCP1 de $33 \mu\text{moles H}^+ \text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ a 20°C. Esta actividad, aunque es menor, no se encuentra demasiado lejos de la determinada en TAP y si tenemos en cuenta las diferencias en la temperatura de los ensayos, los valores se hacen aún más equiparables.

2.- NATURALEZA DEL SITIO DE UNIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA UCP1

La investigación de la especificidad de los activadores de la UCP1 puede aportar una valiosa información que ayude a revelar el mecanismo de activación de la UCP1. En principio, los requerimientos estructurales de los activadores de la UCP1 no parecen ser muy exigentes. Cualquier compuesto aniónico monovalente con una hidrofobicidad suficiente que le permita una cierta solubilidad en medio lipídico puede activar la UCP1 [Rial *et al.*, 1983, revisión Klingenberg & Huang, 1999]. Sin embargo, existen discrepancias en los datos de las sustancias activadoras publicadas hasta el momento. Un segundo carboxilato en posición ω parece ser tolerado en manos de algunos autores [Klingenberg & Huang, 1999], pero no en las de otros [Jezek *et al.*, 1997]. Lo mismo ocurre al analizar la presencia de anillos aromáticos en la molécula. Existe consenso en que se permite la presencia de grupos voluminosos a lo largo de la molécula pero no ocurre lo mismo si éstos se encuentran al final de la cadena. Por un lado Jezek *et al.* mostraron que el 4-heptil-benzoico incrementaba el transporte de H^+ mediado por la UCP1 en liposomas, mientras que el 6-fenil-hexanoico no lo hacía [Jezek *et al.*, 1997]. Sin embargo, Klingenberg *et al.*, trabajando también con liposomas, observaron que el 6-fenil-hexanoico mostraba un transporte de protones moderado, que se incrementaba al emplear el 8-fenil-octanoico [Klingenberg & Huang, 1999]. Finalmente nuestro grupo ha demostrado que el ácido *todo-trans* retinoico es un potente activador de la UCP1 a pesar de la presencia de un anillo lejos del carboxilato [Rial *et al.*, 1999]. En la presente memoria, hemos analizado la activación de la UCP1 con una serie de compuestos que poseen grupos aromáticos en mitocondrias aisladas de TAP. Confirmamos la tolerancia a la presencia de un anillo aromático próximo al carboxilo (4-heptil-benzoico) y su falta de actividad cuando se encuentra en el extremo opuesto (6-fenil-hexanoico). Sin embargo, el patrón no es tan sencillo ya que, como se ha dicho anteriormente, tanto el ácido *todo-trans* retinoico como el retinoide TTNPB son potentes activadores de la UCP1 a pesar de que poseen grupos voluminosos alejados del grupo carboxilo (ver figura 43).

La necesidad del carboxilo libre ha sido observada por diferentes grupos y se interpreta como reflejo de una implicación directa de éste en el mecanismo de transporte de H^+ de la UCP1 [Rial *et al.*, 1983; Winkler & Klingenberg, 1994; Jezek *et al.*, 1997]. Recientemente Ehtay *et al.* [2003] han propuesto un nuevo mecanismo de regulación que implica la modificación covalente de la proteína. Estos autores han sugerido que la activación por compuestos como el ácido retinoico o el TTNPB se debe a la reacción del grupo funcional 2-alquenal con algún residuo de la proteína que hace que aumente su conductancia a H^+ . Para estos autores, el 4-hidroxi-2-nonenal y el retinal también son activadores a pesar de no contar con un carboxilo libre. Los efectos no son específicos sobre la UCP1 y se observan también en la UCP2, UCP3 e incluso sobre el AAC. Cabe



pensar que, de nuevo, nos encontramos con efectos que pueden implicar cambios en las propiedades nativas de todos estos transportadores.

Existe una cierta tolerancia hacia la inclusión de grupos hidrofílicos en la estructura del activador, siempre que se mantenga la solubilidad en el medio lipídico [Winkler & Klingenberg, 1994; Jezek *et al.*, 1997]. Sin embargo, la observación presentada en esta memoria de que la sustitución del propenilo central del TTNPB por un grupo amida en el AM580 lleva a una pérdida total de la capacidad de activación (ver estructura en la figura 43), parecería entrar en contradicción. Posiblemente la rigidez de estos retinoides impide que, en este caso, el grupo polar introducido pueda ser acomodado en el centro de unión.

En 1997 Jezek *et al.* estudiaron la correlación entre la capacidad de activación de la UCP1 y capacidad de esos mismos compuestos de hacer *flip-flop* en liposomas carentes de proteínas. Observaron que aquellos que eran incapaces de activar el transporte de H⁺ a través de la UCP1 tampoco hacían *flip-flop*. Remarcaron el hecho de que la presencia de uno o más anillos de benceno lejos del carboxilo impedía el *flip-flop* y lo interpretaron como consecuencia de su considerable volumen. Un año después, Wojtczak *et al.* apoyaron estas afirmaciones [1998]. Estos experimentos parecían confirmar la "teoría del ciclaje de los ácidos grasos" como mecanismo de activación de la UCP1. Los datos presentados en esta memoria que demuestran una potente activación de la respiración observada al añadir TTNPB y retinoico, compuestos que presentan anillos voluminosos, parece contradecir estas afirmaciones. Debe reseñarse también que Klingenberg & Huang [1999] han encontrado que el ácido ω -glucopiranosil-palmitico activa la UCP1 y, debido a la voluminosidad de su sustituyente, éste tampoco debería realizar *flip-flop*.

Debemos mencionar aquí, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio que demuestran que el undecanosulfonato (C11S) activa la UCP1 [Rial *et al.*, 2004]. Los alquilsulfonatos habían sido considerados como una de las principales pruebas a favor de la teoría del ciclaje, debido a que son compuestos que presentan un elevado parecido a los ácidos grasos, pero al ser el pK_a del grupo sulfónico mucho menor que el del grupo carboxilo, no se protonan a pH fisiológico y por tanto son incapaces de hacer *flip-flop*. Estos autores demostraron que en proteoliposomas que contienen UCP1, el C11S es transportado pero no se aumenta la permeabilidad a H⁺ [Garlid *et al.*, 1996]. Apoyando estas observaciones, realizaron experimentos en condiciones de respiración con mitocondrias de TAP en los que afirmaron que en presencia de propranolol el undecanosulfonato formaba un par iónico neutro que era capaz de atravesar la membrana permitiendo el transporte de H⁺. Sólo así el undecanosulfonato conseguía completar el ciclo protonofórico y provocar por tanto el desacoplamiento de la respiración [Jaburek *et al.*, 2001]. Sin embargo, estos autores no mostraron los resultados obtenidos con el C11S en ausencia de propranolol. Nuestro grupo repitió estos experimentos y demostraron que la adición única de C11S, sin necesidad de propranolol, era capaz de inducir la permeabilidad a H⁺ sensible a GDP [Rial *et al.*, 2004]. Como es evidente que el C11S no puede hacer *flip-flop*, la "teoría del ciclaje de los ácidos grasos" no puede ser el mecanismo de activación de la UCP1.

La hipótesis alternativa para el mecanismo de activación de la UCP1 señala a los ácidos grasos como un grupo prostético de la UCP1 necesario para la estimulación del transporte de H⁺ a través de la UCP1. En este modelo el grupo carboxilo del ácido graso



sería el encargado de ceder los H⁺ captados en el lado citosólico a otro residuo situado dentro de la UCP1, desde el cual se produciría la translocación al lado matricial [Winkler & Klingenberg, 1994]. Este sería un mecanismo de transporte de H⁺ que recordaría al descrito en la bacteriorodopsina [Lanyi, 1993].

Finalmente, la naturaleza química de algunos de los activadores de la UCP1 puede sugerir algunas características que debería presentar su sitio de unión. Así, compuestos activadores de la UCP1 como el ácido retinoico o el TTNPB son moléculas que se caracterizan por un perfil hidrofóbico claro y una gran rigidez. Cabe imaginar que el acceso al sitio de unión debería producirse desde la membrana lipídica por un proceso de difusión lateral y requeriría la existencia de un bolsillo de unión de cómo mínimo 15 Å de largo. El descubrimiento de la ubiquinona como un cofactor esencial para la activación de la UCP1 [Echtay *et al.*, 2000b] así como la observación de su capacidad facilitadora de la unión del ácido retinoico a la proteína [Tomás *et al.*, 2002] son argumentos que apoyan la idea del acceso al centro de unión desde la fase lipídica de la membrana interna mitocondrial.

3.- REGIONES DE LA UCP1 IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE SU ACTIVIDAD TRANSPORTADORA

Las proteínas desacoplantes (UCPs) son proteínas de membrana que constituyen una subfamilia dentro de la familia formada por los transportadores mitocondriales de metabolitos (ver Introducción) [Palmieri, 2004]. Como se dijo anteriormente, muestran una estructura tripartita compuesta por tres repeticiones de unos 100 residuos conectadas por cortos *loops*, cada una de las cuales contiene dos segmentos transmembrana y un *loop* matricial donde se encuentra el motivo característico de los transportadores mitocondriales. Los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína se encuentran orientados hacia el espacio intermembranal. Dentro de la subfamilia de las UCPs se han identificado en mamíferos cinco proteínas homólogas [Ledesma *et al.*, 2002b]. La homología existente entre las tres proteínas más estudiadas (UCP1, UCP2 y UCP3) llevó a proponer en un principio una función desacoplante similar para todas ellas pero con una distribución peculiar en los distintos tipos celulares lo que conllevaría una función específica según su contexto fisiológico. Hoy en día el papel fisiológico está todavía sujeto a discusión (ver sección 4.4 de la Introducción).

El trabajo presentado en esta memoria se ha centrado en el estudio de la UCP1 pero se han utilizado las divergencias con la secuencia de la UCP2 para poder estudiar regiones en la UCP1 que pudieran estar implicadas en conferir sus propiedades específicas. Mientras que la regulación de la UCP1 por retinoides, ácidos grasos y nucleótidos es un aspecto bien establecido, no ocurre lo mismo en el caso de la UCP2. La tendencia generalizada sitúa a la UCP2 como una proteína desacoplante, aunque a la hora de establecer sus posibles reguladores los datos existentes son contradictorios.

Existen un número creciente de trabajos que apuntan un papel desacoplante de la UCP2. Esto se ha demostrado en estudios realizados con proteoliposomas [Jaburek *et al.*, 1999; Echtay *et al.*, 2001], en mitocondrias de levaduras aisladas [Fleury *et al.*, 1997, Rial *et al.*, 1999], en células intactas [Krauss *et al.*, 2002], en mitocondrias de



mamífero [Fink *et al.*, 2002] e incluso en células INS transfectadas con el gen de la UCP2 [Hong *et al.*, 2001] (ver sección 4.4.1 de Introducción). También se ha visto que su expresión incrementa la termogénesis en hepatocitos [Paulik *et al.*, 1998]. Su función desacoplante hace que se la haya situado como mediadora en la protección contra las ROS [Arsenijevic *et al.*, 2000] y en la regulación del ATP intracelular [Cheng, *et al.*, 2003]. En las células β del páncreas el desacoplamiento provocado por la UCP2 disminuye el rendimiento de la producción de ATP a partir de glucosa, lo cual provoca una inhibición de la secreción de la insulina estimulada por glucosa [Zhang *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2001]. Paralelamente se ha visto que en mitocondrias de hígado de ratones diabéticos *ob/ob* la UCP2 se encuentra sobreexpresada [Chavin *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001] y que los niveles de la UCP2 en los islotes pancreáticos están incrementados en situaciones de hiperglicemia [Patane *et al.*, 2002; Laybutt *et al.*, 2002]. Del mismo modo, se ha observado que la inactivación del gen de la UCP2 en los ratones *ob/ob* restaura en un primer lugar la secreción de insulina, incrementa los niveles de insulina en el suero y finalmente disminuye drásticamente los niveles de glúcidos en estos ratones [Zhang *et al.*, 2001]. No existe el mismo acuerdo a la hora de establecer si la UCP2 se encuentra regulada por nucleótidos y ácidos grasos. Respecto a la activación por ácidos grasos de la UCP2, algunos autores han observado que al reconstituir la UCP2 en liposomas a partir de cuerpos de inclusión y añadir ácidos grasos se observa una estimulación del transporte de H^+ que es sensible a GDP de modo similar al observado en la UCP1 [Jaburek & Garlid, 2003]. En la misma línea, pero señalando la adición de ubiquinona (CoQ_{10}) como imprescindible para observar ese mismo transporte sensible a GDP, se encuentran Klingenberg y su grupo [Echtay *et al.*, 2001b]. Otros por el contrario, con la UCP2 expresada en levaduras [Fleury *et al.*, 1997, Gimeno *et al.* 1997, Rial *et al.*, 1999], o con mitocondrias aisladas de células de mamífero (células INS-1) [Fink *et al.*, 2002], no han conseguido observar ni este efecto activador del transporte en presencia de ácidos grasos ni la sensibilidad a GDP. Varios experimentos han demostrado la unión del nucleótido a la UCP2 en liposomas [Chomiki *et al.*, 2001; Jaburek *et al.*, 1999; Jekabsons *et al.*, 2002] y en mitocondrias de riñón [Echtay *et al.*, 1999], pero es sin embargo importante, señalar el hecho de que la unión no implica necesariamente una inhibición del transporte de H^+ [Chomiki *et al.*, 2001].

En 1999 se propuso la existencia de otros dos reguladores para la UCP2, las especies reactivas del oxígeno [Echtay *et al.*, 1999] y el ácido retinoico [Rial *et al.*, 1999]. En presencia de ácidos grasos, y de modo sensible a nucleótidos, las ROS incrementan la conductancia a protones de las mitocondrias que expresan UCP1, UCP2 y UCP3. La activación tiene lugar tras la interacción directa de los radicales superóxido con la proteína por su lado matricial [Echtay *et al.*, 2002]. El ácido *todo-trans* retinoico también se ha demostrado que regula el transporte de H^+ mediado por la UCP2. Su efecto sobre la proteína es muy sensible al pH, menos saturable y cuantitativamente mayor que el que provoca sobre la UCP1 (figura 49) [Rial *et al.*, 1999].

