



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Estudio de la topología de las subunidades

ASA1 a 9 de la ATP sintasa mitocondrial

del alga incolora *Polytomella* sp.

T E S I S

que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A

IBQ. EDITH ARACELI CANO ESTRADA



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Diego González Halphen

Mexico D.F

Noviembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi mamá

Por ser el apoyo más grande que tengo

AGRADECIMIENTOS

Desde el momento que decidí realizar estudios de maestría en el Instituto de Fisiología Celular conté con el apoyo de personas que confiaron en mí, me apoyaron y alentaron para cumplir con mis objetivos. Después, durante el tiempo de realización de este trabajo conocí a personas que se convirtieron en buenos amigos con los cuales compartí muchos momentos haciendo el trabajo más ameno.

Agradezco profundamente al Dr. Diego González por creer en mí, por apoyarme y ayudarme. Agradezco su tiempo y su dedicación al proyecto, así como por ser un guía extraordinario de quien he aprendido mucho.

También quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial, a la Dr. Georgina Garza y el Dr. Heliodoro Celis por su interés mostrado en el proyecto, por su crítica y sus consejos.

A QFP Míriam Vázquez Acevedo por enseñarme las técnicas empleadas y por sus consejos durante la realización de este trabajo. Le agradezco también su amistad y esas risas interminables.

Agradezco especialmente a Víctor Absalón por apoyarme en la decisión de realizar una maestría, por acompañarme en los momentos difíciles. Gracias por su motivación y apoyo, así como por su paciencia.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, Ade, Alain, Alexa, Hector, Lore, Paco y Valentín por la convivencia diaria en la cual compartíamos anécdotas, bromas y uno que otro problema. Alexa gracias por tu ayuda en algunas purificaciones de la ATPasa, así como con los geles. También agradezco a Luis Oreza su buena amistad, sus consejos y sus conversaciones tan amenas a la hora de la comida.

Al Señor Alfredo por su ayuda cuando tuve problemas con el autoclave o centrífuga. También agradezco su eterna disposición de ayudar.

Finalmente quiero agradecer a mi familia que es el apoyo más grande que tengo y son los que me motivan para seguir adelante.

Agradezco en primer lugar a mi mamá que junto conmigo se embarcó en esta nueva aventura y nunca me dejó ni me dejará sola pese a cualquier circunstancia.

A mis hermanos, Beto y Quique, por que se que cada noche van a estar ahí, acompañándome. Quique gracias por todo tu apoyo durante este tiempo.

A Delia por ser una gran hermana, por compartir muy buenos momentos juntas.

A mi pa y abue en donde quiera que estén..... los quiero mucho.

CONTENIDO

Resumen	1
Abreviaturas	2
Introducción	3
1. Las Mitocondrias	4
2. La Cadena respiratoria	4
3. El Complejo V o ATP sintasa	6
4. La Fosforilación oxidativa	7
5. Las Algas clorofíceas (algas verdes)	8
6. Estructura de la ATP sintasa en las algas clorofíceas	9
7. Agentes entrecruzadores	12
Hipótesis	14
Objetivos	14
Resultados	15
1. Identificación de las subunidades que componen a la ATPasa de <i>Polytomella sp.</i>	16
2. Entrecruzamientos	19
2.1 Entrecruzadores homobifuncionales	20
2.2 Entrecruzadores heterobifuncionales	28
2.3 Los entrecruzamientos son productos intracomplejo	38
2.4 Entrecruzamientos con el monómero de la ATP sintasa	41
2.5 Modelo propuesto de acuerdo con los productos de entrecruzamiento	43
Discusión	45
Conclusión	50

Metodología	52
1. Cultivo de <i>Polytomella</i> sp.	53
2. Obtención de las mitocondrias	54
3. Purificación de la ATP sintasa	54
4. Experimentos con agentes entrecruzadores	57
4.1 Características de los agentes entrecruzadores homobifuncionales	58
4.2 Características de los agentes entrecruzadores heterobifuncionales	60
5. Tinción con plata	62
6. NB-PAGE para corroborar que los entrecruzamientos son intracomplejo	62
7. Obtención de entrecruzamientos con el monómero de la ATP sintasa	63
Bibliografía	64
Apéndice: Artículo publicado	68
The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex	

ABREVIATURAS.

ATP	Adenosín trifosfato (Trifosfato de adenosina)
ADP	Adenosín difosfato (Difosfato de adenosina)
ASA	Siglas en inglés de proteína asociada a la ATP sintasa
NADH	Nicotínamida adenín dinucleótido (reducido)
FADH	Flavín adenín dinucleótido (reducido)
DSP	Ditiol-bis(succimidilpropionato)
DTSSP	3,3'-Ditiol-bis (sulfosuccinimidilpropionato)
SPDP	N-Succinimidil 3-(2-piridilditiol)propionato
Sulfo-LC-SPDP	Sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridil-ditiol]propionamido)hexanoate
NHS-ESTER	Ésteres de N -Hidroxisuccinimida
-SH	Grupo sulfhidrilo
SDS-PAGE	Siglas en inglés electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sodio
NB-PAGE	Siglas en inglés de electroforesis en geles de poliacrilamida-azul nativo
1D	Primera dimensión
2D	Segunda dimensión
EST	Siglas en inglés de etiqueta de una secuencia expresada
DEAE	Dietil-aminoetil dextrán
LM	n-dodecil- β -D-maltósido
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido

RESUMEN.

Estudios recientes revelan que el complejo F₁F_o-ATP sintasa del linaje de las algas clorofíceas posee subunidades que no presentan ninguna homología con otras subunidades conocidas en la estructura de la ATP sintasa de otras especies; sin embargo, se conservan las subunidades catalíticas del complejo: α , β , así como los componentes del rotor γ , δ , ϵ y c. También se conservan las subunidades a y OSCP. A las nueve subunidades desconocidas se les nombró ASA1 a ASA9.

Las subunidades encontradas en las algas clorofíceas sustituyen a las subunidades que dentro de la estructura de la ATP sintasa mitocondrial de los mamíferos o levaduras forman parte del estator de esta enzima, es decir aquellas subunidades que forman el tallo periférico y unen a los dominio F₁ y F_o de la enzima, así como aquellas que participan en la dimerización del complejo (subunidades A₆L, F₆, b, d e, f, y g); Las nuevas subunidades ASA1-9 parecen conferir a la enzima una gran estabilidad, puesto que la ATP sintasa de estas algas se comporta como un dímero de aproximadamente 1 600 KDa en geles azules nativos; mientras que en otras ATP sintasas de eucariotes se comporta como un monómero de aproximadamente 800 KDa.

Los estudios de reacción con agentes entrecruzadores realizados con la ATP sintasa pura de *Polytomella sp.* nos permitieron obtener una mayor información sobre las subunidades vecinas dentro del complejo enzimático. En el presente trabajo se utilizaron agentes homobifuncionales como DSP y DTSSP, y agentes heterobifuncionales, SPDP y Sulfo-LC-SPDP. Los estudios realizados con DSP arrojaron información sobre subunidades que posiblemente se encuentran cercanas o embebidas en la membrana gracias a su carácter hidrofóbico. Con ayuda de los agentes heterobifuncionales se pudieron obtener productos de entrecruzamiento entre subunidades que cuentan con residuos de cisteína en su estructura primaria.

Con la información obtenida se construyó un modelo de la posible estructura de la ATP sintasa mitocondrial del alga *Polytomella sp.* Consideramos que muy probablemente esta misma estructura está presente en las ATP sintasas mitocondriales de todos los integrantes del linaje de algas clorofíceas.

INTRODUCCIÓN

1. LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias son organelos presentes en la gran mayoría de las células eucariontes, encargados de proporcionar a la célula la mayor parte de su energía. Las mitocondrias presentan un genoma propio y cuentan con todas las enzimas para llevar a cabo la síntesis de algunas proteínas.

Se piensa que en los comienzos de la evolución de la célula eucarionte se llevó a cabo una simbiosis entre una arquea y una proteobacteria (Margulis, 1970), (Müller y Martín, 1999). Las mitocondrias tienen su origen a partir de esta proteobacteria endosimbionte.

La mitocondria cuenta con una membrana externa y una interna; por lo tanto, se divide en dos compartimentos; el espacio intermembranal que se encuentra entre las dos membranas, y la matriz mitocondrial. (Figura 1).

Dentro de la membrana interna, la cual forma las crestas mitocondriales, se encuentran embebidos los complejos enzimáticos encargados de realizar el transporte de electrones de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP.

En la matriz mitocondrial se encuentran enzimas encargadas de llevar a cabo las reacciones del ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos, entre otras rutas metabólicas. También se encuentran moléculas de ADN y los ribosomas.

2. LA CADENA RESPIRATORIA.

La oxidación de los sustratos se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial mediante cuatro complejos enzimáticos que se encuentran embebidos en ésta. Estos complejos enzimáticos cuentan con grupos prostéticos, tales como el grupo hemo o las flavinas, capaces de llevar a cabo reacciones de óxido reducción. De esta manera se transfieren electrones entre los diferentes complejos a partir de sustratos reductores tales como el NADH y el succinato o FADH. Estas moléculas provienen de diferentes rutas metabólicas principalmente del ciclo de Krebs.

La transferencia de electrones se lleva a cabo de la siguiente manera:

El complejo I, o NADH deshidrogenasa cataliza la transferencia de un par de electrones del NADH a la poza de quinonas; éste complejo es el más grande; en el

mamífero tiene entre 38 y 43 subunidades, mientras que en las bacterias sólo cuenta con 14 subunidades.

El complejo II, o succinato deshidrogenasa, cataliza la transferencia de electrones del succinato a la poza de quinonas; esta enzima cuenta con 4 subunidades de las cuales 2 son hidrofílicas y dos son membranales.