3.1.- RESIDUOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA UCP1 POR NUCLEÓTIDOS

En la búsqueda de los residuos responsables de la regulación de la UCP1, los implicados en la inhibición por nucleótidos de la UCP1 han sido los más estudiados. Los



ensayos realizados han sido numerosos y las técnicas empleadas van desde la modificación con reactivos químicos de la proteína [Lin & Klingenberg, 1982; Rial *et al.*, 1986; Kopecky *et al.*, 1987; Rial & Nicholls, 1986], a ensayos de unión con análogos de nucleótidos de purina [Mayinger *et al.*, 1989; Mayinger & Klingenberg, 1992; Winkler & Klingenberg, 1992; Huang & Klingenberg, 1995], o más recientemente experimentos de mutagénesis dirigida [Arechaga *et al.*, 1993; Bouillaud *et al.*, 1994; Chomiki *et al.*, 2001; Echtay *et al.*, 1997, 1998, 2000a, 2001a; Modriansky *et al.*, 1997, Murdza-Inglis *et al.*, 1994; González-Barroso *et al.*, 1996, 1997; Hagen & Lowell, 2000; Urbankova *et al.*, 2003]. Reuniendo los datos mostrados en todos ellos, e incluyendo los obtenidos en esta memoria, los residuos señalados como esenciales para la unión de los nucleótidos a la UCP1 se recogen en las siguientes secciones.

3.1.1.- ARGININAS Y UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO

El carácter aniónico del nucleótido debe implicar la interacción con residuos cargados positivamente para su estabilización en el centro de unión. Se ha demostrado que las argininas 83 y 182, situadas en posiciones homólogas en los segmentos transmembrana II y IV, son esenciales para la unión del nucleótido y la regulación del transporte [Murdza-Inglis *et al.*, 1994; Mondriansky *et al.*, 1997]. Los datos existentes acerca de la arginina 276 (región transmembrana VI) son algo más contradictorios ya que mientras algunos autores la señalan como esencial tanto para la regulación de la inhibición por nucleótidos como para su unión [Echtay *et al.*, 2001a], otros autores afirman que únicamente influye en la inhibición [Modriansky *et al.*, 1997]. La hipótesis más probable es que las cadenas laterales de los tres residuos interactúan con los fosfatos del nucleótido. Se ha propuesto que estas argininas miran hacia el interior de la proteína [Ledesma *et al.*, 2002a] en una disposición compatible con la estructura resuelta del AAC [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003]. La disposición del nucleótido que permite la interacción con estos residuos de arginina es compatible con la interacción del anillo de purina con las regiones del tercer *loop* identificadas por fotoafinidad como próximas al nucleótido [Ledesma *et al.*, 2002a]. La implicación en la unión del nucleótido de residuos de los tres dominios es un primer dato a tener en cuenta a la hora de hacer consideraciones sobre el centro de unión y tiene además un mayor significado a la vista de la estructura del AAC. En cualquier caso, la participación de los tres dominios ya quedó patente tras el estudio de las glicinas 76, 175 y 269 (en los segmentos transmembrana II, IV y VI) que parecen tener un importante papel estructural [González-Barroso *et al.*, 1999, Ledesma *et al.*, 2002b].

Del resto de argininas de la UCP1, sólo se ha demostrado que la 91 afecta de un modo indirecto a la regulación de la proteína, interviniendo en la afinidad de la unión del nucleótido a la proteína y regulando la sensibilidad al pH de la unión [Echtay *et al.*, 2001a].

3.1.2.- LAS TRES REPETICIONES LA UCP1 Y SU IMPORTANCIA EN LA REGULACIÓN POR NUCLEÓTIDOS

En el año 2000, Hagen & Lowell realizaron un estudio pionero en el que mediante mutagénesis dirigida crearon una serie de proteínas quimera para tratar de adscribir a alguno de los tres dominios las características transportadoras que presenta la UCP1. Este estudio señaló que las diferencias de regulación por nucleótidos entre la UCP1



y la UCP3 no residían en el primer dominio y propuso que el tercer dominio de la UCP1 confiere una capacidad de inhibición del transporte mucho mayor que la que aporta en la quimera el dominio homólogo de la UCP3. También, y aunque no lo demostraron, intuyeron una probable importancia del segundo dominio de la UCP1 en la inhibición por GDP [Hagen & Lowell, 2000]

Un año después Chomiki *et al.* [2001] llevaron a cabo experimentos similares de intercambio de dominios, pero tomando como moldes la UCP1 y la UCP2, y con la proteína quimera reconstituida en proteoliposomas a partir de cuerpos de inclusión. Estos autores demostraron, mediante estudios de RPE, que el nucleótido no sólo se unía a la UCP1, sino que también a la UCP2, aunque en ésta no provocaba una inhibición del transporte de H⁺. De este modo postularon que en el tercer dominio de ambas proteínas tenía lugar la unión del nucleótido, pero que la capacidad de la inhibición por GDP del transporte de H⁺ residía en algún aminoácido o región situada dentro de los dos primeros dominios de la UCP1 [Chomiki *et al.*, 2001].

El trabajo presentado en esta memoria no ha analizado la unión de los nucleótidos a las distintas quimeras sino que se ha estudiado su papel en el control del transporte. Nuestra visión es concordante con la propuesta de Chomiki *et al.* que sugiere que los nucleótidos se unen a la UCP2 sin influir en el transporte. La pérdida del efecto del GDP en la actividad basal en la quimera Q-121 confirma que el segundo dominio es esencial para que se haya regulación por nucleótidos del transporte de H⁺. Sin embargo no es suficiente ya que en Q-212 la estimulación por ácidos grasos o retinoico es insensible al nucleótido. Conviene recordar en este momento que las argininas esenciales correspondientes a las posiciones 83, 182 y 276 de la UCP1 se encuentran conservadas tanto en la UCP2 como en la UCP3.

3.1.3.- EL DOMINIO II DE LA UCP1 ES ESENCIAL PARA LA INHIBICIÓN POR NUCLEÓTIDOS

Los resultados que acabamos de citar revelan que el segundo dominio tiene una relevancia notable ya que su pérdida elimina la capacidad de la proteína para ser regulada por nucleótidos. En este trabajo se han tratado de localizar dentro de este dominio las regiones o residuos esenciales para que la inhibición tenga lugar. Los datos obtenidos en nuestros experimentos de mutagénesis indican que, tanto la región del *loop* II como la región transmembrana III, son esenciales para que la inhibición por GDP del transporte tenga lugar. En concreto, de las quimeras realizadas, hemos encontrado dos regiones que parecen especialmente importantes. Una de ellas es la quimera del *loop* Lp2_D (cambio del glutámico 134 y de la metionina 140 por un aspártico y una fenilalanina) y la otra el mutante puntual transmembrana Gly130Ala. Ambos provocan un descenso sensible en la inhibición por nucleótidos de la UCP1 (figuras 76.C y 84.C). La región transmembrana IV de la UCP1 presentaba gran homología con la correspondiente de la UCP2 hasta el punto de únicamente requerir el cambio de 4 residuos para transformarla. Esto explicaría que su modificación no afecte a la actividad de la proteína ni a su regulación.

Llama la atención el hecho de que el glutámico 134 sea un residuo totalmente conservado en todas las UCP1 descritas (figura 97), mientras que en el resto de UCPs en esta posición siempre se conserve un aspártico. Tal sustitución no parece en principio ser

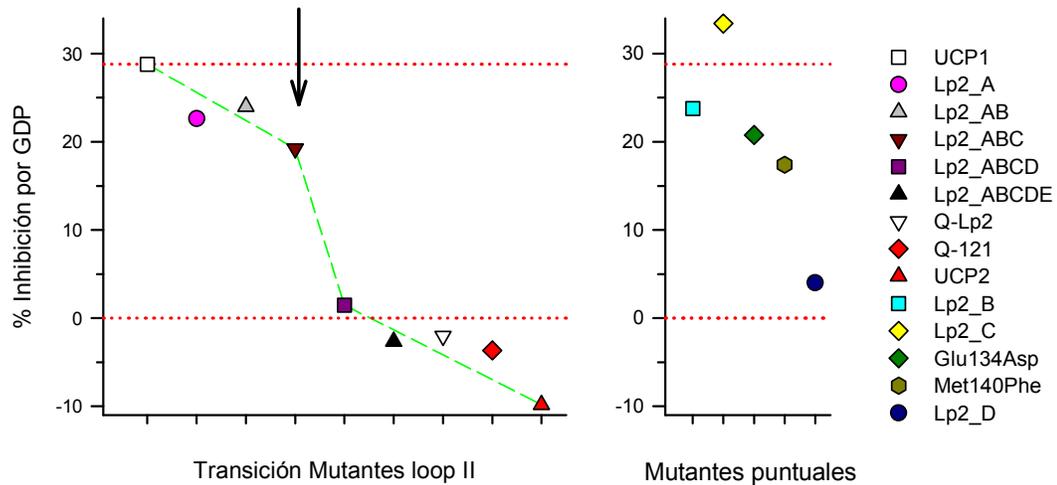


Figura 96 Representación de la degradación progresiva de la regulación por nucleótidos de la UCP1. En el panel de la izquierda, se muestra la degradación progresiva de la inhibición según se acumulan mutaciones en el loop del segundo dominio de la proteína. La flecha indica el punto donde se inicia el cambio drástico en la sensibilidad a nucleótidos. En el panel de la derecha se muestran el efecto de las mutaciones individuales. Los residuos mutados en cada una de las quimeras pueden observarse en la figura 52.

muy relevante para la regulación de la proteína, pero es el cambio adicional de la metionina 140 (característica de la UCP1) por una fenilalanina (presente exclusivamente en UCP2 y UCP3) lo que lleva a una pérdida muy notable de la inhibición del transporte por nucleótidos (figura 76.C). Destacar que la incorporación de estos residuos característicos de la UCP1 en la UCP2 (U2Lp2_A) no confiere a la UCP2 sensibilidad a nucleótidos.

El cambio en la hélice α transmembrana III de la glicina 130 por una valina, nos indica que ese residuo tiene una importancia estructural en la proteína. Los residuos de glicina se localizan frecuentemente en regiones donde hay giros β . En la estructura de la AAC en las hélices 1, 3 y 5 hay un giro entorno a la prolina que forma parte de uno de los motivos característicos de la familia de los transportadores P-x-(D/E)-x₂-(K/R). En la hélice III de la AAC de buey esta prolina es el residuo 132 y en esa misma posición de la UCP1 de rata encontramos ese mismo residuo. Pebay-Peyroula y colaboradores [2003] han especulado que estas prolinas actuarían como bisagras durante el ciclo catalítico que conlleva el proceso de la translocación de los sustratos. El hecho de que la sustitución Gly130Val cause un cambio en la regulación de la UCP1 puede entenderse como resultado de un condicionamiento a la geometría del giro β .

El resto de las mutaciones introducidas en este dominio no provocaron por sí mismas una pérdida

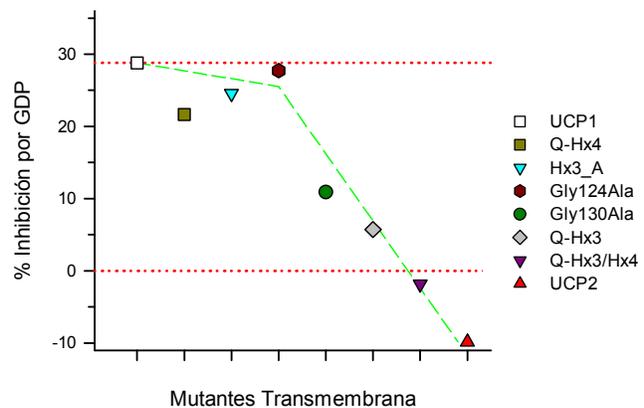


Figura 98 Efecto sobre la regulación por nucleótidos de la UCP1 de la incorporación progresiva de mutaciones en los segmentos transmembrana III y IV. Los residuos mutados en cada una de las quimeras pueden observarse en la figura 53.



<i>Bt</i> UCP1	SLGSKISAGLMTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Cf</i> UCP1	SLGSRISAGVMTGGAAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Hs</i> UCP1	SLGSKILAGLTTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Rm</i> UCP1	-----AQS H LHGPK--PRYTGTYN
<i>Ma</i> UCP1	TLGNRISAGLMTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Mm</i> UCP1	SLGNKISAGLMTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Oc</i> UCP1	SLGSKISAGLTTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Ps</i> UCP1	TLVNRISAGLMTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Rn</i> UCP1	SLGSKISAGLMTGGVAVFIGQPT E VVKVRLQAQSHLHGPK--PRYTGTYN
<i>Bt</i> UCP2	GIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGAGR---RYQSTVE
<i>Br</i> UCP2	GIGSRLLAGCTTGAMAVAVAQPTD V LKVRFOAQA V SAGASK---RYHSTMD
<i>Cf</i> UCP2	GIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGAGSG---RRYQSTVD
<i>Cc</i> UCP2	GIGSRLLAGCTTGAMAVALAQPTD V VKVRFOAQA S AGANK---RYHG T MD
<i>Hs</i> UCP2	SIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGGG---RRYQSTVN
<i>Rm</i> UCP2	SIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGGG---RRYQSTVE
<i>Mm</i> UCP2	GIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGGG---RRYQSTVE
<i>Ps</i> UCP2	NVLIRILAGCTTGAMAVSFAQPTD V VKVRFOAQA S NLDGVA---RYTGT M Q
<i>Rn</i> UCP2	GIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGGG---RRYQSTVE
<i>Ss</i> UCP2	GIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGGG---RRYQSTVE
<i>Bt</i> UCP2	GIGSRLLAGSTTGALAVAVAQPTD V VKVRFOAQA R AGGG---RRYRSTVD
<i>Bt</i> UCP3	SITTRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKIRFOA S MHTGLGGN-RKYS G TM
<i>Cf</i> UCP3	SITTRILAGCTTGAMAVS C AQPTD V VKVRFOA S IHLGAGSN-RKYS G TM
<i>Em</i> UCP3	GLAPRLLAGCTTGAVAVACAQPTD V VKVRFOA H GAMPEST--RRYNGTL
<i>Gg</i> UCP3	GLLARLLAGCTTGAVAVTCAQPTD V VKVRFOA L GALPESNR-R-YS G TV
<i>Hs</i> UCP3	SLTTRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKVRFOA S IHLG P SRSDRKYSGTT
<i>Mm</i> UCP3	SLTTRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKVRFOA S IHLG S SGSDRKYSGTV
<i>Mg</i> UCP3	GLLARLLAGCTTGAVAVTCAQPTD V VKVRFOA L GALPESN--RRYSGTV
<i>Mm</i> UCP3	SVAIRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKVRFOA M IRLGTGGE-RKYR G TM
<i>Ps</i> UCP3	SVAIRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKVRFOA M IRLGTGGE-RKYR G TM
<i>Rn</i> UCP3	SVAIRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKVRFOA M IRLGTGGE-RKYR G TM
<i>Ss</i> UCP3	SITTRILAGCTTGAMAVTCAQPTD V VKVRFOA S IHAGPRSN-RKYS G TM
<i>Hs</i> UCP4	PLWKS V IGGMMAGVIGQFLANPTD L VK V Q M MEGKRKLE G KPLRFR G VD
<i>Rn</i> UCP4	PLWKS V IGGMMAGVIGQFLANPTD L VK V Q M MEGKRKLE G KPLRFR G VD
<i>Hs</i> BMCP1	TLLINMICGVVSGVISSTIANPTD V LKIR M QAQ S LFQ S MIGSFID I Y
<i>Mm</i> BMCP1	TLLINMICGVVSGVISSTIANPTD V LKIR M QAQ S LFQ S MIGSFID I Y
<i>Rn</i> BMCP1	TLLINMICGVVSGVISSTIANPTD V LKIR M QAQ S LFQ S MIGSFID I Y
<i>At</i> UCP1	PLSKKILAGLTTGALGIMVANPTD L VK V RLQA E GKLAAGA-PRRY S GAL
<i>At</i> UCP2	PLYQKILAALLTGAI A IIVANPTD L VK V RLQA E GKLPAGV-PRRY A GAV
<i>Le</i> UCP	PLSKKILAALLTTGALGITVANPTD L VK V RLQA E GKLPAGV-PRRY S GAL
<i>Os</i> UCP1	SLFAKILAALMTGV A IIVANPTD L VK V RLQA D GKAT V K--RHYS G AL
<i>Os</i> UCP2	PLTKKIAAGFTTGAI A ISIANPTD L VK V RLQA E GKL P AGA--RAY A GAM
<i>St</i> UCP	PLSKKILAALLTTGALGITIANPTD L VK V RLQA E GKLPAGV-PRRY S GAL
<i>Sr</i> UCP	PLSKKILAGLTTGAL A IIVANPTD L VK V RLQA E GKLP P GV-PRRY S GAL
<i>Ta</i> UCP	TLMNKILAALLTG V IAIAVANPTD L VK V RLQA D GK S TAVK--RHYS G AL
<i>Zm</i> UCP	PLSKKIAAGFTTGAI A ISIANPTD L VK V RLQA E GKL P AGV-PRRY T GAM

UCP1 UCP2 UCP3 UCP4 BMCP1 PUMP

Figura 97 Alineamiento de las secuencias de UCPs descritas. Todas las secuencias fueron extraídas de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y sus números de acceso vienen recogidos en la tabla 2 de la sección de Introducción. Remarcados en la UCP1 y en todas las UCPs se muestran en verde la glicina 130, en amarillo el glutámico 134 y en rojo la metionina 140.



de la regulación por GDP de la proteína. Sin embargo, nuestros resultados indican que la acumulación progresiva de mutaciones, tanto en el *loop* (después de incluir Lp2_D) como en la región transmembrana III (tras incluir Gly130Ala) termina por eliminar la regulación por GDP de la proteína (Q-Hx3, Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE, Q-Lp2 y Q-Hx3/Hx4). Las figuras 96 y 98 nos muestran esta destrucción progresiva de la regulación por nucleótidos de la UCP1 tras la acumulación sucesiva de mutaciones en el *loop* II y en los segmentos transmembrana. Podría decirse que la UCP1 se encuentra optimizada para el control del transporte por los nucleótidos y que la sustitución de sus residuos por las secuencias divergentes presentes en la UCP2 lleva a un control deficiente de la actividad cuyo efecto es acumulativo.

3.1.4.- PAPEL DE LOS *LOOPS* MATRICIALES EN LA UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO Y LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE EN LA UCP1

La primera evidencia acerca de la localización del sitio de unión del nucleótido en la zona del *loop* III de la UCP1 se obtuvo mediante marcaje de fotoafinidad. Los resultados apuntaron hacia la zona situada cerca del segmento N-terminal de la sexta hélice α , en concreto a los residuos cisteína 253, treonina 259 y treonina 264 (alanina 264 en la UCP1 de hámster) [Mayinger & Klingenberg, 1992; Winkler & Klingenberg, 1992]. En 1994 se observó que la región 261-269 de este *loop* conservaba una elevada homología con el dominio de unión del ADN de los receptores de estrógenos, por lo que se pensó que podía intervenir en el sitio de unión del nucleótido a la UCP1 [Bouillaud *et al.*, 1992] y de hecho se demostró que la delección de tres aminoácidos en esta región (fenilalanina 267, lisina 268 y glicina 269) llevaba a la pérdida de la regulación por nucleótidos del transporte [Bouillaud *et al.*, 1994]. Años más tarde, mediante RMN, se demostró que la región 261-269 adopta una estructura en hélice α como el del dominio de unión a ADN y mediante modelado molecular se intuyó que se situaría en un plano paralelo a la bicapa [González-Barroso *et al.*, 1999]. Para comprobar la posible importancia de esta región en la regulación del transporte se ha realizado un importante esfuerzo de mutagénesis que se ha completado en la presente memoria. Destacar que la delección completa de estos nueve aminoácidos transformaba la proteína en un poro insensible a nucleótidos que permite el paso de solutos de hasta 1000 Da [González-Barroso *et al.*, 1997]. Las delecciones de los residuos homólogos de los dominios I (Phe-Lys-Gly) y II (Trp-Lys-Gly) también revelaron la pérdida de la regulación por nucleótidos, pero sin afectar al transporte de H⁺ [González-Barroso *et al.*, 1999]. Todos estos datos han llevado a que se propusiera que estas tres regiones homólogas forman parte del denominado dominio "puerta" que regula el transporte y determina la especificidad de la proteína [González-Barroso *et al.*, 1999].

En este sentido conviene llamar la atención sobre la estricta conservación del residuo de glicina incluido en estas regiones y que se encuentran en el extremo N-terminal de las hélices transmembrana II, IV y VI de todos los transportadores mitocondriales (figura 8). En el caso de la UCP1 las glicinas de las hélices IV y VI se han considerado como parte integrante un giro β de tipo VIII (Gly-x-x-Pro), siendo diferente en la hélice II (Gly-x-Pro) donde podría tratarse de un giro β de tipo VI [Hutchinson & Thornton, 1994]. Se ha demostrado que la delección de cualquiera de las tres glicinas homólogas de los dominios I, II y III (76, 175 y 269) provoca la pérdida total de la regulación por nucleótidos en la UCP1 [González-Barroso *et al.*, 1999].



En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio se había observado que la sustitución Gly269Leu retenía una cierta regulación por nucleótidos. En esta memoria se ha realizado la sustitución homóloga en el segundo dominio, Gly175Leu demostrándose un efecto más drástico que el descrito para Gly269Leu ya que la proteína pierde toda regulación del transporte, manteniendo una elevada actividad basal que dificulta el crecimiento de las levaduras (fenotipo "desregulado", figura 90). En el mismo giro β del segundo dominio se procedió a realizar la sustitución Pro178Val pero esta mutación no tuvo consecuencias en la actividad y regulación de la UCP1. Era sin duda de interés analizar el papel de la prolina en el giro β del primer dominio. La secuencia Gly-Leu-Pro sólo se encuentra en la UCP1 mientras que en UCP2 y UCP3 la secuencia es Gly-Leu-Val. Sin embargo, la sustitución Pro78Val tuvo modestas consecuencias ya que disminuyó algo la actividad basal pero mantuvo la regulación por nucleótidos.

3.2.- MODELO ESTRUCTURAL PARA LA UNIÓN DEL NUCLEÓTIDO A LA UCP1

En el año 2002, nuestro grupo propuso un modelo de organización tridimensional de la UCP1 consistente en una agrupación secuencial de los segmentos transmembrana para formar una estructura en forma de barril. El aspecto más novedoso del modelo era que los *loops* matriciales no penetraban en el interior del barril sino que formarían la tapa inferior del mismo. En este modelo, el contacto entre las dos subunidades del dímero tenía lugar entre los segmentos transmembrana II y III de cada monómero (ver sección 3.6 de Introducción) [Ledesma *et al.*, 2002a]. Se propuso que el nucleótido accedería a su sitio de unión en la UCP1 desde la cara citosólica y se alojaría en el fondo del barril de hélices α . Allí, su anillo de guanosina interaccionaría con residuos de los *loops* matriciales tal y como había revelado el marcaje de fotoafinidad [Mayinger & Klingenberg, 1992; Winkler & Klingenberg, 1992]. Las cargas negativas de los fosfatos establecerían a su vez puentes salinos con las arginina esenciales de los segmentos II, IV y VI.

Este modelo explicaba la observación de que las mutaciones Glu261Ala y Lys268Leu no tenían efecto sobre la unión a pesar de ser residuos cargados. El modelado de la unión de la región 261-269 con la hélice transmembrana VI dejaba estos residuos expuestos a la cara matricial probablemente interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos [González-Barroso *et al.*, 1999; Ledesma *et al.*, 2002a]. En esta memoria se han introducido otras dos mutaciones en esta región, Thr259Arg y Ala264Arg, en las que de nuevo los residuos de la UCP1 se han sustituido por los presentes en la UCP2. Las sustituciones no han mostrado efectos sobre el control del transporte lo que es indicativo de que, tal y como se ha propuesto en el modelo de Ledesma *et al.*, la estabilización del anillo de purina no debe tener lugar mediante la formación de puentes de hidrógeno sino mediante interacciones de apilamiento [Ledesma *et al.*, 2002a].

El grupo de Klingenberg había propuesto que el glutámico 190 actúa como "sensor" de pH regulando la unión de los nucleótidos a la UCP1 según el pH [Winkler *et al.*, 1997; Echtay *et al.*, 1997] y un año después que la histidina 214 regula la unión de los nucleótidos mediante su estado de protonación. Asimismo, la regulación de la protonación de esta histidina dependería de los aspárticos 209 y 210 [Winkler *et al.*, 1997; Echtay *et*



al., 1998; 2000a]. Según el modelo de Ledesma y colaboradores, la unión del nucleótido en el fondo del barril de hélices α y el hecho de que los residuos glutámico 190 e histidina 214 se encuentren próximos a la cara citosólica del barril hace poco probable su interacción con la cadena de polifosfatos del nucleótido cuando está en su centro de unión por lo que se propuso que estos residuos probablemente regulan su acceso al sitio de unión [Ledesma *et al.*, 2002a].

La reciente publicación de la estructura tridimensional del AAC [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003] confirmó la validez de este modelo ya que en ambos casos se trata de una estructura en forma de barril abierta por el lado citosólico y con los *loops* matriciales cerrando la cavidad por el lado de la matriz. La gran homología existente entre el AAC y la UCP1 hace posible que el modelo de organización tridimensional de los segmentos transmembrana de ambas sea muy similar. De hecho hay que destacar que los tres dominios de la AAC presentan una estructura extraordinariamente similar a pesar de que la identidad de secuencia entre los dominios es de tan sólo el 15 % (ver figura 24 en Introducción) [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003].

Tomando como base la estructura resuelta de la AAC se ha procedido a construir un nuevo modelo de la UCP1 en el que se han reemplazado las secuencias de las regiones transmembrana del AAC por las secuencias homólogas de la UCP1 e incluyendo también la región 261-269 cuya estructura se ha resuelto por RMN [González-Barroso *et al.*, 1999]. El resultado se muestra en la figura 99. En ella se ha introducido una molécula de ATP que se ha situado en una posición compatible con la interacción tanto con la región 261-269 como con las argininas esenciales 83, 182 y 276.

El modelo ayuda a comprender el efecto de las mutaciones de la quimera Lp2_D. La observación de la figura 99 nos revela que el glutámico se encuentra mirando hacia el interior del barril en posición cercana a la cadena de fosfatos sugiriendo incluso la posible formación de un puente salino con la arginina 83. Su mutación por un aspártico no provoca efectos aparentes pero el cambio adicional Met140Phe, situado en una orientación opuesta al glutámico y en la región que se considera podría formar parte de la superficie de interacción de los monómeros, podría provocar un desplazamiento adicional del carboxilo de modo que se dificulte la inhibición del transporte.