El complejo III o citocromo bc_1 , cataliza la transferencia de electrones desde la poza de quinonas al citocromo c mediante un mecanismo de transporte de electrones conocido como el ciclo Q. La enzima mitocondrial cuenta con 11 subunidades.

Finalmente, el complejo IV o citocromo c oxidasa, cataliza la transferencia de electrones del citocromo c al aceptor final el oxígeno y tiene 13 subunidades en los mamíferos.

A excepción del complejo II, los demás complejos bombean protones durante la transferencia de electrones, los cuales forman un gradiente electroquímico que se aprovecha para la síntesis de ATP por la ATP sintasa o complejo V.

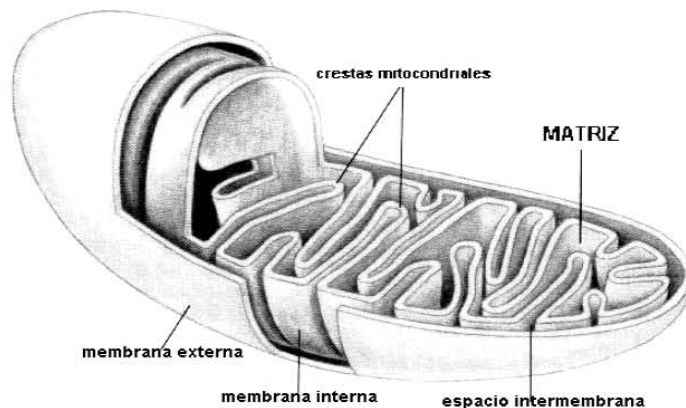


Figura 1. Estructura de las invaginaciones de la mitocondria; se puede observar la membrana externa así como las crestas formadas por la membrana interna

Intermembrane space (P side)

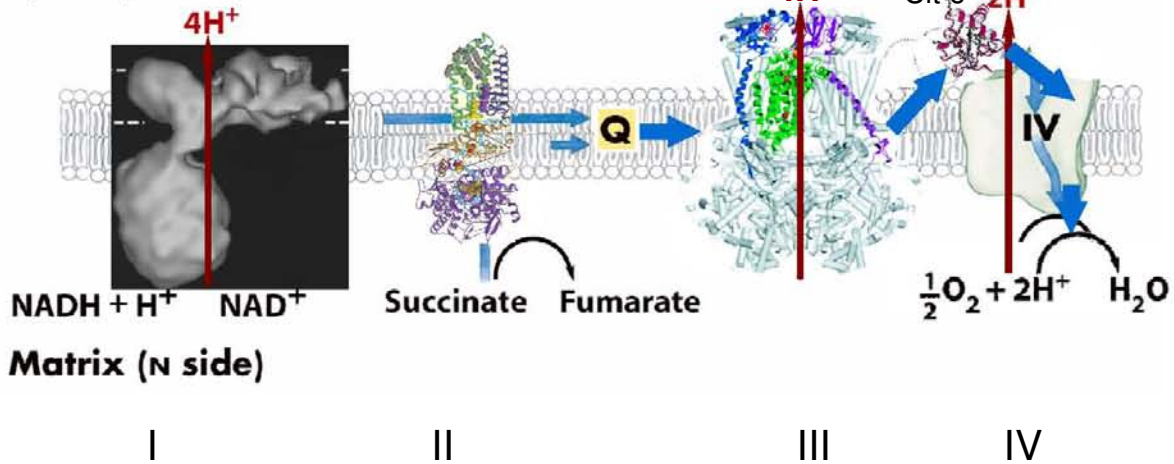


Figura 2.- Cadena respiratoria. Cuatro complejos transportan electrones de las moléculas reductoras hasta el oxígeno, formando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial.

3. EL COMPLEJO V O ATP SINTETASA.

El complejo V o ATP sintasa es una enzima capaz de sintetizar o hidrolizar ATP. Se encuentra insertada en la membrana interna mitocondrial.

La enzima se divide en dos dominios denominados Fo y F1. F1 es la parte catalítica de la enzima y se encuentra orientada hacia la matriz mitocondrial mientras que el dominio Fo atraviesa la membrana interna mitocondrial y forma el conducto de protones del complejo (Itoh et al., 2004).

La enzima ATP sintasa es un complejo oligomérico muy complejo; sin embargo, la estructura más sencilla que se conoce es la de las bacterias como *Escherichia coli*, donde el dominio F1 está formado por cinco cadenas polipeptídicas denominadas α , β , γ , δ y ϵ ; mientras que el dominio Fo está formado por la subunidad a y por varias copias de la subunidad c. Finalmente, existe una subunidad b que forma un brazo periférico que estabiliza la estructura de la enzima (Weber y Señor, 2003) (Figura 3).

La ATP sintasa también puede considerarse como un motor molecular donde las subunidades rotatorias son γ , δ , ϵ y c, mientras las estáticas son α , β , a y b.

Esta estructura es esencial para que la enzima trabaje correctamente, aunque se sabe que la estructura puede variar en cuanto al número de subunidades que la componen, según la especie de que se trate. En el bovino, la ATP sintasa está compuesta por 17 subunidades, mientras que en levadura son 23 (Devenish *et al.*, 2000). Las subunidades adicionales en estas especies pueden dar mayor estabilidad a la enzima, formando parte del estator, o bien participando en la formación de dímeros o en la regulación de la actividad de la enzima.

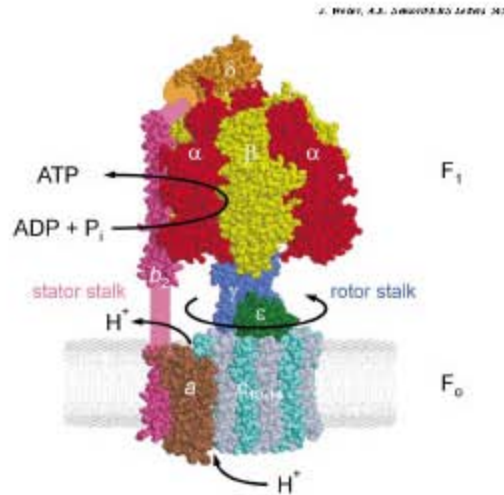


Figura 3. La estructura más simple de la ATP sintasa.

4. LA FOSFORILACION OXIDATIVA.

La síntesis del ATP está acoplada a un gradiente de protones producido por las enzimas de la cadena respiratoria durante el transporte de electrones. La ATP sintasa lleva a cabo la síntesis de ATP aprovechando el gradiente electroquímico. Los protones entran por un canal formado entre la subunidad a y la subunidad c, atravesando la membrana interna. El gradiente de protones hace girar al anillo de subunidades c, que a su vez hace girar a la subunidad γ en movimientos marcados cada 120°, provocando cambios conformacionales en la subunidad catalítica β (Yosuda *et al.*, 1998).

Existen 3 cambios conformacionales de la subunidad β , abierta, semiabierta y cerrada. Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP, y a su vez se capta un molécula de ADP y grupo fosfato (Menz *et al.*, 2001). Con estos substratos, la subunidad β cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la reacción de formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades β de la ATP sintasa, que son estructuralmente equivalentes, pero en cada momento, funcionalmente diferentes.

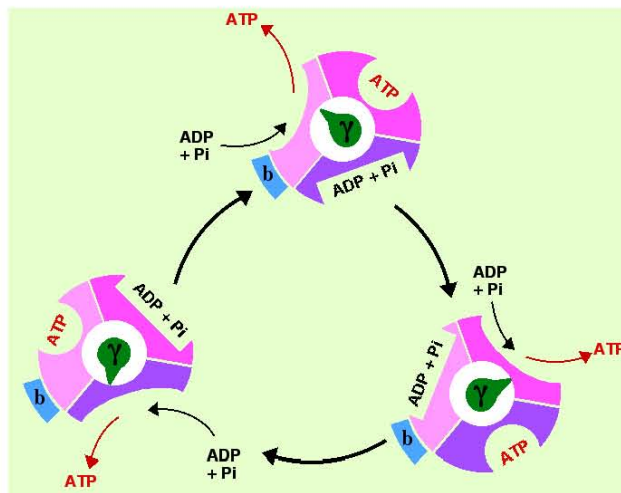


Figura 4. Mecanismo catalítico de la ATP sintasa

5. LAS ALGAS CLOROFICEAS (ALGAS VERDES)

Las algas verdes se asemejan a las plantas superiores en que tienen clorofila y almidón como material de reserva. La mayoría son unicelulares o coloniales y constituyen una parte de los hábitats de agua dulce.

Chlamydomonas reinhardtii es un alga cloroficea biflagelada. Cuenta con pared celular, cloroplastos y mitocondrias. Se conoce la secuencia completa de su genoma mitocondrial, el cual es lineal y muy compacto, de solamente 15.8 Kb

(Michaelis *et al.*, 1990); también se dispone de la secuencia completa de su genoma nuclear (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre/Chlre3.home.html>), y de la de su genoma cloroplastídico.

Polytomella sp. es otra alga cloroficea unicelular, incolora. Tiene forma ovoide bastante regular, constituida por una masa de protoplasma de color amarillo pálido, y carece de pared celular; presenta cuatro flagelos encargados de su movilidad. (Aragaos, 1910).

Polytomella mide aproximadamente 11 micras de largo y 8 micras de ancho, mientras que los flagelos miden cerca de 22 micras.

Esta alga tiene tendencia al enquistamiento en su etapa de reposo o condiciones ambientales desfavorables. El inicio del enquistamiento se caracteriza por el aumento progresivo de microgránulos en el protoplasma.

Tanto el alga *C. reinhardtii* como *Polytomella sp.* pertenecen al linaje de las clorofitas. El linaje clorofita se divide en 4 clases, cloroficeas, prasinoficeas, trebouxifíceas y ulvofíceas. Ambas algas se encuentran en la clase cloroficeas. *Polytomella sp.* evolucionó a partir de un alga ancestral fotosintética y que en algún momento de la evolución perdió los cloroplastos. La pérdida de cloroplastos y de pared celular facilita la obtención de mitocondrias de esta alga y la purificación de los complejos de la fosforilación oxidativa.

6. ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA EN LAS ALGAS CLOROFÍCEAS.

Estudios hechos sobre la estructura de la ATPasa de algas clorofíceas demuestran que existen ciertas diferencias importantes entre ésta y de otros eucariontes como el bovino y la levadura.

Las subunidades α y β de la ATPasa de *Chlamydomonas reinhardtii* presentan extensiones en su secuencia de aminoácidos (Franzén y Falk, 1992). En el caso de las subunidades α la extensión se encuentra en el extremo amino terminal y es de 20 aminoácidos, mientras que la de la subunidad β se encuentra en el extremo C-terminal y es de 45 aminoácidos. Estas extensiones también están presentes en el alga *Polytomella sp.*, mostrando la cercana relación entre estas dos algas (Atteia *et al.*, 1997).

La ATPasa de *Chlamydomonas reinhardtii* fue aislada y caracterizada, encontrándose 14 subunidades de masa molecular de 7 hasta 60 KDa (Funes *et al.*, 2002). Por medio de la secuenciación del extremo N-terminal de cada subunidad se identificaron ocho de éstas como α , β , γ , δ , ϵ , a, c y OSCP. Sin embargo otras siete no presentaron ninguna similitud con otras subunidades conocidas, y fueron nombradas ASA1, ASA2, ASA3, ASA4, ASA 5, ASA6, ASA7. ASA por **A**TP **S**ynthase **A**ssociated protein.

Además se encontró que la migración de la ATP sintasa de algas clorofíceas en un gel azul nativo es la de un dímero altamente estable con una masa molecular aparente de 1600 KDa. (Van Lis, 2003), mientras que la migración en un gel azul nativo de esta enzima de otras especies es de aproximadamente de 800 KDa. Este mismo comportamiento se observó con la enzima de *Polytomella sp.*, es decir la ATP sintasa de *Polytomella sp.* también se encuentra en forma de dímero, lo cual sugiere que en su estructura están presentes las nuevas subunidades ASAs. Existe evidencia de que de las cuatro clases de algas en que se divide el linaje de las algas clorofitas, solo la clase de algas clorofíceas presentan esta ATPasa atípica, (Vazquez-Acevedo 2006) pues ni las algas pertenecientes a la clase prasinofíceas, trebouxifíceas o ulvofíceas presentan una ATP sintasa dimerica.

Una vez purificada la enzima de *Polytomella sp.* se aislaron y caracterizaron a cada una de las subunidades que la componen, identificando a dos subunidades más, ASA8 y ASA9.

Con la secuenciación del genoma completo de *C. reinhardtii* se corroboró la ausencia de genes que codifican para las proteínas b, d, e, f, g, A6L, IF1, las cuales están presente en la estructura de la ATP sintasa de otros organismos eucariotes. También se comprobó que las subunidades ASA8 y ASA9 forman parte de la estructura de la ATP sintasa de esta alga.

Subunidad	<i>Bos taurus</i>	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis Thaliana</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Polytomella sp.</i>
α	x	x	x	x	x
β	x	x	x	x	x
γ	x	x	x	x	x
δ	x	x	x	x	x
ϵ	x	x	x	x	x
OSCP	x	x	x	x	x
A6L	x	x	x	-	-
F6	x	x	-	-	-
IF1	x	x	x	-	-
FAd	-	-	x	-	-
a	x	x	x	x	x
b	x	x	x	-	-
c	x	x	x	x	x
d	x	x	x	-	-
e	x	x	x	-	-
f	x	x	x	-	-
g	x	x	x	-	-
ASA 1	-	-	-	x	x
ASA 2	-	-	-	x	x
ASA 3	-	-	-	x	x
ASA 4	-	-	-	x	x
ASA 5	-	-	-	x	x
ASA 6	-	-	-	x	x
ASA 7	-	-	-	x	x
ASA 8	-	-	-	x	x
ASA 9	-	-	-	x	x

Tabla 1. Composición polipeptídica de las ATP sintasas de diferentes especies. Los recuadros sombreados representan a las subunidades altamente conservadas de la ATP sintasa.

En la tabla 1 se pueden observar todas las subunidades encontradas en las diferentes estructuras de ATP sintasa, y se identifican las presentes en diferentes especies. Se observa que sólo *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp.* presentan las subunidades ASA 1 a ASA 9, pero carece de otras subunidades presentes en especies como *Bos taurus* y *Saccharomyces cerevisiae*, como las proteínas b, d e, f, g entre otras.

Los recuadros sombreados representan a las subunidades altamente conservadas, invariablemente presentes.

De los 17 polipéptidos que componen la ATP sintasa de *C. reinhardtii*, las subunidades a, c, ASA8 y ASA9 presentan cruces transmembranales, mientras que las subunidades OSCP, ASA5 y ASA6 sólo presentan regiones hidrofóbicas.

Todos los polipéptidos restantes son completamente hidrofílicos. Además, sólo las subunidades ASA1 y ASA4 parecen contener hélices entrelazadas (estructura coiled coil). (Tabla 2)

Subunidad	Masa Molecular	Hidrofobicidad	% coiled coils
ASA1	60.6	-----	4
β (ATP2)	59.1	-----	0
α (ATP1)	56.8	-----	0
ASA2	45.5	-----	0
ASA3	36.3	-----	0
ASA4	31.3	-----	7
γ	30.8	-----	0
a (ATP6)	24.6	5 cruces transmembranales	0
OSCP	22.6	Ligera hidrofobicidad en el extremo N-terminal	0
ASA7	19.5	-----	0
δ	18.6	-----	0
ASA5	14.3	Ligera hidrofobicidad en el extremo N-terminal	0
ASA6	13.3	2 segmentos hidrofóbicos	0
ASA8	10	1 cruce transmembranal	0
ϵ	8.3	-----	0
ASA9	8.0	1 cruce transmembranal	0
c (ATP9)	7.3	2 cruces transmembranales	0

Tabla 2. Principales características de las diferentes subunidades. Las masas moleculares y el punto isoeléctrico se calcularon de la secuencia de la proteína madura de *C. reinhardtii*. Los datos de ASA9 fueron obtenidos de Van Lis et al. (2007).

7. AGENTES ENTRECruzADORES.

La estructura de los complejos proteicos puede estudiarse mediante experimentos de entrecruzamiento, y obtener una aproximación de su topología. La cercanía de las proteínas en complejos proteicos puede ser detectada por agentes entrecruzadores, dependiendo de la disponibilidad de grupos funcionales de cada subunidad del complejo. Se han estudiado complejos mitocondriales utilizando esta técnica; por ejemplo, a la ATPasa de bovino (Joshi y Burrows, 1990), a la ATPasa de levadura (Velours y Arselin, 2000) y al complejo bc_1 (González-Halphen et al., 1988).

Los agentes entrecruzadores son capaces de unir covalentemente proteínas cercanas, gracias a que cuentan con dos grupos reactivos unidos por una cadena hidrocarbonada de tamaño variable; esta cadena puede tener un puente disulfuro que le permite reducirse. y por tanto romperse, lo que a su vez permite analizar a las proteínas entrecruzadas en geles de poliacrilamida en 2a. dimensión. Existen otros agentes que no cuentan con este enlace disulfuro, por lo que los productos del entrecruzamiento son irreversibles, y deben analizarse por inmunorrélicas tipo western.

Existe una gran variedad de agentes entrecruzadores, con diferentes características, tales como los grupos reactivos que pueden unirse a grupos funcionales de las proteínas como aminos, carboxilos o sulfhidrilos. Otra característica importante es la longitud del brazo, pues de él depende la cercanía de las proteínas entrecruzadas. También puede variar la solubilidad.

Existen agentes entrecruzadores homobifuncionales, que presentan el mismo grupo reactivo en ambos extremos del brazo, y agentes heterobifuncionales con grupos reactivos diferentes en cada extremo del brazo.

En la tabla 3 se resumen los grupos reactivos más comunes que pueden tener los entrecruzadores y sobre que grupo funcional de las proteínas pueden reaccionar.

Grupo reactivo	Reacciona con:	Grupo reactivo	Reacciona con:
Aril Azida	No específico	Maleimida	Sulfhidrilo
Carbodiimida	Amino/Carboxilo	NHS-ester	Amino
Hidrazida	Carbohidrato	PFP-ester	Amino
Hidroximetil Fosfina	Amino	Piridil disulfuro	Sulfhidrilo
Imidoester	Amino	Vinil disulfuro	Sulfhidrilo, amino, hidroxilo
Isocianato	Hidroxil	Carbonil	Hidracina
Carbonil	Hidrazina		

Tabla 3. Grupos reactivos que pueden contener los agentes entrecruzadores y los grupos funcionales blanco.

HIPOTESIS

Las nuevas subunidades encontradas en la estructura de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* son componentes genuinos del complejo y forman parte del estator de la enzima. Algunas de estas nuevas subunidades deben participar en la dimerización de la enzima. Las interacciones de las subunidades ASA deben ser importantes en la formación de un homodímero altamente estable. Por lo tanto la configuración de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* y de sus parientes cercanos (otras algas clorofíceas) tiene una conformación diferente a la encontrada en la enzima de otros organismos eucariotes.

OBJETIVO.

Construir un modelo topológico de las diferentes subunidades del complejo ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*, con base en los productos de entrecruzamiento obtenidos después del tratamiento con agentes entrecruzadores.