3.2.- RESIDUOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSPORTADORA DE LA UCP1 POR ÁCIDOS GRASOS

El estudio de las regiones implicadas en el transporte de H^+ activado por los ácidos grasos es mucho más reciente y menos detallado. El primero de ellos se realizó en nuestro laboratorio, y demostró que, dentro de la región C-terminal de la proteína, mutaciones en la cisteína 304 hacían variar la K_m de la activación, haciendo que la proteína mostrase una mayor o menor afinidad por ácidos grasos según el residuo sustituyente [González-Barroso *et al.* 1996; 1998]. Esta región está orientada hacia la cara citosólica [Eckerson & Klingenberg, 1987] y representa una especie de "cola" móvil de 11 aminoácidos que va desde el aminoácido 296 al extremo C-terminal (MKSRQTVDCCTT). Se ha descrito que reactivos que forman puentes disulfuro, permiten la unión de las dos

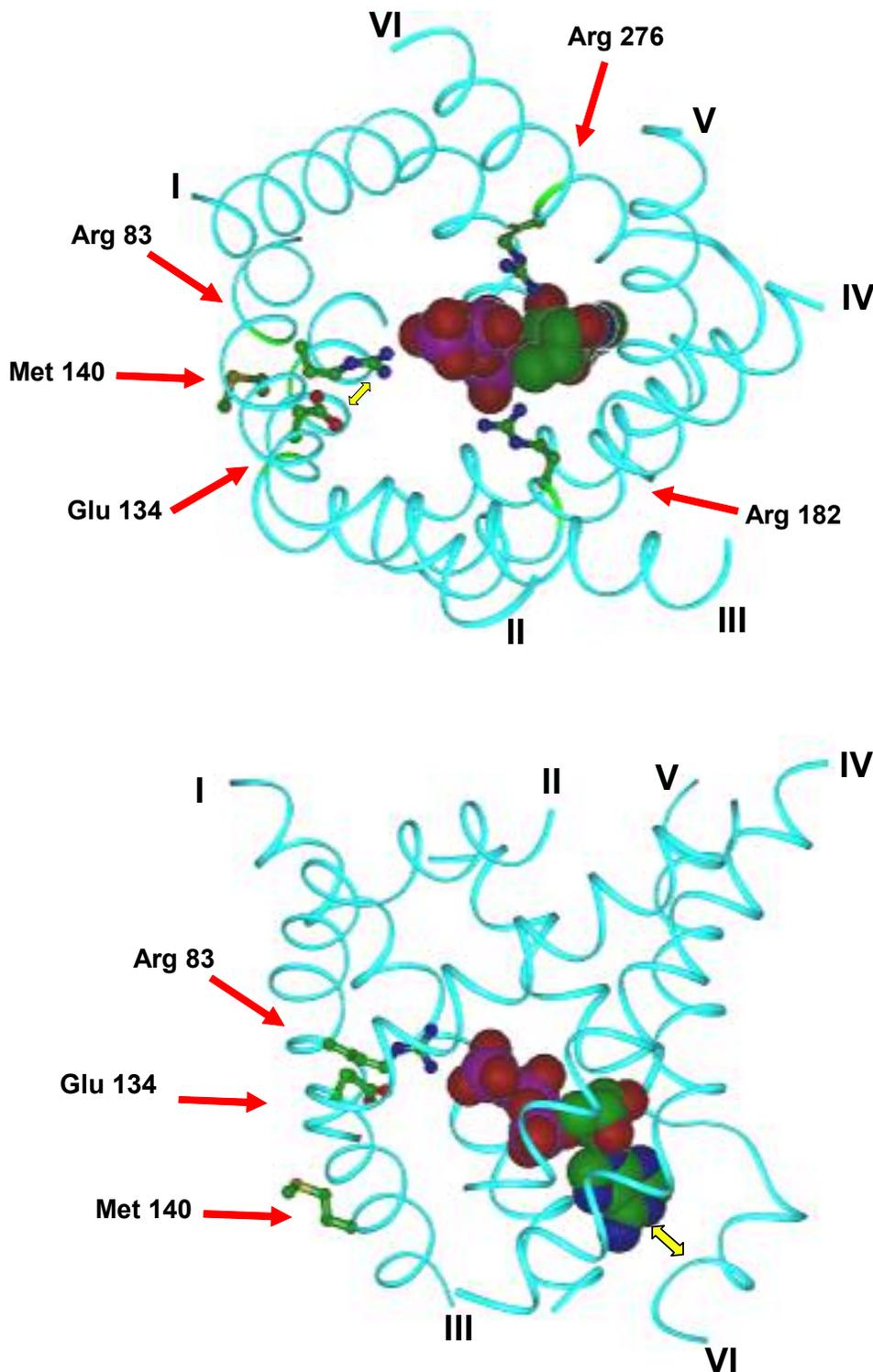


Figura 99 Representación tridimensional del barril de hélices α de la UCP1 sobre el esqueleto de la estructura del AAC. **Figura superior:** vista desde la cara citosólica. Se muestra la molécula de ATP en el fondo del barril rodeada por las tres argininas esenciales para la unión del nucleótido y los residuos glutámico 134 y metionina 140. La flecha amarilla indica la posible interacción entre la arginina 83 y el glutámico 134. **Figura inferior:** vista desde el plano de membrana plasmática. Se muestra la molécula de ATP en el fondo del barril. La zona señalada con la flecha amarilla es la región N-terminal de la hélice VI, región donde ha habido unión por fotoafinidad.



subunidades del dímero de la UCP1 mediante un puente disulfuro intermolecular entre las dos cisteínas 304 de cada monómero [Klingenberg & Appel, 1989].

Otros autores también han aportado datos sobre residuos implicados en el transporte de H^+ de la UCP1. Así en 1998, Klingenberg y colaboradores estudiando UCP1 reconstituida en liposomas, señalaron que el par de histidinas 145 y 147 de la región del *loop* II eran las responsables de la capacidad transportadora de H^+ de la UCP1. Su ausencia en la UCP2, mientras que en la UCP3 sólo se encontrase conservada la His145 llevó a estos autores a proponer que estas proteínas no eran transportadoras de H^+ [Bienengraeber *et al.*, 1998]. Esta afirmación fue bastante controvertida, ya que aunque algunos autores apoyaron estas observaciones siguiendo la misma metodología [Urbankova *et al.*, 2003], otros crearon el doble mutante (His145Asn/His147Asn) y no observaron efectos sobre el transporte de H^+ [Hagen & Lowell, 2000]. Nuestros resultados apoyan la observación de Hagen y Lowell ya que quimera Lp2_C incluye la sustitución de las dos histidinas y muestra unas propiedades funcionales muy parecidas a la UCP1 (figura 76).

El grupo de Klingenberg también ha señalado a los aspárticos 27 y 210 como implicados en el transporte, aminoácidos que ya habían sido implicados en la unión de los nucleótidos trifosfato. Experimentos en proteoliposomas y en mitocondrias de levaduras demostraron que mutaciones del aspártico 27 (Asp27Asn) o del 210 (Asp210Asn) disminuían drásticamente el transporte de H^+ sin afectar al de aniones como el cloruro. Se propuso entonces que el aspártico 210 mediaría en la adquisición de los H^+ desde el lado citosólico, mientras que el 27 se encargaría de transportar los H^+ a través de la membrana [Echtay *et al.*, 2000a].

Los trabajos de Hagen y Lowell [2000] con las proteínas quimera señalaron que la activación del transporte de H^+ por ácidos grasos en la UCP1 depende del dominio II o de alguno de sus residuos que se encuentren ausentes en la UCP3. A esta conclusión llegaron tras observar que la sustitución de este dominio en la UCP1 por su homólogo de la UCP3 provocaba la pérdida de la activación del transporte, mientras que su inclusión en la UCP3, confería a ésta una capacidad de estimulación por ácidos grasos que antes no poseía. De sus resultados, postularon también que el dominio I de la UCP1 debía influir en el mantenimiento de la estructura de la UCP1 ya que, si bien su implantación en la UCP3 no proporcionaba la capacidad de estimulación a ésta, su cambio en la UCP1 provocaba una bajada en la estimulación del transporte. Finalmente al tercer dominio de la UCP1, donde se encuentran localizados los aspárticos 209 y 210, no le atribuyeron un papel crítico en la activación por ácidos grasos, debido a que su sustitución por el dominio III de la UCP3 no afectaba sensiblemente a la activación.

Los experimentos posteriores de Chomiky *et al.* [2001] en proteoliposomas, generando las quimeras UCP1/UCP2, mostraron resultados compatibles con los anteriores. Estos autores propusieron que los dominios I y II eran los responsables de conferir las capacidades transportadoras características a ambas proteínas. Argumentaron esta hipótesis al comprobar que su quimera 112 mantenía una activación por ácidos grasos semejante a la UCP1 mientras que la quimera 221 se comportaba igual que la UCP2.

Nuestro propósito a partir de los resultados publicados fue observar si el segundo dominio de la UCP1, al igual que lo observado en la UCP3, podía también conferir a la UCP2 la activación del transporte de H^+ por ácidos grasos que caracteriza a la UCP1.

El estudio de las quimeras mayores de esta memoria confirmó los resultados obtenidos por Hagen y Lowell [2000]. En nuestro caso, mientras que la quimera Q-212 adquiere una estimulación por ácidos grasos no sensible a nucleótidos, Q-121 pierde ambas regulaciones, pero adquiere una característica típica de la UCP2: la respuesta a retinoico a pH 7.3. En la figura 100 se reúnen todas las quimeras realizadas que muestran activación por ácidos grasos de su transporte de H⁺. Su estudio nos muestra que todas las quimeras que se activan por ácidos grasos presentan el dominio II, por lo que proponemos este segundo dominio de la UCP1 es esencial, y suficiente, para conferir el transporte de H⁺ activado ácidos grasos que muestra la proteína.

Establecida la importancia del segundo dominio de la UCP1 en la actividad de la proteína, era necesario intentar delimitar si la capacidad de la activación del transporte residía en algún residuo en concreto como propusieron Klingenberg y colaboradores [Bienengraeber *et al.*, 1998] o si por el contrario era debida a la conformación adoptada por el segundo dominio de la UCP1. Se trató así de ir transformando progresivamente las distintas regiones de la UCP1 en regiones de la UCP2, para de este modo determinar qué residuos son claves para la activación por ácidos grasos de la proteína. Los resultados de las quimeras realizadas en el *loop* II reflejan claramente que las sustituciones individuales de las regiones (Lp2_A, Lp2_B, Lp2_C, Lp2_D, Lp2_AB y Lp2_ABC) no implican ningún cambio significativo en la respuesta de la proteína a los ácidos grasos (figura 101). Todas ellas reflejan valores de estimulación del transporte similares a los que presenta la UCP1. Sin embargo, de manera análoga a lo que ocurría en la regulación por nucleótidos, la adición progresiva de mutaciones termina por eliminar la capacidad de estimulación por palmítico de la proteína (Lp2_ABCD, Lp2_ABCDE y Q-Lp2). La figura 101 refleja la pérdida progresiva de esta estimulación. Curiosamente, la disminución más drástica se observa de nuevo tras incorporar las mutaciones del Glu134Asp y Met140Phe a Lp2_ABC para generar la quimera Lp2_ABCD. Teniendo en cuenta la disminución del estado 4 que se observa en las quimeras insensibles a ácidos grasos, y su pérdida de regulación por nucleótidos, este efecto podría entenderse suponiendo que la adición progresiva de más mutaciones en el *loop* termina generando proteínas inactivas (Lp2_ABCDE y Q-Lp2). Estos datos indican que el *loop* II de la UCP1 es esencial para la estimulación por ácidos grasos ya que su cambio completo modifica la estructura secundaria que adopta y elimina la activación de la proteína.

De manera análoga a lo observado en el *loop*, la estimulación por ácidos grasos va disminuyendo de forma progresiva según se van acumulando las mutaciones en las regiones transmembrana III y IV (figura 102). Destacar, sin embargo, que son las sustituciones Val125Leu y Phe128Ala (Q-Hx3) las que provocan la disminución más

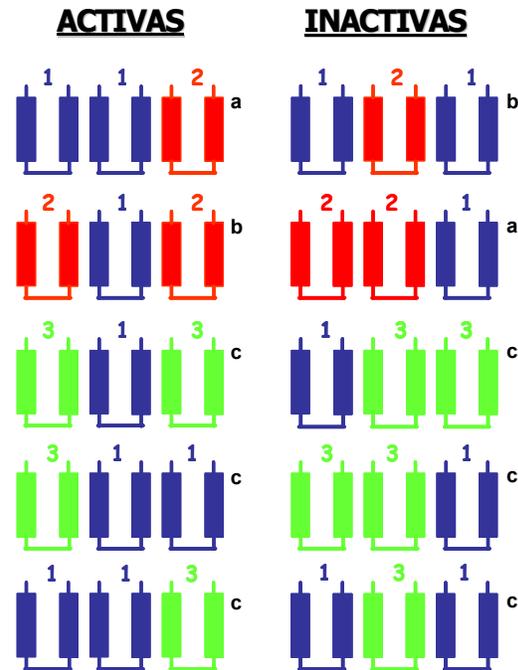


Figura 100 Resumen de las quimeras realizadas mediante intercambio de dominios para analizar la activación por ácidos grasos del transporte mediado por la UCP1. Se muestran en azul, rojo y verde los dominios correspondientes a la UCP1, UCP2 y UCP3 respectivamente. El superíndice indica en que trabajo se han generado las quimeras: a) Hagen & Lowell, [2000], b) En esta memoria, c) Chomiki *et al.* [2001].

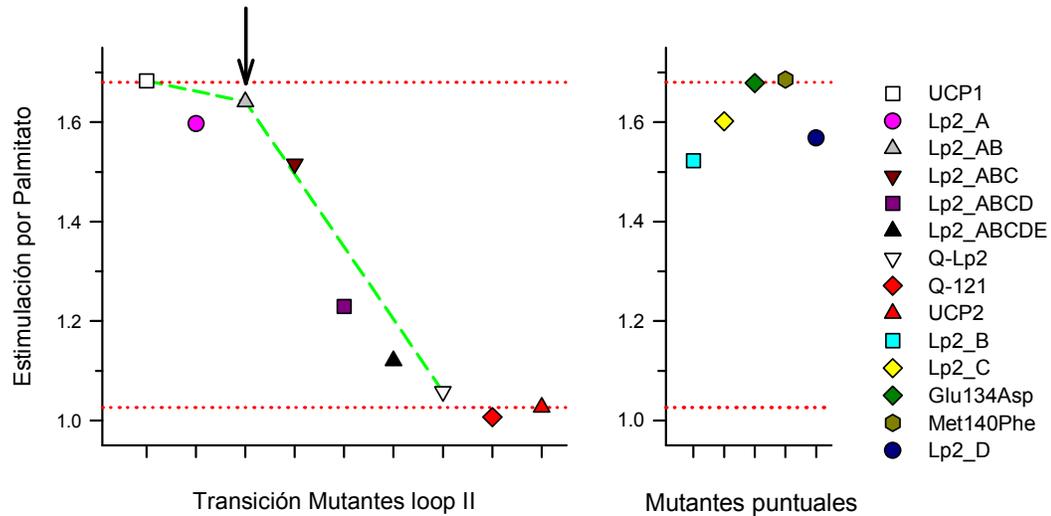


Figura 101 Degradación progresiva de la estimulación del transporte de H⁺ por ácidos grasos de la UCP1. En el panel de la izquierda se observa como la destrucción de la estimulación es progresiva según se van incorporando las regiones divergentes presentes en la UCP2 al loop del segundo dominio de la UCP1. En el panel de la derecha se observa el efecto de las mutaciones individuales sobre la estimulación del transporte. Los residuos mutados en cada quimera pueden verse en la figura 52.

drástica. La quimera Q-Hx3/Q-Hx4 muestra una disminución de su estimulación por palmítico aunque sin llegar a eliminarla por completo. La posición de Val125 y Phe128 en nuestro modelo de estructura tridimensional situaría a la fenilalanina en la interfase entre monómeros y esto podría afectar a la formación del homodímero y curiosamente también a la estimulación por ácidos grasos de la UCP1. Experimentos posteriores deberían establecer la influencia de la mutación individual de la fenilalanina 128.

3.4.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSPORTADORA DE LA UCP1 POR ÁCIDO RETINOICO

Los resultados obtenidos en esta memoria reflejan que el *loop* II tiene una importancia esencial en las características transportadoras de la UCP1. El cambio completo del *loop* de la UCP1 por el de la UCP2 elimina el fenotipo UCP1 de la quimera (Q-Lp2), y acerca los valores de estado 4, RCR, respuesta a nucleótidos y ácidos grasos que caracterizan a la UCP2. Sin embargo debe considerarse a esta quimera como una proteína inactiva ya que no muestra la característica bioenergética que caracteriza a la UCP2: su respuesta mayor a retinoico a pH 7.3. La representación de la diferencia de estimulación por retinoico

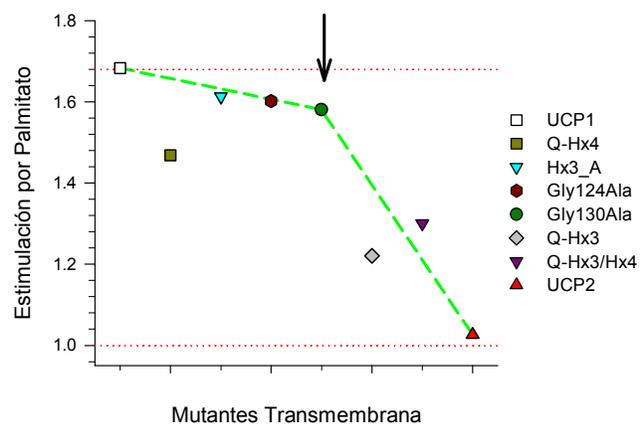


Figura 102 Efecto de las mutaciones de los segmentos transmembrana sobre la estimulación del transporte por ácido palmítico de la UCP1. Se observa la clara degradación de la estimulación tras incluir las mutaciones introducidas en Q-Hx3. Los residuos mutados en cada una de las quimeras pueden observarse en la figura 53.



7.3/6.8 que presentan las distintas quimeras progresivas del *loop* II (figura 103) nos indica que el cambio progresivo de los aminoácidos de este dominio de la UCP1 por sus correspondientes en la UCP2, no empiezan a adquirir las características bioenergéticas de la UCP2 hasta que se incorporan tanto el *loop* II como los segmentos transmembrana (Q-121). De todos modos es patente que el segundo dominio no determina únicamente la regulación del transporte en la UCP2 ya que los niveles de respuesta a retinoico de Q-121 a pH 7.3 siguen sin alcanzar los valores mostrados por la UCP2. Por ello podemos decir que, mientras en la UCP1 el dominio II es suficiente para conceder la estimulación por ácidos grasos, el segundo dominio de la UCP2 no es suficiente para aportar a la proteína un fenotipo UCP2. Esta observación es compatible con lo afirmado por Chomiki *et al.* que afirmaron que la regulación por nucleótidos y el transporte mostrado por la UCP1 y UCP2 residía en los dos primeros dominios de la proteína.

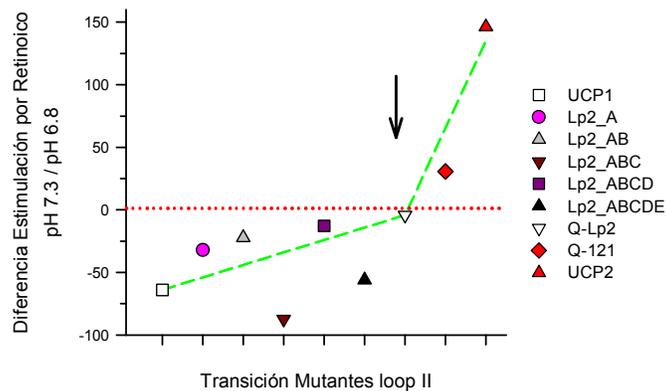


Figura 103 Representación de la adquisición progresiva de las características transportadoras UCP2. Los residuos mutados en cada una de las quimeras pueden observarse en las figuras 51 y 52. Con una flecha negra se señala el punto donde la diferencia de estimulación por retinoico comienza a hacerse positiva (característico de la UCP2).



CONCLUSIONES:

- 1.-** La proteína desacoplante UCP1 presenta una elevada conductancia a protones en ausencia de nucleótidos y ácidos grasos.

- 2.-** El mecanismo molecular de activación de la termogénesis mediado por los ácidos grasos no puede basarse en un ciclo protonofórico que implique la translocación del ácido graso mediada por la UCP1. El mecanismo de activación más probable implica la participación del grupo carboxilato del ácido graso en la translocación de los protones.

- 3.-** La unión de nucleótidos ocurre en el centro del barril de hélices α y en ella participan residuos de los tres dominios de la proteína.

- 4.-** El dominio central de la UCP1, constituido por las regiones transmembrana III y IV y el *loop* matricial II, es suficiente y necesario para conferir a la UCP1 su capacidad de respuesta a los ácidos grasos.

- 5.-** La secuencia de la UCP1 parece optimizada para la regulación de la actividad termogénica por los nucleótidos y ácidos grasos. La sustitución de las secuencias características de la UCP1 por las correspondientes en la UCP2 lleva a una reducción progresiva de la respuesta a los dos reguladores.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Acín, A., Rodríguez, M., Rique, H., Canet, E., Boutin, J.A. & Galizzi, J.P. (1999) Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **258**:278-283.
- Adams, S.H. (2000) Uncoupling protein homologs: emerging views of physiological function. *J Nutr.* **130**:711-714.
- Adams, S.H., Pan, G. & Yu, X.X. (2000) Perspectives on the biology of uncoupling protein (UCP) homologues. *Biochem Soc Trans.* **29**:798-802.
- Afzelius, B.A. (1970) Brown adipose tissue: its gross anatomy, histology and biology. Brown adipose tissue (Lindberg, O., Ed.) Elsevier. New York.
- Aldridge, W.N. & Street, B.W. (1968) Mitochondria from brown adipose tissue. *Biochem. J.* **107**:315-317.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Alvarez, R., de Andres, J., Yubero, P., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giral, M. & Villarroya, F. (1995) A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem.* **270**:5666-5673.
- Andreyev, A.Yu., Bondareva, T.O., Dedukhova, V.I., Mokhova, E.N., Skulachev, V.P. & Volkov, N.I. (1988) Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. *FEBS Lett.* **226**:265-269.
- Andreyev, A.Yu., Bondareva, T.O., Dedukhova, V.I., Mokhova, E.N., Skulachev, V.P., Tsofina, L.M., Volkov, N.I. & Vygodina, T.V. (1989) The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **182**:585-592.
- Aquila, H., Link, T.A. & Klingenberg, M. (1985) The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* **4**:2369-2376.
- Arechaga, I., Raimbault, S., Prieto, S., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Miroux, B., Ricquier, D., Bouillaud, F. & Rial, E. (1993) Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function. *Biochem. J.* **296**, 693-700.
- Arechaga, I., Ledesma, A. & Rial, E. (2001) The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB Life.* **52**:165-173.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Goubert, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. & Ricquier, D. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet.* **26**:435-439.
- Bathgate, B., Freebairn, E.M., Greenland, A.J. & Reid, G.A. (1992) Functional expression of the rat brown adipose tissue uncoupling protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **6**:363-370.
- Bechmann, I., Diano, S., Warden, C.H., Bartfai, T., Nitsch, R. & Horvath, T.L. (2002) Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol.* **64**:363-367.
- Berg, J.M. (1989) DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell.* **57**:1065-1068.



- Bernardi, P., Penzo, D. & Wojtczak, L. (2002) Mitochondrial energy dissipation by fatty acids. Mechanisms and implications for cell death. *Vitam Horm.* **65**:97-126.
- Bienengraeber, M., Echtay, K.S. & Klingenberg, M. (1998) H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry.* **37**:3-8.
- Bienengraeber, M., Ozcan, C. & Terzic, A. (2003) Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line. *J Mol Cell Cardiol.* **35**:861-865.
- Boss, O., Samec, S., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. & Giacobino, J.P. (1997a) Tissue-dependent upregulation of uncoupling protein-2 in response to fasting or cold. *FEBS Lett* **412**:111-114.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. & Giacobino, J.P. (1997b) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* **408**:39-42.
- Boss, O., Giacobino, J.P. & Muzzin, P. (1998a) Genomic structure of uncoupling protein-3 (UCP3) and its assignment to chromosome 11q13. *Genomics.* **47**:425-426.
- Boss, O., Muzzin, P. & Giacobino, J.P. (1998b) The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol.* **139**:1-9.
- Boss, O., Samec, S., Kuhne, F., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J.P. & Muzzin, P. (1998c) Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem.* **273**:5-8.
- Boss, O., Bachman, E., Vidal-Puig, A., Zhang, C.Y., Peroni, O. & Lowell, BB. (1999) Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **261**:870-876.
- Boss, O., Hagen, T. & Lowell, B.B. (2000) Uncoupling proteins 2 and 3: Potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes.* **49**:143-156.
- Bouillaud, F., Weissenbach, J. & Ricquier, D. (1985) Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **261**:1487-1490.
- Bouillaud, F., Casteilla, L. & Ricquier, D. (1992) A conserved domain in mitochondrial transporters is homologous to a zinc-finger knuckle of nuclear hormone receptors. *Mol Biol Evol.* **9**:970-975.
- Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P.X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., Rial, E. & Ricquier, D. (1994) A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *EMBO J.* **13**:1990-1997.
- Bouillaud, F., Couplan, E., Pecqueur, C. & Ricquier, D. (2001) Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim Biophys Acta.* **1504**:107-119.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* **134**:707-716.
- Brand, M.D., Chien, L.F., Ainscow, E.K., Rolfe, D.F. & Porter, R.K. (1994) The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta.* **1187**:132-139.
- Brookes, P.S., Hulbert, A.J. & Brand, M.D. (1997) The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: no effect of fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta.* **1330**:157-164.
- Brown, G.C. (1992) The leaks and slips of bioenergetic membranes. *FASEB J.* **6**:2961-2965.



- Brustovetsky, N. & Klingenberg, M. (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H⁺ transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J. Biol. Chem.* **269**:27329-27336.
- Brustovetsky, N. & Klingenberg, M. (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry.* **35**:8483-8488.
- Bulychev, A., Kramar, R., Drahota, Z. & Lindberg, O. (1972) Role of a specific endogenous fatty acid fraction in the coupling-uncoupling mechanism of oxidative phosphorylation of brown adipose tissue. *Exp. Cell Res.* **72**:169-187.
- Cadenas, S., Buckingham, J. A., Samec, S., Seydoux, J., Din, N., Dulloo, A. G. & Brand, M. D. (1999) UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett.* **462**:257-260.
- Cannon, B., Nicholls, D.G. & Lindberg, O. (1973) Purine nucleotides and fatty acids in energy coupling of mitochondria from brown adipose tissue. *Mechanisms in Bioenergetics* (Azzone, G.F., Ernster, L., Papa, S., Quagliariello, E., and Siliprandi, N., eds.) Academic Press, New York, pp. 357-363.
- Cannon, B., Sundin, U. & Romert, L. (1977) Palmitoyl coenzyme A: a possible physiological regulator of nucleotide binding to brown adipose tissue. *FEBS Lett.* **74**:43-46.
- Carmona, M. C., Valmaseda, A., Brun, S., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M. & Villarroya, F. (1998) Differential regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 gene expression in brown adipose tissue during development and cold exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**:224-228.
- Cassard-Doulcier, A.M., Gelly, C., Fox, N., Schrementi, J., Raimbault, S., Klaus, S., Forest, C., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (1993) Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol Endocrinol.* **7**:497-506.
- Cassard-Doulcier, A.M., Larose, M., Matamala, J.C., Champigny, O., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (1994) In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. *J Biol Chem.* **269**:24335-24342.
- Cassard-Doulcier, A.M., Gelly, C., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (1998) A 211-bp enhancer of the rat uncoupling protein-1 (UCP-1) gene controls specific and regulated expression in brown adipose tissue. *Biochem J.* **333** :243-246.
- Chan, C.B., MacDonald, P.E., Saleh, M.C., Johns, D.C., Marban, E. & Wheeler, M.B. (1999) Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes.* **48**:1482-1486.
- Chan, C.B., De Leo, D., Joseph, J.W., McQuaid, T.S., Ha, X.F., Xu, F., Tsushima, R.G., Pennefather, P.S., Salapatek, A.M. & Wheeler, M.B. (2001) Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes.* **50**:1302-1310.
- Chavin, K. D., Yang, S., Lin, H. Z., Chatham, J., Chacko, V. P, Hoek, J. B., Walajtys-Rode, E., Rashid, A., Chen, C.H., Huang, C.C., Wu, T.C., Lane, M. D. & Diehl, A. M. (1999) Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J. Biol. Chem.* **274**:5692-5700



- Cheng, G., Polito, C.C., Haines, J.K., Shafizadeh, S.F., Fiorini, R.N., Zhou, X., Schmidt, M.G. & Chavin, K.D. (2003) Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 expression in mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **308**:573-580.
- Chinet, A., Friedli, C., Seydoux, J. & Girardier, L. (1978) Does cytoplasmic alkalization trigger mitochondrial energy dissipation in the brown adipocyte?. *Experientia Suppl.* **32**:25-32.
- Chomiki, N., Voss, J.C. & Warden, C.H. (2001) Structure-function relationships in UCP1, UCP2 and chimeras: EPR analysis and retinoic acid activation of UCP2. *Eur J Biochem.* **268**:903-913.
- Clapham, J.C., Arch, J.R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G.B., Piercy, V., Carter, S.A., Lehner, I., Smith, S.A., Beeley, L.J., Godden, R.J., Herrity, N., Skehel, M., Changani, K.K., Hockings, P.D., Reid, D.G., Squires, S.M., Hatcher, J., Trail, B., Latcham, J., Rastan, S., Harper, A.J., Cadenas, S., Buckingham, J.A., Brand, M.D & Abuin, A. (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature.* **406**:415-418.
- Cline, G.W., Vidal-Puig, A.J., Dufour, S., Cadman, K.S., Lowell, B.B. & Shulman, G.I. (2001) In vivo effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism. *J Biol Chem.* **276**:20240-20244.
- Considine, M.J., Daley, D.O. & Whelan, J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiol.* **126**:1619-16129.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**:10881-10890.
- Cortez-Pinto, H., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Costa, S., Hwang, C.S., Lane, M.D., Bagby, G. & Diehl, A.M. (1998) Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* **251**:313-319.
- Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M.M., Alves-Guerra, M.C., Ricquier, D., Goubern, M. & Bouillaud, F. (2002) No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem.* **277**:26268-26275.
- Cullin, C. & Pompon, D. (1988) Synthesis of functional mouse cytochromes P-450 P1 and chimeric P-450 P3-1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **65**:203-217.
- Cunningham, S., Wiesinger, H. & Nicholls, D.G. (1986) Quantification of fatty acid activation of the uncoupling protein in adipocytes and mitochondria from guinea-pig. *Eur. J. Biochem.* **157**:415-420.
- Curtin, N.A., Clapham, J.C. & Barclay, C.J. (2002) Excess recovery heat production by isolated muscles from mice overexpressing uncoupling protein-3. *J Physiol.* **542**:231-235.
- Cusin, I., Zakrzewska, K.E., Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J.P., Ricquier, D., Jeanrenaud, B. & Rohner-Janrenaud, F. (1998) Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins. *Diabetes* **47**:1014-1019.
- Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J. & Vignais, P.V. (1988) Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido[α -³²P]adenosine diphosphate. *Biochemistry.* **27**:5141-5149.
- Dalgaard, L.T & Pedersen, O. (2001) Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia.* **44**:946-965.
- Darley-Usmar, V.M. (1987) The molecular aetiology of human mitochondrial myopathies. *Biochem. Soc. Trans.* **15**:102-103.