CONCLUSIÓN

Las subunidades ASA1 a 9 encontradas en la arquitectura de la ATP sintasa de las algas clorofíceas *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* intervienen en la formación de un dímero altamente estable. Estas subunidades sólo están presentes en el linaje de las algas clorofíceas, sustituyendo a otras subunidades presentes en la ATPasa de otros organismos eucariotes, tales como b, d, e, f, g, A6L, IF1, las cuales forman parte del estator de la enzima.

La topología de las nuevas subunidades en la ATP sintasa de algas clorofíceas está dado de la siguiente manera; las subunidades ASA4, ASA2 y ASA7 se encuentran cercanas, y forman parte del estator de la enzima. Se propone que estas subunidades en la parte superior de la enzima junto con la subunidad OSCP. La subunidad ASA4 se encontró en forma dimérica. Las subunidades ASA5, ASA6, ASA8 y ASA9 presentan cruces transmembranales, lo que las localizará embebidas en la membrana. La subunidad ASA6 es la responsable de la dimerización del complejo. Finalmente las subunidades ASA1 y ASA3 son proteínas globulares que se localizarían periféricas a la membrana.

METODOLOGIA

1. CULTIVO DE *POLYTOMELLA SP.*

Se cultivó el alga *Polytomella sp.* en 2 litros de medio MAP (pH 7) utilizando matraces de fondo ancho de 2.5 litros de capacidad, al medio se le adicionaron 200 µl de vitaminas. Las células se incubaron durante 48 horas a 25°C sin agitación en condiciones aeróbicas.

Medio MAP (2L)

Beijerincks 100X	10.0 ml
Elementos traza	2.0 ml
Fosfato de K 1M	2.0 ml
Mes	15.6 g
Acetato	8.0 g

Vitaminas

Tiamina B1	2 mg
Cianocobalamina	0.1 mg

Pesar todo y adicionar agua a 10 ml. Filtrarla

Solución de Beijerincks

NH ₄ Cl ₂	8.0 g/L
CaCl ₂ .H ₂ O	1.0 g/L
MgSO ₄	1.3 g/L

Elementos Traza

Cu ₂ SO ₄	0.25 g/L
H ₃ BO ₃	0.02 g /L
FeCl ₂ .6H ₂ O	0.1 g/L
MnSO ₄	0.2 g/L
NaMo.2H ₂ O	0.1 g/L
ZnSO ₄	0.2 g/L

2.-OBTENCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS.

Se extrajeron las células de *Polytomella sp* retirando el medio por centrifugación a 2000 x g durante 5 min en el rotor F10-6x500y; se lavaron con amortiguador de sacarosa, y se centrifugaron a 2000 x g por 5 min utilizando el rotor F14-6x250y. El paquete obtenido se resuspendió nuevamente en amortiguador de sacarosa y se rompieron las células mecánicamente con un homogenizador de vidrio con vástago de teflón, pasando la solución 5 ó 6 veces. El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 2000 x g, recuperando el sobrenadante, puesto que es ahí donde se encuentran las mitocondrias. Este sobrenadante se centrifugó a 17,000 x g en rotor SS34 durante 10 minutos. Finalmente se resuspendieron las mitocondrias obtenidas en una pequeña cantidad de amortiguador; se congelaron y se almacenaron para recolectar una cantidad suficiente para la purificación de la ATP sintasa.

Amortiguador de sacarosa.

0.3M sacarosa	126.65 g/L
4mM KEDTA	4 mM/L
20mM Tris	20 mM/L

Ajustar el pH a 7.4

3.- PURIFICACIÓN DE LA ATP SINTASA

Se determinó la concentración de proteína de las mitocondrias por el método de Lowry. Posteriormente se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml con amortiguador de solubilización y n-dodecil- β -D-maltósido (LM) a una concentración final de 2 g de LM/g de proteína, para solubilizar las membranas de las mitocondrias y liberar a los complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna. El solubilizado se dejó en agitación por 30 min, posteriormente se centrifugó a 90 000 x g por 20 minutos con el rotor 60Ti. Se recuperó el sobrenadante donde encuentran los complejos solubilizados, que se dializaron durante 1 o 2 horas en amortiguador de diálisis.

El dializado se cargó a una columna de intercambio aniónico DEAE Biogel A con un volumen de cama de aproximadamente 80 ml, previamente equilibrada a pH 8.0. Una vez cargada la muestra se lavó con 3 o 4 volúmenes del mismo amortiguador utilizado para equilibrar la columna.

La ATP sintasa se eluyó con un gradiente de 0 a 125 mM de cloruro de sodio. Se colectaron las fracciones y se leyó la absorbencia de éstos a 280 nm para detectar los picos correspondientes a las proteínas; al mismo tiempo se corrió un gel desnaturante de poliacrilamida con las diferentes fracciones recolectadas, principalmente con los tubos pertenecientes a el pico obtenido. Los otros complejos enzimáticos se eluyeron a 200 y 400 mM de cloruro de sodio.

Posteriormente se dializaron las fracciones donde se encuentra la ATP sintasa, con el fin de intercambiar el amortiguador empleado en la purificación (Tris), por otro que no tenga grupos aminos, en este caso se empleó el amortiguador Hepes, ya que es importante que los experimentos de entrecruzamientos se lleven a cabo en un amortiguador libre de grupos aminos, para evitar apagamientos de reacción con los grupos aminos de las proteínas.

Se concentró el dializado con ayuda del un ultrafiltro Amicon, utilizando una membrana YM100; después se cargó la muestra a un gradiente de glicerol de 40 a 15% para eliminar algunos contaminantes según su densidad; se ultracentrifugó la mezcla de las diferentes concentraciones de glicerol durante 17 horas a 40 000 x g, en rotor SW-28. Se utilizó amortiguador de Lutter (Minauro-Sanmiguel, 2005) para la preparación del gradiente. Se colectaron las fracciones del gradiente y se detectó a la ATP sintasa por medio de un gel desnaturante de poliacrilamida. Finalmente los tubos que contienen a la enzima se concentraron y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Amortiguador de solubilización

50 mM de Tris-HCl	1.513 g/250ml
1 mM de MgSO ₄	0.061 g/250ml
1mM PMSF.	200 µL de solución stoke 1M/250
50 µg/ml TLCK.	1.25 mL de solución stoke 10mgml ⁻¹ /250ml
100 mM de NaCl	1.46 g/250 ml
Ajustar el pH a 8.0	

Amortiguador de diálisis

50 mM Tris	12.11 g/2L
1 mM MgSO ₄	0.492 g/2L
Ajustar el pH a 8.0	

Amortiguador de equilibrio de la columna de DEAE biogel A

50 mM Tris	3.027 g/500ml
1 mM MgSO ₄	0.123 g/500ml
0.1 mg/ml de lauril maltósido	0.05 g/500 ml
50 µg/ ml de TLCK	2.5 ml de solución stoke 10mgml ⁻¹ /500 ml
1 mM PMSF	400 µL de solución stoke 1M /500 ml
Ajustar el pH a 8.0	

Amortiguador de Diálisis para eliminar grupos aminos.

50 mM Hepes	23.83 g/2L
1 mM MgSO ₄	0.492 g/2L
Ajustar el pH a 8.0	

Amortiguador de elusión

50 mM Tris	1.513 g/250ml
1 mM MgSO ₄	0.061 g/250ml
0.1 mg/ml de lauril maltósido	0.025 g/250 ml
50 µg/ ml de TLCK	1.25 ml de solución stoke 10mgml ⁻¹ /250 ml
1 mM PMSF	200 µL de solución stoke 1M /250 ml
125 mM NaCl	1.826 g/250ml
Ajustar el pH a 8.0	

Amortiguador de Lutter

Hepes 20 mM	2.38 g/500 ml
EDTA-Na 1 mM	0.186 g/500 ml
Succinato 10 mM	0.590 g/500 ml
NaCl 35 mM	1.02 g/500 ml
ATP 2 mM	0.55g/500 ml
LM	0.1mg/ml
Ajustar el pH a 7.5	

4.- EXPERIMENTOS CON AGENTES ENTRECruzANTES.

Para realizar los experimentos con agentes entrecruzantes se fijó una concentración de proteína de 1.2 µg/µl en un volumen final de 100 µl para todos los casos, aunque puede variar entre 1 y 5 µg/µl.

Para el entrecruzador se partió de una solución 10 mM, para los reactivos DSP y SPDP se disolvieron en DMSO mientras que DTSSP y Sulfa-LC-SPDP fue en agua. La concentración final de los agente entrecruzadores está entre 0.1 y 5.0 mM. La concentración final para el caso de DSP fue de 0.2 mM, para DTSSP fue de 0.75 mM, para SPDP fue de 1mM y para Sulfo-LC-SPDP fue de 2 o 4 mM.

A la proteína se le agregó la cantidad necesaria de entrecruzador para tener la concentración final deseada y se dejó reaccionar. El tiempo de reacción fue de 30 minutos para DSP y 1 hora para DTSSP. Para los agentes heterobifuncionales el tiempo de reacción se fijó en 8 horas. Todas las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C. Posteriormente la reacción se detuvo adicionando

solución de Tris 1 M pH 8.0 por 15 min, de esta manera se hace reaccionar el exceso de agente entrecruzador.

La solución de proteína entrecruzada se cargó en un gel Tricina-SDS-PAGE al 8%. El gel se corrió en condiciones no reductoras para no reducir el puente disulfuro presente en la estructura del agente entrecruzador. Se corrió el gel a 75 Volts.

Una vez obtenida la primera dimensión de la proteína; es decir, el bandeo de las diferentes subunidades que componen a la ATP sintasa, incluyendo a las subunidades entrecruzadas, se cortó el carril y se digirió con solución de DTT pH 8.0 para romper los puentes disulfuro y separar los productos del entrecruzamiento. Finalmente se realizó una segunda dimensión en un gel SDS-PAGE al 14% siguiendo la técnica de Von Jagow. Este gel se tiñó con solución de nitrato de plata para el análisis de las subunidades que sufrieron entrecruzamiento.

Solución de DTT

0.1 M Tris.	0.6 g/50 ml
0.1 M Tricina	0 .89 g/50 ml
0.1% SDS	0.05 g/50 ml
50mM DTT	0.350g/50 ml

4.1. Características de los Agentes entrecruzadores homobifuncionales.

DSP y DTSSP fueron los reactivos homobifuncionales empleados, ambos agentes son homólogos, cuya única diferencia es su solubilidad. Sus características se resumen en las tablas 1 y 2 respectivamente.

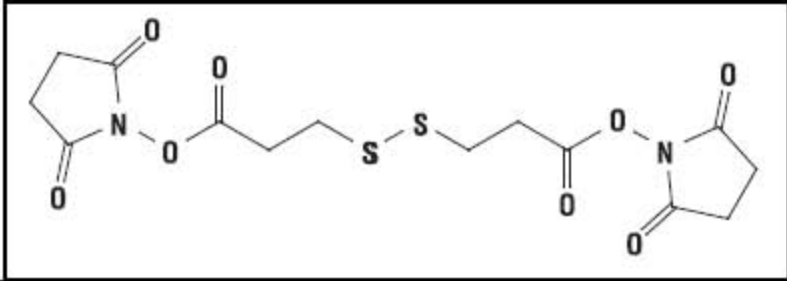
DSP	
	
Peso Molecular	404.42
Longitud de brazo	12 Å
Grupos reactivos	Ésteres de NHS
Reaccionan con:	Aminas primarias
Solubilidad	DMSO
Escindible por	Grupo tiol

Tabla 1. Propiedades del agente homobifuncional DSP.

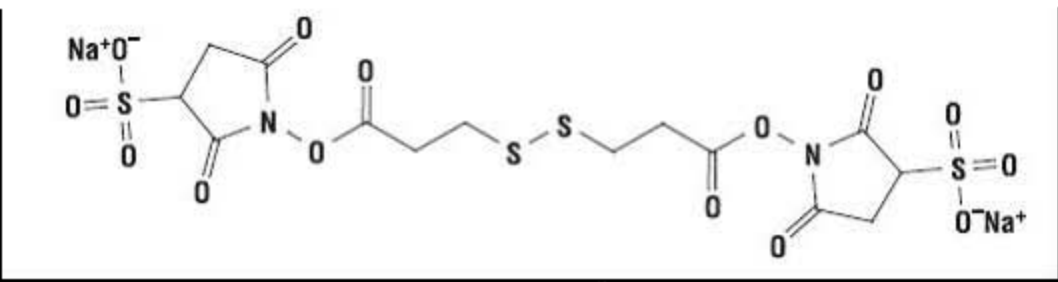
DTSSP	
	
Peso Molecular	608.51
Longitud de brazo	12 Å
Grupos reactivos	Ésteres de NHS
Reaccionan con:	Aminas primarias
Solubilidad	Agua
Escindible por	Tiol

Tabla 2. Principales características del agente entrecruzador homobifuncional DTSSP

El grupo NHS esters (N-Hidroxisuccinimida-éster) reacciona con los grupos aminos primarios presente en las proteínas tanto en el amino terminal de cada proteína como en el ϵ -amino presente en el aminoácidos lisina. Esta reacción

forma un enlace amida covalente, liberando el grupo N-hidroxisuccinimida (figura 1)

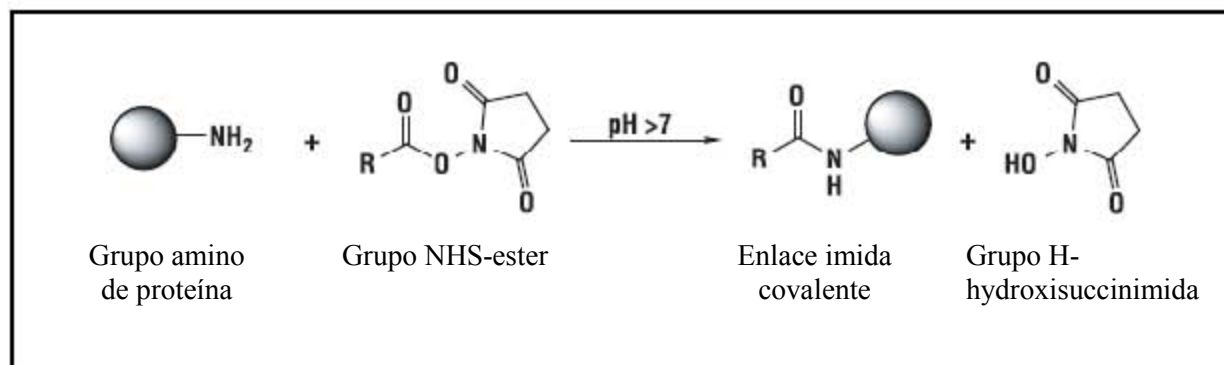


Figura 1. Reacción que se lleva a cabo entre el grupo reactivo NHS éster y aminas primarias.

4.2. Agentes entrecruzadores heterobifuncionales.

Los agentes entrecruzadores heterobifuncionales utilizados fueron el SPDP y el Sulfo-LC-SPDP, ambos reaccionan con grupos aminos primarios por medio del grupo reactivo NHS-éster en un extremo del reactivo y con grupos sulfhidrilos por medio del grupo sulfidril-disulfuro en el otro extremo del grupo. Las características de cada agente se muestran en las tablas 3 y 4.

SPDP	
Peso Molecular	312.37
Longitud de brazo	6.8 Å
Grupos reactivos	Ésteres de NHS y 2-piridil-ditiol
Reaccionan con:	Aminas primarias y sulfhidrilos.
Solubilidad	DSMO
Escindible por	Grupo tiol

Tabla 3. Principales características de agente entrecruzador heterobifuncional SPDP.

Sulfo- LC-SPDP	
Peso Molecular	608.51
Longitud de brazo	15.6 Å
Grupos reactivos	Ésteres de NHS y 2- piridil-ditiol
Reaccionan con:	Aminas primarias y sulfhidrilos.
Solubilidad	Agua
Escindible por	Grupo tiol

Tabla 4. Principales características de agente entrecruzador heterobifuncional Sulfo-LC-SPDP

El grupo piridil ditiol reacciona con grupos sulfhidrilo en una amplia gama de pH (pH óptimo de 4-5) para formar puentes disulfuros. Durante la reacción, ocurre un cambio de disulfuro entre el grupo-SH de la molécula y el grupo 2-piridil-ditiol. Por consiguiente, se libera piridina-2-tiona es liberado y su concentración puede ser determinada midiendo la absorbancia en 343 nm (figura 2). La reacción puede llevarse a cabo a pH fisiológico, aunque la reacción sea muy lenta.

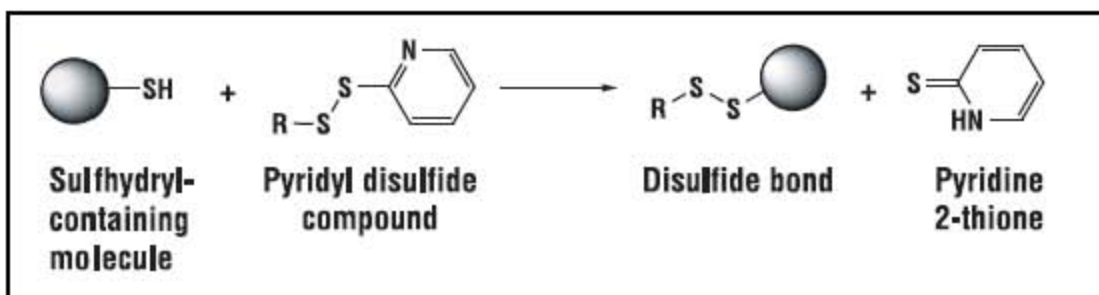


Figura 2. Reacción que se lleva a cabo entre el grupo reactivo piridilditiol y los grupos sulfhidrilos.

5. TINCIÓN CON PLATA.

Se fijó el gel con 50% de metanol y 10% de ácido acético durante 30 min. Se pasó el gel a una solución con 5% metanol y 7% de ácido acético y se incubó por 2 o 3 horas. Posteriormente se pone el gel en una solución de glutaraldehído al 10% durante 30 minutos y se lavó el gel con agua toda una noche en agitación. Se colocó el gel en la solución C durante 20 minutos en agitación. Se lavó con agua dos veces durante 5 minutos y se adicionó la solución D para revelar el gel. La reacción de revelado se detuvo con una solución de ácido acético al 50%, una vez detectadas las bandas.

Solución A: Disolver 0.8 g de nitrato de plata en 4 ml de agua.

Solución B: Mezclar 21 ml de hidróxido de sodio al 0.36% con 1.4 ml de hidróxido de amonio.

Solución C: Adicionar la solución A gota a gota a la solución B en agitación y aforar a 100 ml

Solución D: Mezclar 5 ml de ácido cítrico 1% y 0.25 ml de formaldehído al 36% y aforar a 500 ml

6. NB-PAGE PARA CORROBORAR QUE LOS ENTRECRUZAMINETOS SON INTRACOMPLEJO.

Se preparó el gel de poliacrilamida de gradiente de 10 al 5%.

Se llevó a cabo la reacción de entrecruzamiento con el agente DSP utilizando diferentes concentraciones crecientes, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 mM, siguiendo la técnica ya descrita. Una vez terminada la reacción se le adicionó solución de azul de Coomassie Serva G y se cargó el gel. El gel corrió a 25 miliampers a 4°C. Se realizó un cambio de amortiguador de cátodo 1 con 0.02% de azul de Coomassie a una amortiguador de cátodo 2 con 0.002% de colorante. Una vez obtenido el gel se tiñó con azul de Coomassie y posteriormente con nitrato de plata para corroborar el resultado.