- De Pablo, M.A., Susin, S.A., Jacotot, E., Larochette, N., Costantini, P., Ravagnan, L., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1999) Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. *Apoptosis*. **4**:81-87.
- Del Arco, A., Agud, M. & Satrustegui, J. (2000) Characterization of a second member of the subfamily of calcium-binding mitochondrial carriers expressed in human non-excitabile tissues. *Biochem J*. **345**:725-32.
- Desautels, M., Zaror-Behrens, G. & Himms-Hagen, J. (1978) Increased purine nucleotide binding, altered polypeptide composition, and thermogenesis in brown adipose tissue mitochondria of cold-acclimated rats. *Can J Biochem*. **56**:378-383.
- Di Donato, A., de Nigris, M., Russo, N., Di Biase, S. & D'Alessio G. (1993) A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. **212**:291-293.
- Dierks, T., Salentin, A., Heberger, C. & Kramer, R. (1990a) The mitochondrial aspartate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents. *Biochim Biophys Acta*. **1028**:268-280
- Dierks, T., Salentin, A. & Kramer, R. (1990b) Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a performed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim Biophys Acta*. **1028**:281-288.
- Dulloo, A.G. & Samec, S. (2001) Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. *Br J Nutr*. **86**:123-139.
- Echtay, K.S., Bienengraeber, M. & Klingenberg, M. (1997) Mutagenesis of the uncoupling protein of brown adipose tissue. Neutralization of E190 largely abolishes pH control of nucleotide binding. *Biochemistry*. **36**:8253-8260.
- Echtay, K.S., Bienengraeber, M., Winkler, E. & Klingenberg, M. (1998) In the uncoupling protein (UCP-1) His-214 is involved in the regulation of purine nucleoside triphosphate but not diphosphate binding. *J Biol Chem*. **273**:24368-24374
- Echtay, K. S., Liu, Q., Caskey, T., Winkler, E., Frischmuth, K., Bienengräber, M. & Klingenberg, M. (1999) Regulation of UCP3 by nucleotides is different from regulation of UCP1. *FEBS Lett*. **450**:8-12.
- Echtay, K.S., Winkler, E. & Klingenberg, M. (2000b) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*. **408**:609-613.
- Echtay, K.S., Winkler, E., Bienengraeber, M. & Klingenberg, M. (2000a) M. Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. *Biochemistry*. **39**:3311-3317.
- Echtay, K.S. & Brand, M.D. (2001) Coenzyme Q induces GDP-sensitive proton conductance in kidney mitochondria. *Biochem. Soc. Trans*. **29**:763-768.
- Echtay, K.S., Bienengraeber, M. & Klingenberg, M. (2001a) Role of intrahelical arginine residues in functional properties of uncoupling protein (UCP1). *Biochemistry*. **40**:5243-5248.
- Echtay, K.S., Winkler, E., Frischmuth, K. & Klingenberg, M. (2001b) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**:1416-1421
- Echtay, K.S., Murphy, M.P., Smith, A.J.R., Talbot, D.A. & Brand, M. D. (2002a) Superoxide Activates Mitochondrial Uncoupling Protein 2 from the Matrix Side. *J Biol Chem*. **277**:47129-47135



- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C. & Brand, M.D. (2002b) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. **415**:96-99.
- Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.L., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S.J. & Brand, M.D. (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J*. **22**:4103-4110.
- Eckerskorn, C. & Klingenberg, M. (1987) In the uncoupling protein from brown adipose tissue the C-terminus protrudes to the c-side of the membrane as shown by tryptic cleavage. *FEBS Lett*. **226**:166-170.
- El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur, J. & Sluse, FE. (1997) Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**:573-581.
- Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E. & Kozak, L.P. (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*. **387**:90-94.
- Fernandez, M., Nicholls, D.G. & Rial E. (1987) The uncoupling protein from brown-adipose-tissue mitochondria. Chymotrypsin-induced structural and functional modifications. *Eur J Biochem*. **164**:675-680.
- Fink, B.D., Hong, Y.S., Mathahs, M.M., Scholz, T.D., Dillon, J.S. & Sivitz, W.I. (2002) UCP2-dependent proton leak in isolated mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem*. **277**:3918-3925
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. & Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*. **15**:269-272.
- Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, S. & Jezek, P. (1996) On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem*. **271**:2615-2620.
- Garlid, K.D., Jaburek, M. & Jezek, P. (1998) The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett*. **438**:10-14.
- Gesner, C. (1551) *Medici Tigurini Historiae Animalium. Liber II, qui est de Quadrupedibus Ouparis (de Mure Alpino)* pp. 840-843.
- Giacobino, J.P. (2002) Uncoupling proteins, leptin, and obesity: an updated review. *Ann N Y Acad Sci*. **967**:398-402.
- Gimeno, R.E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A.W., Gimeno, C.J, Iris, F., Ellis, S.J., Woolf, E.A & Tartaglia, L.A. (1997) Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*. **46**:900-906.
- Gong, D.W., He, Y., Karas, M. & Reitman, M. (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*. **272**:24129-24132.
- Gong, D.W., Bi, S., Weintraub, B.D. & Reitman, M. (1998) Rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene: multiple promoters, high levels in brown adipose tissue, and tissue-specific regulation by thyroid hormone. *DNA Cell Biol*. **17**:301-309.
- Gong, D.W., He, Y. & Reitman, M.L. (1999) Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes. *Biochem. Biophys Res. Commun*. **256**:27-32.



- González-Barroso, M.M. (1997) Caracterización de dominios implicados en el control del transporte en la proteína desacoplante de las mitocondrias del tejido adiposo pardo. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Bouillaud, F. & Rial, E. (1997) Deletion of amino acids 261-269 in the brown fat uncoupling protein converts the carrier into a pore, *Biochemistry* **36**: 10930-10935.
- Gonzalez-Barroso, M., Fleury, C., Bouillaud, F., Nicholls, D.G & Rial, E. (1998) The uncoupling protein UCP1 does not increase the proton conductance of the inner mitochondrial membrane by functioning as a fatty acid anion transporter. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 15528-15532.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Jimenez, M.A., Sanz, J.M., Romero, A., Bouillaud, F. & Rial, E. (1999) Structural and functional study of a conserved region in the uncoupling protein UCP1: the three matrix loops are involved in the control of transport. *J Mol Biol*. **292**:137-149.
- Grav, H.J., Pedersen, J.I. & Christiansen, E.N. (1970) Conditions in vitro which affect respiratory control and capacity for respiration-linked phosphorylation in brown adipose tissue mitochondria. *Eur J Biochem*. **12**:11-23.
- Guillory, R.J. & Racker, E. (1968) Oxidative phosphorylation in brown adipose mitochondria. *Biochim. Biophys Acta*. **153**:490-493.
- Hagen, T. & Lowell, B.B. (2000) Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. **276**:642-648.
- Hamilton, J.A. (1998) Fatty acid transport: difficult or easy?. *J. Lipid Res*. **39**:467-481.
- Harper, M.E., Dent, R., Monemdjou, S., Bezaire, V., Van Wyck, L., Wells, G., Kavaslar, G.N., Gauthier, A., Tesson, F. & McPherson, R. (2002a) Decreased mitochondrial proton leak and reduced expression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle of obese diet-resistant women. *Diabetes*. **51**:2459-2466.
- Harper J.A., Stuart J.A, Jekabsons M.B., Roussel D., Brindle K.M., Dickinson K., Jones R.B. & Brand M.D.(2002b) Artfactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J*. **361**:49-56.
- Heaton, G.M. & Nicholls, D.G. (1976) Hamster brown adipose tissue mitochondria: the role of fatty acids in the control of the proton conductance of the inner membrane. *Eur. J. Biochem*. **67**:511-517.
- Heaton, G.M. & Nicholls, D.G. (1977) The structural specificity of the nucleotide-binding site and the reversible nature of the inhibition of proton conductance induced by bound nucleotides in brown-adipose-tissue mitochondria. *Biochem Soc Trans*. **5**:210-212.
- Heaton, G.M., Wagenvoort, R.J., Kemp, A. & Nicholls, D.G. (1978) Brown adipose tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem*. **82**:515-521.
- Herick, K. & Kramer, R. (1995) Kinetic and energetic characterization of solute flux through the reconstituted aspartate/glutamate carrier from beef heart mitochondria after modification with mercurials. *Biochim. Biophys Acta*. **1238**:63-71
- Herick, K., Kramer, R. & Lühring, H. (1997) Patch clamp investigation into the phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. **1321**:207-220.
- Himms-Hagen, J. (1989) Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can J Physiol Pharmacol*. **67**:394-401



- Himms-Hagen, J. & Harper, M.E. (2001) Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. **226**:78-84.
- Hinz, W., Faller, B., Gruninger, S., Gazzotti, P. & Chiesi, M. (1999) Recombinant human uncoupling protein-3 increases thermogenesis in yeast cells. *FEBS Lett*. **448**:57-61.
- Hittelman, H.K., Lindberg, O. & Cannon, B. (1969) Oxidative phosphorylation and compartmentation of fatty acid metabolism in brown fat mitochondria. *Eur. J. Biochem*. **11**:183-192.
- Hohorst, H.J. & Rafael, J. (1968) Oxydative phosphorylierung durch mitochondrien aus braunem fettgewebe. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. **349**:268-270.
- Hong, Y., Fink, B.D., Dillon, J.S. & Sivitz, W.I. (2001) Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology*. **142**:249-256.
- Horvath, T.L., Warden, C.H., Hajos, M., Lombardi, A., Goglia, F. & Diano, S. (1999) Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. *J Neurosci*. **19**:10417-10427.
- Horvath, T.L., Diano, S. & Barnstable, C. (2003) Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector. *Biochem Pharmacol*. **65**:1917-1921.
- Hourton-Cabassa, C., Mesneau, A., Miroux, B., Roussaux, J., Ricquier, D., Zachowski, A. & Moreau, F. (2002) Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement. *J Biol Chem*. **277**:41533-41538.
- Huang, S.G. & Klingenberg, M. (1995) Fluorescent nucleotide derivatives as specific probas for the uncoupling protein: thermodynamics and kinetics of binding and the control by pH. *Biochemistry* **34**:349-360.
- Huang, S.G. & Klingenberg, M. (1996a) Chloride channel properties of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria: a patch-clamp study. *Biochemistry*. **35**:16806-16814.
- Huang, S.G. & Klingenberg, M. (1996b) Two-stage nucleotide binding mechanism and its implications to H⁺ transport inhibition of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *Biochemistry*. **35**:7846-7854.
- Huang, S.G., Lin, Q.S. & Klingenberg, M. (1998) Slow-phase kinetics of nucleotide binding to the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem*. **273**:859-864.
- Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1996) PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci*. **5**:212-220.
- Hwang, C.S. & Lane, M.D. (1999) Up-regulation of uncoupling protein-3 by fatty acid in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*. **258**:464-469.
- Indiveri, C., Tonazzi, A., Dierks, T., Kramer, R. & Palmieri, F. (1992) The mitochondrial carnitine carrier: characterization of SH-groups relevant for its transport function. *Biochim Biophys Acta*. **1140**:53-58.
- Indiveri, C., Tonazzi, A. & Palmieri, F. (1994) The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators. *Biochim Biophys Acta*. **1189**:65-73.



- Indiveri, C., Iacobazzi, V., Giangregorio, N. & Palmieri, F. (1997) The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem J.* **321**:713-719.
- Indiveri, C., Iacobazzi, V., Giangregorio, N. & Palmieri, F. (1998) Bacterial overexpression, purification, and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* **249**:589-594.
- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A. & Garlid, K.D. (1999) Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **274**:26003–26007
- Jaburek, M., Varecha, M., Jezek, P. & Garlid, K.D. (2001) Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. Ion pair transport demonstrates that direct H(+) translocation by UCP1 is not necessary for uncoupling. *J Biol Chem.* **276**:31897-31905.
- Jaburek, M. & Garlid, K.D. (2003) Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *J Biol Chem.* **278**:25825-25831.
- Jacobsson, A., Stadler, U., Glotzer, M.A. & Kozak, L.P. (1985) Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J Biol Chem.* **260**:16250-16254.
- Jekabsons, M.B., Echtag, K.S. & Brand, M.D. (2002) Nucleotide binding to human uncoupling protein-2 refolded from bacterial inclusion bodies. *Biochem J.* **366**:565-571.
- Jezek, P. (1987) Sulfhydryl groups are involved in H⁺ translocation via the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* **211**:89-93.
- Jezek, P. & Drahot, Z. (1989) Sulfhydryl groups of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Distinction between sulfhydryl groups of the H⁺ channel and the nucleotide binding site. *Eur J Biochem.* **183**:89-95.
- Jezek, P. & Garlid, K.D. (1990) New substrates and competitive inhibitors of the Cl⁻ translocating pathway of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem.* **265**:19303-19311.
- Jezek, P., Orosz, D.E & Garlid, K.D. (1990) Reconstitution of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Demonstration of GDP-sensitive halide anion uniport. *J Biol Chem.* **265**:19296-19302.
- Jezek, P., Orosz, D.E., Modriansky, M. & Garlid, K.D. (1994) Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem.* **269**:26184-26190
- Jezek, P., Hanus, J., Semrad, C. & Garlid, K.D. (1996) Photoactivated azido fatty acid irreversibly inhibits anion and proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem.* **271**:6199-6205.
- Jezek, P., Modriansky, M. & Garlid, K.D. (1997a) A structure-activity study of fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling protein. *FEBS Lett.* **408** : 166-170.
- Jezek, P., Modriansky, M. & Garlid, K.D. (1997b) Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett.* **408**:161-165.
- Jezek, P., Engstova, H., Zackova, M., Vercesi, A.E., Costa, A.D., Arruda, P. & Garlid, K.D. (1998) Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1365**:319-327.