Amortiguador de cátodo1

Tricina 50mM	8.96g/L
Bis-Tris 15mM	3.14g/L
Azul de Coomassie Serva G 0.02%	200mg/L

Amortiguador de cátodo2

Tricina 50mM	8.96g/L
Bis-Tris 15mM	3.14g/L
Azul de Coomassie Serva G 0.002%	20g/L

Amortiguador de Ánodo

Bis-Tris 50mM pH 7.0	10.46g/L
----------------------	----------

Solución Azul de coomassie Serva G

Azul de Coomassie Serva G 5%	50mg/ml
------------------------------	---------

Disolver en 1ml de amortiguador de muestra

Amortiguador de muestra

Ácido amino-caproico 750 mM	4.92g/50ml
Bis/Tris pH 7.0	0.52g/50ml

7. OBTENCIÓN DE ENTRECruzAMIENTOS CON EL MONÓMERO DE LA ATP SINTASA

El volumen final de la muestra se fijó en 80µl y la concentración final de proteína fue de 1.2 µg/µl. La concentración final para el ácido taurodeoxicolato fue de 3% partiendo de una solución de 10%. La muestra se dejó reacción por 30 minutos. Después de este tiempo se agregó el agente entrecruzador. Para DSP la concentración final fue de 0.25 y para el Sulfo-LC-SPDP fue de 4mM en un volumen final de 100µl. Las condiciones de la reacción, así como el procedimiento para la realización de los geles tanto de primera como de segunda dimensión ya se describieron para cada caso.

RESULTADOS

1.- IDENTIFICACION DE LAS SUBUNIDADES QUE COMPONEN A LA ATPasa DE *Polytomella sp.*

La purificación del complejo F₁F₀ ATP sintasa de *Polytomella sp.*, nos llevó a separar las subunidades que la componen por SDS-PAGE e identificar a cada una por secuenciación del extremo amino terminal. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1; se encontró que esta enzima tiene una composición muy semejante a la obtenida para la ATP sintasa del alga fotosintética *Chlamydomonas reinhardtii* (Funes et al., 2002), salvo dos subunidades más que se identificaron, y a las cuales se le nombró ASA8 y ASA9. El homólogo de ASA8 se detectó en el genoma de *C. reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre/Chlre3.home.html>). La misma composición de subunidades se obtiene al aislar el complejo enzimático utilizando otra técnica de purificación, que es con geles azules nativos (BN-PAGE) (Van Lis et al., 2003). Es decir, la enzima obtenida por dos métodos de purificación diferentes tiene la misma composición polipeptídica. En la primera purificación realizada, a la subunidad ASA3 se le encontró parcialmente proteolizada, a juzgar por su secuencia N-terminal. En otras posteriores, en presencia de una mezcla adecuada de inhibidores de proteasas, siempre se obtuvo la subunidad intacta.

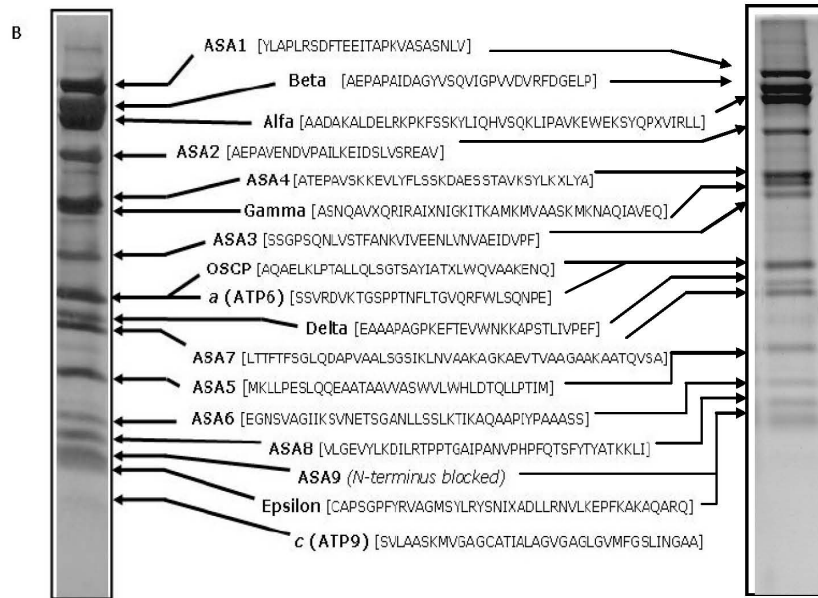


Figura 1. Patrón electroforético de los polipéptidos que constituyen a la F_1F_0 ATPasa mitocondrial del alga *Polytomella sp.* separados por SDS-PAGE. Se muestra la secuencia del extremo amino terminal de cada subunidad. A la derecha se muestra una preparación con la subunidad ASA3 proteolizada y a la izquierda se muestra otra preparación con la subunidad intacta

Por otra parte, se encontró que en geles de tricina-SDS-PAGE, algunas subunidades comigraban (por ejemplo a y OSCP). Con el fin de obtener separadas a todas las subunidades, se utilizaron combinaciones de geles desnaturalizantes. Primero se corrió la muestra en un gel de glicina-SDS-PAGE (geles de Laemli) al 10% y después se corrió un gel de segunda dimensión en un sistema tricina-SDS-PAGE (geles de Von Jagow) al 14%. De esta manera se logró separar todas las subunidades del complejo, identificando por secuenciación del extremo amino terminal a las subunidades ASA 4, γ , un producto de la degradación de la subunidad γ' , ASA 3, y otro de la subunidad β , denominada β' (figura 2).

La combinación de ambos sistemas de geles es indispensable para lograr la separación completa de todas las subunidades, ya que siguiendo solo la técnica de Laemli logran separarse las subunidades ASA4 y γ , así como de OSCP y a; sin embargo, las subunidades ASA5, ASA6, ASA7, ASA8, ASA9/ ϵ y c migran a la misma distancia, y sólo se separan utilizando la técnica de Von Jagow.

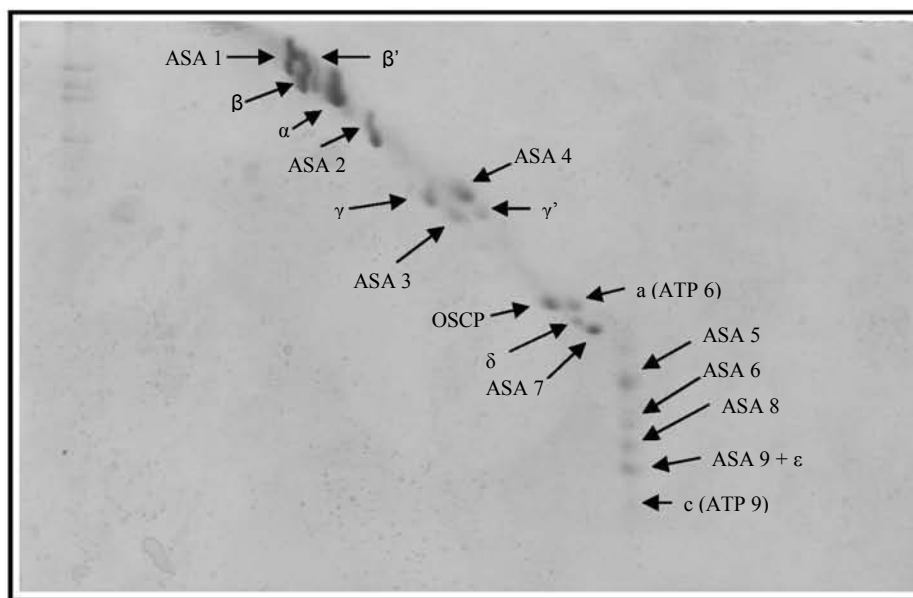


Figura 2. Patrón electroforético bidimensional de las subunidades de la F_1F_0 ATPasa en un gel de Glicina-SDS- PAGE (geles de Laemli) al 10%. La segunda dimensión se realizó en un gel tricina-SDS-PAGE (geles de Von Jagow) al 14%.

La disponibilidad del genoma de *C. reinhardtii*, permitió conocer las secuencias de cada una de las subunidades que componen al complejo V o ATP sintasa. Actualmente el grupo del Dr. Lee en el departamento de bioquímica de la Universidad de Montreal trabaja en la obtención de secuencias marcadas y expresadas (EST, del inglés expressed sequence tags) del alga *Polytomella parva*; esto nos ha permitido construir algunas secuencias de las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* Hasta el momento se tiene información de la secuencia primaria completa de la mayoría de los polipéptidos (tabla 1). De las subunidades ASA3, ASA4 a y ϵ , se tienen fragmentos de la secuencia y de la subunidad ASA2 se tiene únicamente el extremo amino terminal.

Las secuencias obtenidas para los 17 polipéptidos que componen la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, se compararon con la secuencia de las subunidades de *C. reinhardtii*, para obtener el porcentaje de identidad (Tabla 1). Las subunidades ASA 7 y ASA 6 son las de menor porcentaje de identidad, aunque ambas están por arriba del 50%.

Subunidad	% identidad con <i>C. reinhardtii</i>
ASA1	81%
β (ATP2)	92%
α (ATP1)	87%
ASA2	----
ASA3	----
ASA4	----
γ	67%
a (ATP6)	----
OSCP	66%
ASA7	57%
δ	65%
ASA5	65%
ASA6	56%
ASA8	78%
ASA9	----
ϵ	----
c (ATP9)	81%

Tabla 1. Diferentes subunidades que componen a la ATPasa de *Polytomella sp.* y el porcentaje de identidad respecto a las subunidades del alga *C. reinhardtii*. Las subunidades que no presentan porcentaje de identidad son las que aún no se han secuenciado.

2. ENTRECruzAMIENTOS.

Para lograr una aproximación de la topología de las diferentes subunidades que componen a la ATP sintasa se utilizaron diferentes tipos de entrecruzadores, tanto homofuncionales como heterobifuncionales, con diferente longitud de brazo y diferentes propiedades químicas.

Entre los homofuncionales se encuentran los que reaccionan con grupos aminos primarios, grupos sulfhidrilos o grupos carboxilos. En este trabajo se utilizaron los agentes DSP y DTSSP; ambos reaccionan con grupos aminos primarios. Para los agentes heterobifuncionales se eligieron los que reaccionan con grupos aminos primarios y grupos sulfhidrilos. Dentro de este grupo se encuentran los agentes SPDP, Sulfo-LC-SPDP y Sulfo-LC-SMPT. Sólo se utilizaron los agentes SPDP y Sulfo-LC-SPDP. (ver metodología)

Todos los entrecruzadores elegidos tienen la propiedad de revertir su unión en presencia de un agente reductor y liberar a las proteínas unidas. Todos los

productos de entrecruzamiento obtenidos se analizaron en geles de segunda dimensión.

Un criterio para analizar los productos de entrecruzamientos es la masa molecular de las subunidades entrecruzadas. La masa molecular del producto de entrecruzamiento debe corresponder a la suma de la masa molecular de cada subunidad involucrada en la unión química. La migración en el gel de los productos de entrecruzamiento también debe corresponder a su masa molecular, aunque hay que señalar que las proteínas hidrofóbicas migran de forma irregular, debido a su capacidad de unir mayor cantidad de SDS y por ello adquirir mayor movilidad electroforética. Por lo tanto, es fácil subestimar la masa molecular de un polipéptido cuando está libre o entrecruzado.

2.1. Entrecruzadores homobifuncionales

Los primeros experimentos con entrecruzadores se realizaron con los agentes DSP y DTSSP; el primero no es soluble en agua, mientras que el segundo si lo es. Ambos contienen como grupo reactivo el NHS-éster, que reacciona con aminas primarias, que pueden ser los aminos terminales o los grupos aminos presentes en residuos de lisina.

En los experimentos de entrecruzamiento con el DTSSP se probaron concentraciones entre 0.5 mM y 2.0 mM, con el mismo resultado en todos los casos, aunque la mejor resolución en los geles bidimensionales se logró con la concentración de 0.75 mM. Las concentraciones muy altas del agente entrecruzador pueden inducir la formación de agregados. La cantidad de proteína se fijó en 100 µg.

En el gel de primera dimensión se pudo observar un entrecruzamientos con una masa molecular alta, que según los resultados en el gel bidimensional corresponderían a $\alpha + \beta$. La primera dimensión también nos revela las subunidades que posiblemente reaccionaron debido a una disminución de la cantidad de proteína en la banda correspondiente. En este caso se aprecia una pequeña disminución en las subunidades α , ASA2, ASA4, OSCP, identificadas en los productos de entrecruzamientos en los geles bidimensionales (figura 3).

Los productos de entrecruzamiento identificados en el gel de segunda dimensión fueron principalmente cuatro: $\alpha + \beta$, ASA2 + ASA4, $\alpha + \text{OSCP}$, ASA2 + ASA7 (Figura 4).

En general la migración electroforética de los productos de entrecruzamiento correlaciona con su masa molecular. Excepto el producto de entrecruzamiento entre α y OSCP, que muestra una masa molecular de 70 KDa en lugar de la esperada de 79.2 KDa. Esto probablemente se debe a que OSCP presenta una región hidrofóbica en su extremo carboxilo terminal que da lugar a una movilidad electroforética anómala.

En la figura 5 se muestran las masas moleculares estimadas de todas las subunidades de la enzima.

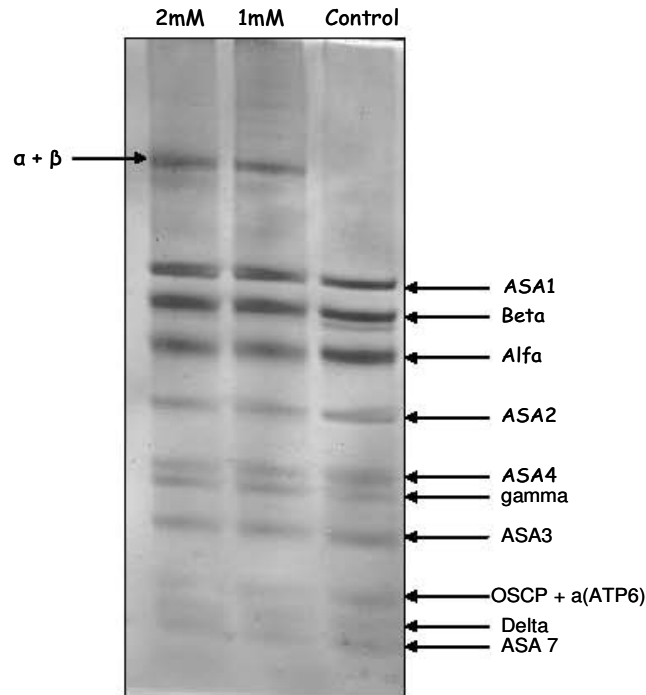


Figura 3. Patrón electroforético de un gel de 1D Tricina SDS-PAGE al 7% realizado después de la reacción con DTSSP a una concentración de 0.5mM y 0.75mM. Se señalan los entrecruzamientos de mayor masa molecular. Tinción con Azul de Coomassie.

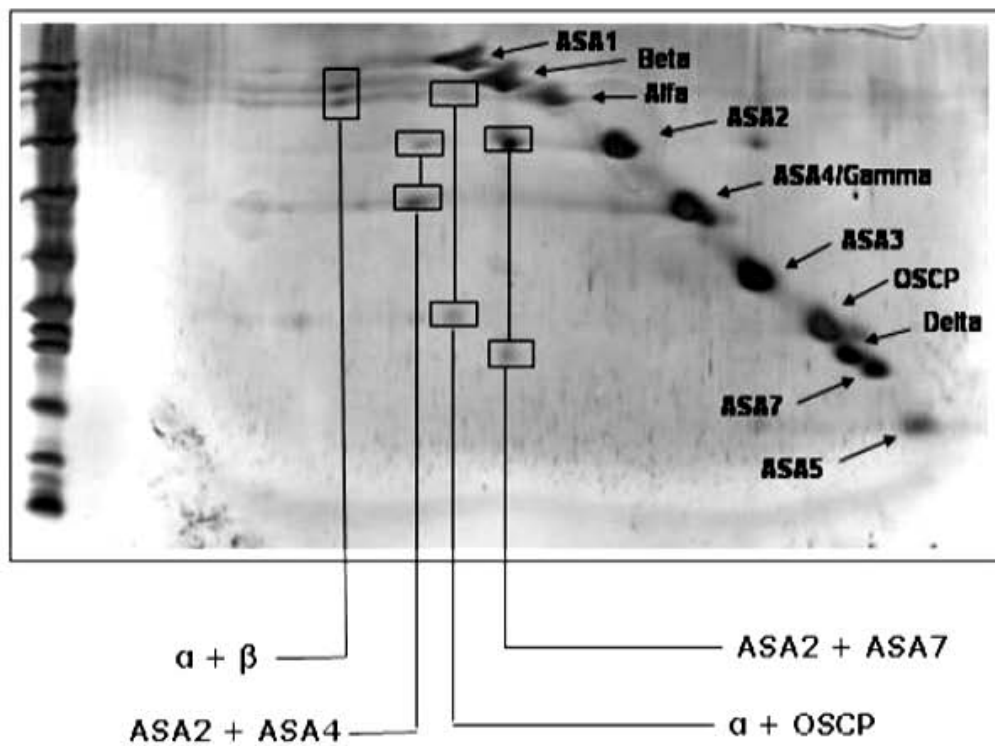


Figura 4. 2D Tricina SDS-PAGE al 12% después del tratamiento con el agente reductor ditioneitol, en el cual se observan la separación de las subunidades que presentaron entrecruzamientos con el agente DTSSP. Tinción con plata.