- Jezek, P. & Urbankova, E. (2000) Specific sequence of motifs of mitochondrial uncoupling proteins. *IUBMB Life*. **49**:63-70.
- Khalfallah, Y., Fages, S., Laville, M., Langin, D., & Vidal, H. (2000) Regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 mRNA expression during lipid infusion in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes*. **49**:25-31.
- Klingenberg, M. & Winkler, E. (1985) The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator. *EMBO J*. **4**:3087-3092.
- Klingenberg, M. (1986) On the role of physical parameters in the regulation of electron transport: diffusion, collision, and complex formation. *J Bioenerg Biomembr*. **18**:447-451.
- Klingenberg, M. (1988) Nucleotide binding to uncoupling protein. Mechanism of control by protonation. *Biochemistry*. **27**:781-791.
- Klingenberg, M. & Appel, M. (1989) The uncoupling protein dimer can form a disulfide cross-link between the mobile C-terminal SH groups. *Eur J Biochem*. **180**:123-131.
- Klingenberg, M. (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem. Sci*. **15**:108-112.
- Klingenberg, M. (1993) Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *J Bioenerg Biomembr*. **25**:447-457.
- Klingenberg, M. & Huang, S.G. (1999) Structure & function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*. **1415**:271-296.
- Klingenberg, M. & Echtay, K.S. (2001) Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochim Biophys Acta*. **1504**:128-143.
- Klingenberg, M. (2001) Uncoupling proteins--how do they work and how are they regulated. *IUBMB Life*. **52**:175-179
- Klingenberg, M. A study of enzymes: Mechanism of enzyme action. (Kuby, S.A. ed.). CRC Press, Boca Ratón, pp. 367-390.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. & Schatz, G. (1998) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*. **279**:369-73
- Kopecky, J., Jezek, P., Drahota, Z. & Houstek, J. (1987) Control of uncoupling in brown fat mitochondria by purine nucleotides: chemical modification by diazobenzenesulfonate. *Eur. J. Biochem*. **164**:687-694.
- Korshunov, S.S., Korkina, O.V., Ruuge, E.K., Skulachev, V.P. & Starkov, A.A. (1998) Fatty acids as natural uncouplers preventing the generation of O₂⁻ and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett*. **435**:215-218.
- Kowaltowski, A. J., Costa, A. D. & Vercesi, A. E. (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett*. **425**: 213-216.
- Krämer, R. & Palmieri, F. (1992). Molecular Mechanism in Bioenergetics (Ernster, L. Ed.) pp. 359-384. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Krauss, S., Zhang, C.Y. & Lowell, B.B. (2002) A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:118-122.



- Kuan, J. & Saie, M.H. Jr. (1993) The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **28**:209-233.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* **157**:105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J.W., Muller-Rober, B., Fleury, C., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (1997) A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature.* **389**:135-136.
- Langin, D. (2001) Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion. *N Engl J Med.* **345**:1772-1774.
- Lanni, A., Beneduce, L., Lombardi, A., Moreno, M., Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J.P. & Goglia, F. (1999) Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* **444**:250-254.
- LaNoue, K.F., Koch, C.D. & Meditz, R.B. (1982) Mechanism of action of norepinephrine in hamster brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **257**:13740-13748.
- Lanyi, J.K. (1993) Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta.* **1183**:241-261.
- Laybutt D.R., Sharma A., Sgroi D.C., Gaudet J., Bonner-Weir S., & Weir G.C. (2002) Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem.* **277**:10912-10921.
- Ledesma, A., de Lacoba, M.G., Arechaga, I. & Rial, E. (2002a) Modeling the transmembrane arrangement of the uncoupling protein UCP1 and topological considerations of the nucleotide-binding site. *J Bioenerg Biomembr.* **34**:473-486.
- Ledesma, A., de Lacoba, M.G. & Rial, E. (2002b). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* **3**(12):reviews 3015.
- Ledesma, A. & Rial, E. (2004) Carrier and channel properties of mitochondrial transporters: Physiology and pathology? *Toxicology Mechanisms and Methods* **14**:41-46.
- Lee, F.Y., Li, Y., Zhu, H., Yang, S., Lin, H.Z., Trush, M. & Diehl, A.M. (1999) Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology.* **29**:677-687.
- Lepkovsky, S., Wang, W., Koike, T. & Dimick, M.K. (1959) The oxygen uptake by particulate suspensions (mitochondrial) from liver, brown and white fatty tissues. *Fed. Proc.* **18**:272.
- Lin, C.S., Hackenberg, H. & Klingenberg, M. (1980) The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study. *FEBS Lett.* **113**:304-306.
- Lin, C.S. & Klingenberg, M. (1982) Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. *Biochemistry.* **21**:2950-2956
- Lin, B., Coughlin, S. & Pilch, P.F. (1998) Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am J Physiol.* **275**:E386-E391
- Li, B., Nolte, L.A., Ju, J.S., Han, D.H., Coleman, T., Holloszy, J.O. & Semenkovich, C.F. (2000) Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nat Med.* **6**:1115-1120.



- Lindberg, O., De Pierre, J., Rylander, E. & Afzelius, B.A. (1967) Studies of the mitochondrial energy-transfer system of brown adipose tissue. *J. Cell Biol.* **34**:293-310.
- Locke, R.M. & Nicholls, D.G. (1981) A re-evaluation of the role of fatty acids in the physiological regulation of the proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* **135**:249-252.
- Locke, R.M., Rial, E. & Nicholls, D.G. (1982a) The acute regulation of mitochondrial proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea-pigs. *Eur. J. Biochem.* **129**:381-387.
- Locke, R.M., Rial, E., Scott, I.D & Nicholls, D.G. (1982b) Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown fat mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **129**:373-380.
- Majima, E., Koike, H., Hong, Y.M., Shinohara, Y. & Terada, H. (1993) Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide. *J Biol Chem.* **268**:22181-22187.
- Maniatis, T., Fitch, E.F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. & Pan, G. (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* **443**,326-330
- Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C.H., Castilho, R.F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K. & Wieloch, T. (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med.* **9**:1062-1068.
- Mayinger, P., Winkler, E. & Klingenberg, M. (1989) The ADP/ATP carrier from yeast (AAC-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett.* **244**:421-426.
- Mayinger, P. & Klingenberg, M. (1992) Labeling of two different regions of the nucleotide binding site of the uncoupling protein from brown adipose tissues mitochondria with two ATP analogs. *Biochemistry.* **31**: 10536–10543.
- McCarthy, C. (1996–1997) Chromas v.1.43. Brisbane, Australia www.seqwright.com/chromas/Page.html
- Melia, H.P., Andrews, J.F., McBennett, S.M. & Porter, R.K. (1999) Effects of acute leptin administration on the differences in proton leak rate in liver mitochondria from ob/ob mice compared to lean controls. *FEBS Lett.* **458**:261-264.
- Millet, L., Vidal, H., Andreelli, F., Larrouy, D., Riou, J.P., Ricquier, D., Laville, M. & Langin, D. (1997) Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J. Clin. Investig.* **100**:2665-2670
- Millet, L., Vidal, H., Larrouy, D., Andreelli, F., Laville, M. & Langin, D. (1998) mRNA expression of the long and short forms of uncoupling protein-3 in obese and lean humans. *Diabetologia.* **41**:829-832.
- Milner, R.E. & Trayhurn, P. (1988) Evidence that the acute unmasking of GDP-binding sites in brown adipose tissue mitochondria is not dependent on mitochondrial swelling. *Biochem Cell Biol.* **66**:1226-1230.
- Milner, R.E., Wilson, S., Arch, J.R. & Trayhurn, P. (1988) Acute effects of a beta-adrenoceptor agonist (BRL 26830A) on rat brown-adipose-tissue mitochondria. Increased GDP binding and GDP-



sensitive proton conductance without changes in the concentration of uncoupling protein. *Biochem J.* **249**:759-763.

Minners, J., Van den Bos, E.J., Yellon, D.M., Schwalb, H., Opie, L.H. & Sack, MN. (2000) Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovasc Res.* **47**:68-73.

Miroux, B., Casteilla, L., Klaus, S., Raimbault, S., Grandin, S., Clement, J.M., Ricquier, D. & Bouillaud, F. (1992) Antibodies selected from whole antiserum by fusion proteins as tools for the study of the topology of mitochondrial membrane proteins. Evidence that the N-terminal extremity of the sixth alpha-helix of the uncoupling protein is facing the matrix. *J Biol Chem.* **267**:13603-13609.

Miroux, B., Frossard, V., Raimbault, S., Ricquier, D. & Bouillaud, F. (1993) The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J.* **12**:3739-3745.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* (London). **191**: 423-427.

Mitchell, P. (1976) Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochem Soc Trans.* **4**:399-430.

Modriansky, M., Murdza-Inglis, D.L., Patel, H.V., Freeman, K.B. & Garlid, K.D. (1997) Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *J Biol Chem.* **272**:24759-24762.

Monemdjou, S., Kozak, L. P. & Harper, M.E. (1999) Mitochondrial proton leak in brown adipose tissue mitochondria of UCP1-deficient mice is GDP insensitive. *Am. J. Physiol.* **276**:E1073-E1082.

Murdza-Inglis, D.L., Modriansky, M., Patel, H.V., Woldegiorgis, G., Freeman, K.B. & Garlid, K.D.. (1994) A single mutation in uncoupling protein of rat brown adipose tissue mitochondria abolishes GDP sensitivity of H⁺ transport. *J Biol Chem.* **269**:7435-7438

Nedergaard, J. & Cannon, B. (1985) [³H]GDP binding and thermogenin amount in brown adipose tissue mitochondria from cold-exposed rats. *Am J Physiol.* **248**:C365-C371.

Nedergaard, J. & Cannon, B. (1987) Apparent unmasking of [3H]GDP binding in rat brown-fat mitochondria is due to mitochondrial swelling. *Eur J Biochem.* **164**:681-686.

Nedergaard, J. & Cannon, B. (1992) The uncoupling protein thermogenin and mitochondrial thermogenesis. *New Comprehensive Biochem.* **23**:385-420

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. & Cannon, B. (2001) UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta.* **1504**:82-106.

Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L. & Casteilla, L. (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* **11**:809-815.

Nicholls, D.G. & Lindberg, O. (1973) Brown adipose tissue mitochondria: The influence of albumin and nucleotides on passive ion permeabilities. *Eur. J. Biochem.* **37**:523-530.

Nicholls, D.G. (1974a) Hamster brown adipose tissue mitochondria: the chloride permeability of the inner membrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. *Eur. J. Biochem.* **49**: 585-593.



- Nicholls, D.G. (1974b) Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of the inner membrane. *Eur J Biochem.* **49**:3:573-583.
- Nicholls, D.G. (1976a) Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur J Biochem.* **62**:223-228.
- Nicholls, D.G. (1976b) The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* **61**:103-110.
- Nicholls, D.G. (1977) The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue. Dependency on proton electrochemical potential gradient. *Eur J Biochem.* **77**:349-356.
- Nicholls, D.G. & Heaton, G. (1978) Anion uniport across inner membrane of brown adipose tissue mitochondria. En *The proton and calcium pumps* (Azzone, G.F., Avron, M., Metcalfe, J.C., Quagliariello, E., Silipandri, N. Eds.) pp 309-318. Elsevier, Amsterdam
- Nicholls, D.G. (1979) Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **549**:1-29.
- Nicholls, D.G. & Locke, R.M. (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* **64**:1-64.
- Nicholls, D.G. & Rial, E. (1989) Measurement of proton leakage across mitochondrial inner membranes and its relation to protonmotive force. *Methods Enzymol.* **174**:85-94
- Nicholls D.G. & Rial E.(1999) A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**:399-406.
- Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics 3*. Academic Press, London.
- Nobes, C.D., Brown, G.C., Olive, P.N. & Brand, M.D. (1990) Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *J Biol Chem.* **265**:12903-12909.
- Palmieri, F., Bisaccia, F., Iacobazzi, V., Indiveri, C. & Zara, V. (1992) Mitochondrial substrate carriers. *Biochim Biophys Acta.* **1101**:223-227
- Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F. & Kramer, R. (1993) Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers. *J Bioenerg Biomembr.* **25**:525-535.
- Palmieri, F. (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* **346**: 48-54
- Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F. & Iacobazzi, V. (1995) Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol.* **260**:349-369.
- Palmieri, F., Bisaccia, F., Capobianco, L., Dolce, V., Fiermonte, G., Iacobazzi, V., Indiveri, C. & Palmieri, L. (1996) Mitochondrial metabolite transporters. *Biochim Biophys Acta.* **1275**:127-132
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., Voza, A., Agrimi, G., Fiermonte, G., Runswick, M.J., Walker, J.E. & Palmieri, F. (2000) Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* **1459**:363-369
- Palmieri, F. (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* **447**:689-709.
- Pastore, D., Fratianni, A., Di Pede, S. & Passarella, S. (2000) Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Lett.* **470**: 88-92.
- Patane G., Anello M., Piro S., Vigneri R., Purrello F. & Rabuazzo A.M.(2002) Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high



glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes*. **51**:2749-2756.

Paulik, M.A., Buckholz, R.G., Lancaster, M.E., Dallas, W.S., Hull-Ryde, E.A., Weiel, J.E. & Lenhard, J.M. (1998) Development of infrared imaging to measure thermogenesis in cell culture: Thermogenic effects of uncoupling protein-2, troglitazone, and b-adrenoceptor agonists. *Pharm. Res.* **15**:944-949.

Peachey, T., French, R.R. & York, D.A. (1988) Regulation of GDP binding and uncoupling-protein concentration in brown-adipose-tissue mitochondria. The effects of cold-acclimation, warm-reacclimation and noradrenaline. *Biochem J.* **249**:451-457.

Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G.J. & Brandolin, G. (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*. **426**:39-44.

Pecqueur, C., Cassard-Doulier, A.M., Raimbault, S., Miroux, B., Fleury, C., Gelly, C., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (1999) Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**:40-46.

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. & Miroux, B. (2001) Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem.* **276**:8705-8712.

Pedersen, J.I., Christiansen, E.N. & Grav, H.J. (1968) Respiration-linked phosphorylation in mitochondria of guinea-pig brown fat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**:492-500.

Pompon, D. (1988) cDNA cloning and functional expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* of beta-naphthoflavone-induced rabbit liver P-450 LM4 and LM6. *Eur J Biochem.* **177**:285-293.

Pressman, B.C. & Lardy, H.A. (1952) Influence of potassium and other alkali ions on respiration of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **197**:547-556.

Pressman, B.C. & Lardy, H.A. (1956) Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **21**:458-466.

Prieto, S., Bouillaud, F. & Rial, E. (1995) The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **307**:657-661.

Rafael, J. & Heldt, H.W. (1976) Binding of guanine nucleotides to the outer surface of the inner membrane of guinea pig brown fat mitochondria in correlation with the thermogenic activity of the tissue. *FEBS Lett.* **63**:304-308.

Rafael, J., Ludolph, H.J. & Hohorst, H.J. (1969) Mitochondria from brown adipose tissue: uncoupling of respiratory chain phosphorylation by long fatty acids and recoupling by guanosine triphosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **350**:1121-1131.

Rafael, J., Fesser, W. & Nicholls, D.G. (1986) Cold adaptation in guinea pig at level of isolated brown adipocyte. *Am. J. Physiol.* **250**:C228-C235.

Rafael, J., Pampel, I. & Wang, X. (1994) Effect of pH and MgCl₂ on the binding of purine nucleotides to the uncoupling protein in membrane particles from brown fat mitochondria. *Eur J Biochem.* **223**:971-980.

Rashid, A., Wu, T.C., Huang, C.C., Chen, C.H., Lin, H.Z., Yang, S.Q., Lee, F.Y. & Diehl, A.M. (1999) Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology.* **29**:1131-1138.

Rial, E. & Nicholls, D.G. (1983) The regulation of the proton conductance of brown fat mitochondria. Identification of functional and non-functional nucleotide-binding sites. *FEBS Lett.* **161**:284-288.



- Rial, E., Poustie, A. & Nicholls, D. G. (1983) Brown-adipose-tissue mitochondria: The regulation of the 32000- M_r uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. *Eur. J. Biochem.* **137**: 197-203.
- Rial, E. & Nicholls, D.G. (1984) The mitochondrial uncoupling protein from guinea-pig brown adipose tissue. Synchronous increase in structural and functional parameters during cold-adaptation. *Biochem J.* **222**:685-693.
- Rial, E. & Nicholls, D.G. (1986) Chemical modification of the brown-fat-mitochondrial uncoupling protein with tetranitromethane and N-ethylmaleimide. A cysteine residue is implicated in the nucleotide regulation of anion permeability. *Eur J Biochem.* **161**:689-694.
- Rial, E. & Nicholls, D.G. (1987) The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *Cell Biol. Rev.* **11**: 75-104
- Rial, E., Arechaga, I., Sainz-de-la-Maza, E. & Nicholls, D.G. (1989) Effect of hydrophobic sulphydryl reagents on the uncoupling protein and inner-membrane anion channel of brown-adipose-tissue mitochondria. *Eur J Biochem.* **182**:187-193.
- Rial, E., Muga, A., Valpuesta, J.M., Arrondo, J.L. & Goni, F.M. (1990) Infrared spectroscopic studies of detergent-solubilized uncoupling protein from brown-adipose-tissue mitochondria. *Eur J Biochem.* **188**:83-89.
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C. & Bouillaud, F. (1998) The structure and function of the brown fat uncoupling protein UCP1: current status. *Biofactors.* **8**:209-219.
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Gubern, M. & Bouillaud, F. (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2.. *EMBO Journal* **18**:5827-5833.
- Rial, E. & Gonzalez-Barroso, M.M.(2001) Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta.* **1504**:70-81.
- Rial, E., Aguirregoitia, E., Jiménez-Jiménez, J. & Ledesma, A. (2004) Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1. Implications for the transport mechanism. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1608**:122-130.
- Richard, D., Rivest, R., Huang, Q., Bouillaud, F., Sanchis, D., Champigny, O. & Ricquier, D. (1998) Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **397**:549-560.
- Richieri, G.V., Anel, A. & Kleinfeld, A.M. (1993) Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry.* **32**:7574-7580.
- Ricquier, D. & Kader, J.C. (1976) Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **73**:577-583
- Ricquier, D. & Bouillaud, F. (1997) The mitochondrial uncoupling protein: structural and genetic studies. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **56**:83-108.
- Ricquier, D. & Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.*, **345**: 161-179
- Ridley, R.G., Patel, H.V., Gerber, G.E., Morton, R.C. & Freeman, K.B.. (1986) Complete nucleotide and derived amino acid sequence of cDNA encoding the mitochondrial uncoupling protein of rat brown adipose tissue: lack of a mitochondrial targeting presequence. *Nucleic Acids Res.* **14**:4025-4035



- Robillard, G.T. & Konings, W.N. (1982) A hypothesis for the role of dithiol-disulfide interchange in solute transport and energy-transducing processes. *Eur J Biochem.* **127**:597-604.
- Rothwell, N.J. & Stock, M.J. (1979) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature.* **281**:31-5.
- Rychlik, W. (1989) Oligo.exe versión 3.4. Boreland Int.
- Saleh, M.C., Wheeler, M.B. & Chan, C.B. (2002) Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia.* **45**:174-187.
- Samartsev, V.N., Smirnov, A.V., Zeldi, I.P., Markova, O.V., Mokhova, E.N. & Skulachev, V.P. (1997) Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**:251-257.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edit.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Samec, S., Seydoux, J. & Dulloo, A. G. (1998a) Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate?. *FASEB J.* **12**:715-724.
- Samec, S., Seydoux, J. & Dulloo, A.G. (1998b) Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids?. *Diabetes.* **47**:1693-1698.
- Samec, S., Seydoux, J. & Dulloo, A.G. (1999) Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance. *Diabetes.* **48**:436-441.
- Sanchis, C., Fleury, N., Chomiki, M., Goubern, Q., Huang, M., Neverov, F., Gregoire, J., Easlick, S., Raimbault, C., Levi-Meyrueis, B., Miroux, S., Collins, M., Seldin, D., Richard, C., Warden, F., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (1998) BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* **273**: 34611-34615.
- Saraste, M. & Walker, J.E. (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* **144**:250-4
- Scarpace, P.J., Nicolson, M. & Matheny, M. (1998) UCP2, UCP3 and leptin gene expression: modulation by food restriction and leptin. *J. Endocrinol.* **159** :349-357.
- Schleiff, E. & McBride, H. (2000) The central matrix loop drives import of uncoupling protein 1 into mitochondria. *J Cell Sci.* **113**:2267-2272.
- Schluter, A., Barbera, M.J., Iglesias, R., Giral, M. & Villarroya, F. (2002) Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem. J.* **362**:61-69.
- Schonfeld, P. & Bohnensack, R. (1997) Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett.* **420**:167-170.
- Schrauwen, P. & Hesselink, M. (2002) UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol.* **205**:2275-2285.
- Schrauwen, P., Saris, W.H. & Hesselink, M.K. (2001) An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J.* **15**:2497-502.



- Schrauwen, P. (2002) Skeletal muscle uncoupling protein 3 (UCP3): mitochondrial uncoupling protein in search of a function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **5**:265-270.
- Schroers, A., Burkovski, A., Wohlrab, H. & Kramer, R. (1998) The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J Biol Chem.* **273**:14269-14276.
- Schwabe, J.W. & Rhodes, D. (1991) Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem Sci.* **16**:291-296.
- Silva, J.E. & Rabelo, R. (1997) Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol.* **136**:251-264.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. & Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature.* **391**:912-915.
- Skulachev, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **294**: 158-162.
- Skulachev, V.P. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.* **397**:7-10.
- Skulachev, V.P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta,* **1363**: 100-124.
- Skulachev, V.P. (1999) Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J Bioenerg Biomembr.* **31**:431-445.
- Smith, R.E., Roberts, J.C. & Hittelman, K.J. (1966) Nonphosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats, *Science* **154**:653-654.
- Smith, R.E. & Horwitz, B.A. (1969) Brown fat and thermogenesis, *Physiol. Rev.* **49**:330-425.
- Solanes, G., Vidal-Puig, A., Grujic, D., Flier, J. S. & Lowell, B. B. (1997) The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal location, and genetic basis for short and long form transcripts. *J. Biol. Chem.* **272**:25433-25436.
- Stappen, R. & Kramer, R. (1993) Functional properties of the reconstituted phosphate carrier from bovine heart mitochondria: evidence for asymmetric orientation and characterization of three different transport modes. *Biochim Biophys Acta.* **1149**:40-48.
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Jekabsons, M.B. & Brand, M.D. (2001) Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria. *J Biol Chem.* **276**:18633-18639
- Surwit, R. S., Wang, S., Petro, A. E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D. & Collins, S. (1998) Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:4061-4065.
- Swick, A.G., Kemnitz, J.W., Houser, W.D. & Swick, R.W. (1986) Norepinephrine stimulates activity of brown adipose tissue in rhesus monkeys. *Int J Obes.* **10**:241-244.
- Swick, A.G. & Swick, R.W. (1988) Changes in GDP binding to brown adipose tissue mitochondria and the uncoupling protein. *Am J Physiol.* **255**:E865-E870.
- Teshima, Y., Akao, M., Jones, S.P. & Marban, E. (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res.* **93**:192-200.



- Tomas, P., Ledesma, A. & Rial, E. (2002) Photoaffinity labeling of the uncoupling protein UCP1 with retinoic acid: ubiquinone favors binding. *FEBS Lett.* **526**:63-65.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**:4350-4354.
- Trayhurn, P. & James, W.P.T (1983) Thermogenesis and obesity. Mamalian thermogenesis. (Giraldier, L. & Stock, M.J., Eds.) pp 234-258. Chapman & Hall, Ltd. London.
- Trayhurn, P. & Nicholls, D.G. (1986) Brown adipose tissue. Edward Arnold (Publishers), London.
- Trayhurn, P., Ashwell, M., Jennings, G., Richard, D. & Stirling, D.M. (1987) Effect of warm or cold exposure on GDP binding and uncoupling protein in rat brown fat. *Am. J. Physiol.* **252**:E237-E243
- Turrens, J.F.(1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* **17**:3-8.
- Urbankova, E., Hanak, P., Skobisova, E., Ruzicka, M. & Jezek, P. (2003) Substitutional mutations in the uncoupling protein-specific sequences of mitochondrial uncoupling protein UCP1 lead to the reduction of fatty acid-induced H⁺ uniport. *Int J Biochem Cell Biol.* **35**:212-220.
- Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S. & Lowell, B.B. (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* **235**:79-82.
- Vidal-Puig, A., Rosenbaum, M., Considine, R. C., Leibel, R. L., Dohm, G. L. & Lowell, B. B. (1999) Effects of obesity and stable weight reduction on UCP2 and UCP3 gene expression in humans. *Obes. Res.* **7**:133-140.
- Viguera, A.R., Goni, F.M. & Rial, E. (1992) The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. The environment of the tryptophan residues as revealed by quenching of the intrinsic fluorescence. *Eur J Biochem.* **210**:893-899.
- Villarroya F., Giral M. & Iglesias R. (1999) Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **23**:1-6.
- Walker, J.E. (1992) The mitochondrial transporter family. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **2**:519-526.
- Walker, J.E. & Runswick, M.J. (1993) The mitochondrial transport protein superfamily. *J. Bioenerg Biomembr 1993.* **25**:435-446.
- Wang, C. & Smith, R.L. (1975) Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. *Anal Biochem.* **63**:414-417.
- Wang, M.Y., Shimabukuro, M., Lee, Y., Trinh, K.Y., Chen, J.L., Newgard, C.B. & Unger, R.H. (1999) Adenovirus-mediated overexpression of uncoupling protein-2 in pancreatic islets of Zucker diabetic rats increases oxidative activity and improves beta-cell function. *Diabetes.* **48**:1020-1025.
- Weigle, D.S., Selfridge, L. E., Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Cummings, D. E., Havel, P. J., Kuijper, J. L. & Beltran del Rio, H. (1998) Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle. A potential explanation for the effects of fasting. *Diabetes.* **47**:298-302.
- Wieckowski, M. R. & Wojtczak, L. (1997) Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**:414-417.
- Winkler, E. & Klingenberg, M. (1992) Photoaffinity labeling of the nucleotide-binding site of the uncoupling protein from hamster brown adipose tissue. *Eur J Biochem.* **203**:295-304.



- Winkler, E. & Klingenberg, M. (1994) Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem.* **269**:2508-2515.
- Winkler, E., Wachter, E. & Klingenberg, M.. (1997) Identification of the pH sensor for nucleotide binding in the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochemistry.* **36**:148-155.
- Wojtczak, L. (1976) Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **8**:293-311.
- Wojtczak, L. & Schönfeld P. (1993) Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1183**:41-57.
- Wojtczak, L., Wieckowski, M.R. & Schönfeld, P.(1998) Protonophoric activity of fatty acid analogs and derivatives in the inner mitochondrial membrane: a further argument for the fatty acid cycling model. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**:76-84.
- Yamada, M., Hashida, T., Shibusawa, N., Iwasaki, T., Murakami, M., Monden, T., Satoh, T. & Mori, M. (1998) Genomic organization and promoter function of the mouse uncoupling protein 2 (UCP2) gene. *FEBS Lett.* **432**:65-69.
- Yanisch, Perron, C., Vieira, J. & Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**:103-119.
- Yu, X.X., Barger, J.L., Boyer, B.B., Brand, M.D., Pan, G. & Adams, S.H. (2000a) Impact of endotoxin on UCP homolog mRNA abundance, thermoregulation, and mitochondrial proton leak kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **279**:E433-E446.
- Yu, X.X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H. & Pan, G. (2000b) Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J.* **14**:1611-1618
- Záckova, M., Krämer, R. & Jezek, P. (2000) Uncoupling by fatty acid cycling via mitochondrial phosphate carrier. *Eur. J. Med. Res.* **5** (suppl. 1) P54.
- Zhang, C.Y., Hagen, T., Mootha, V.K., Sliker, L.J & LoweII, B.B.(1999) Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system. *FEBS Lett.* **449**: 129-134.
- Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B. & Lowell, B.B. (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell.* **105**:745-755.