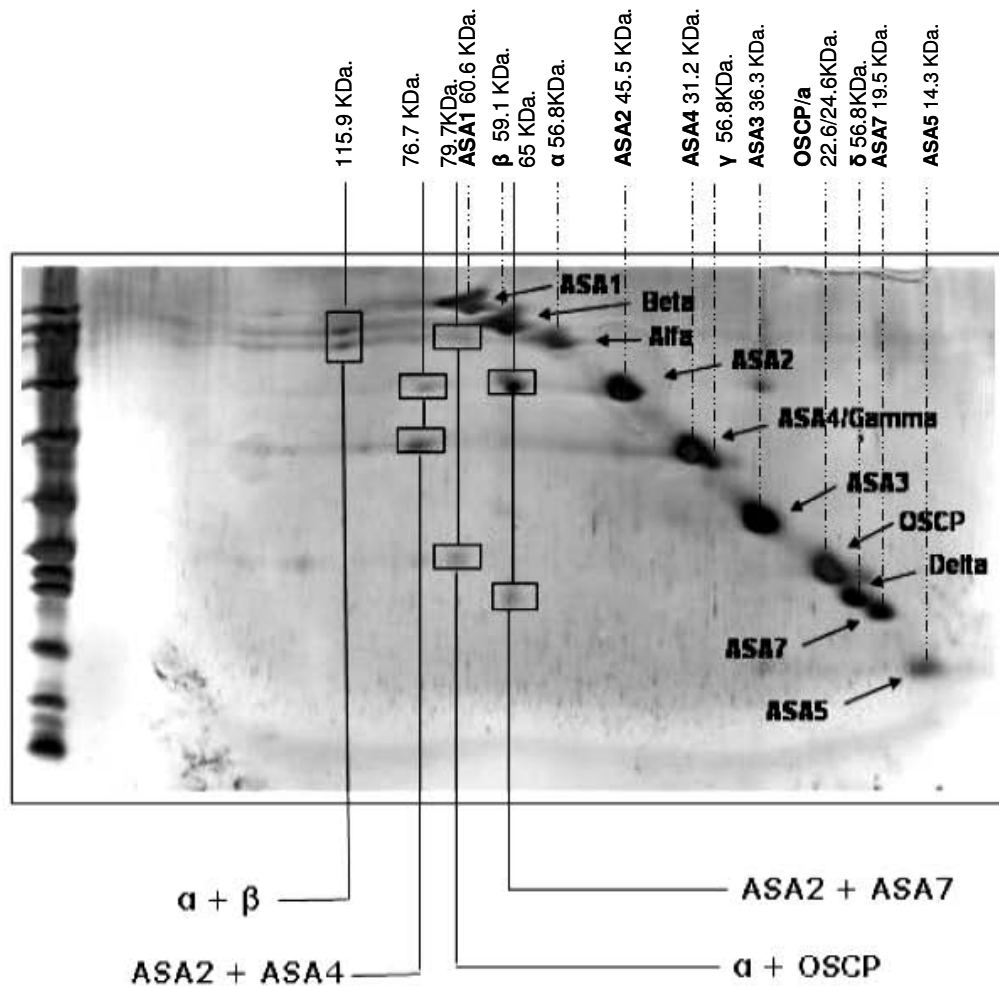


Figura 5. Análisis de las masas moleculares de los diferentes productos de entrecruzamientos obtenidos con DTSSP (líneas punteadas) e identificación de cada subunidades de la ATP sintasa con su respectiva masa molecular

Con los resultados obtenidos con el agente DTSSP y con estudios de disociación con calor de la enzima (Vázquez Acevedo *et al.*, 2006), donde se obtiene un subcomplejo compuesto por las subunidades ASA1, ASA3, ASA5, ASA8, a y c, se construyó un modelo de la estructura de la F₁F₀ ATP sintasa en el linaje de las algas clorofíceas, (figura 6). La morfología general se basa en una imagen de microscopía electrónica (Dudkina *et al.*, 2005). En este modelo se propone una disposición de todas las subunidades de la enzima, donde ASA4, ASA2 y ASA7 estarían formando el tallo periférico de la enzima.

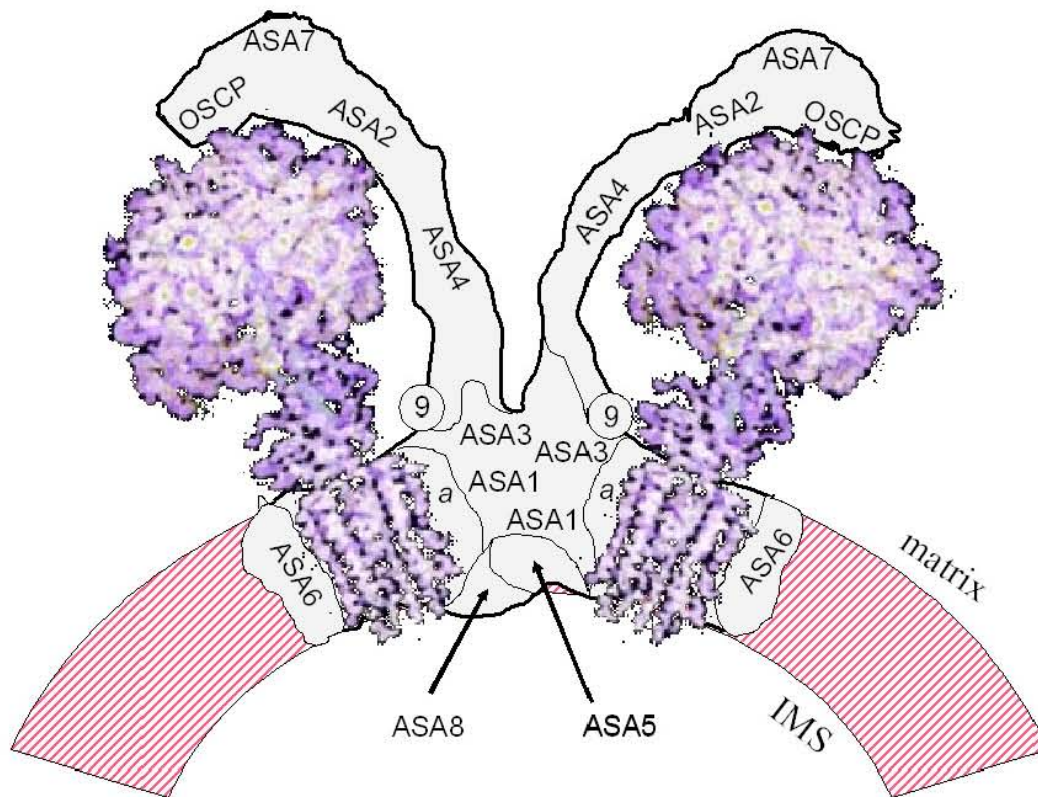


Figura 6. Modelo de la estructura de la de ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*, con base en la estructura de microscopía electrónica de Dudkina *et al.* (2005), donde se observa el brazo compuesto por las subunidades OSCP, ASA7, ASA2, ASA4, de acuerdo con los resultados de entrecruzamiento obtenidos. Las subunidades ASA3, ASA1, ASA8, ASA5 se encuentran en la el dominio Fo de la enzima. Las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , a y c se ilustran de acuerdo al modelo cristalográfico de levadura (Stock *et al.* 1999)

Para obtener más información con los productos de entrecruzamiento generados a través de grupos aminos primarios se utilizó el agente DSP. La reacción se llevó a cabo con 120 μg de proteína, y se experimentaron concentraciones de DSP entre 0.1 y 0.4 mM. Se seleccionó la concentración óptima de 0.2 mM de entrecruzador, donde se observaron el mayor número de productos, ya que los agregados de proteína formados a concentraciones más altas impiden distinguir claramente a los pares de subunidades entrecruzadas.

Como era de esperarse, se reprodujeron los resultados observados con DTSSP, pero también se obtuvieron nuevos productos de entrecruzamiento; estos nuevos productos se deben a que el reactivo DSP es un compuesto no polar capaz de

introducirse en la membrana o reaccionar con subunidades que presentan una mayor hidrofobicidad.

En el gel de primera dimensión se observaron tres productos de entrecruzamiento de masa molecular grande. El gel de segunda dimensión reveló que corresponden a $\alpha+\beta$, ASA2 + ASA4 y ASA1 + ASA7 (figura 8). También se puede observar la disminución significativa en las subunidades ASA1, α , OSCP y β , así como ASA7, ASA6, ASA5. Sin embargo en el gel bidimensional no se apreció ningún resultado donde estuviera involucrada la subunidad ASA5.

Los nuevos productos de entrecruzamientos encontrados se identificaron como ASA1+ ASA7, ASA3 + ASA8, y aparentemente se obtuvo un producto de entrecruzamiento entre la misma subunidad, ASA6 + ASA6 (Figura 7).

De estas subunidades entrecruzadas, ASA8 presenta un cruce transmembranal y ASA6 presenta un segmento hidrofóbico. Probablemente estas subunidades se encuentren embebidas en la membrana y por esta razón no reaccionaron en presencia del agente DTSSP. El carácter hidrofóbico de estas subunidades podría explicar su migración irregular dentro del gel, ya que presentan una masa molecular mayor a la esperada de acuerdo con su distancia recorrida en el gel. Esta diferencia es de 1 KDa para el producto ASA3 + ASA8 y de 4 KDa para el dímero de ASA6. (Figura 9).

Las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 reaccionaron tanto con DTSSP y DSP; por lo tanto, probablemente se encuentran en la parte de la enzima expuesta al medio acuoso. ASA1 podría ubicarse cerca de la región membranal o bien cerca de subunidades hidrofóbicas, ya que en presencia de DTSSP no se entrecruzó mientras que con DSP sí lo hizo.

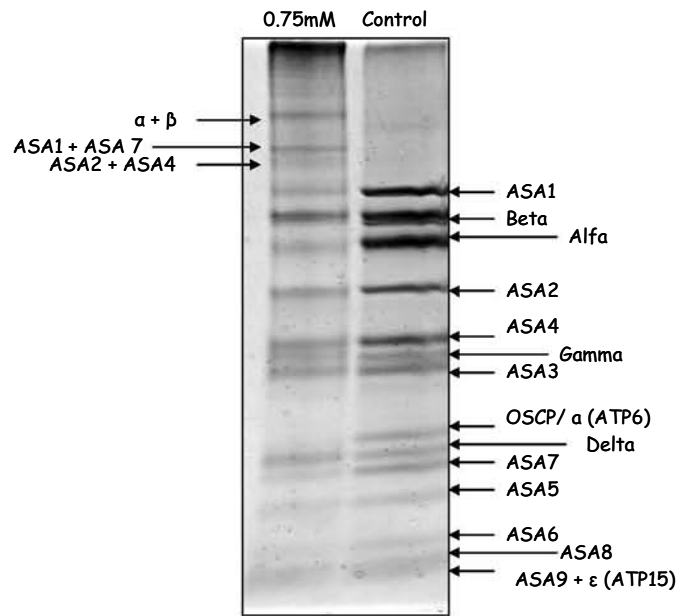


Figura 7. Patrón electroforético de un gel de 1D Tricina SDS-PAGE al 8% realizado después de la reacción con DSP a una concentración de 0.2 mM, se identifican los entrecruzamientos de mayor masa molecular. Tinción con Azul de Coomassie.

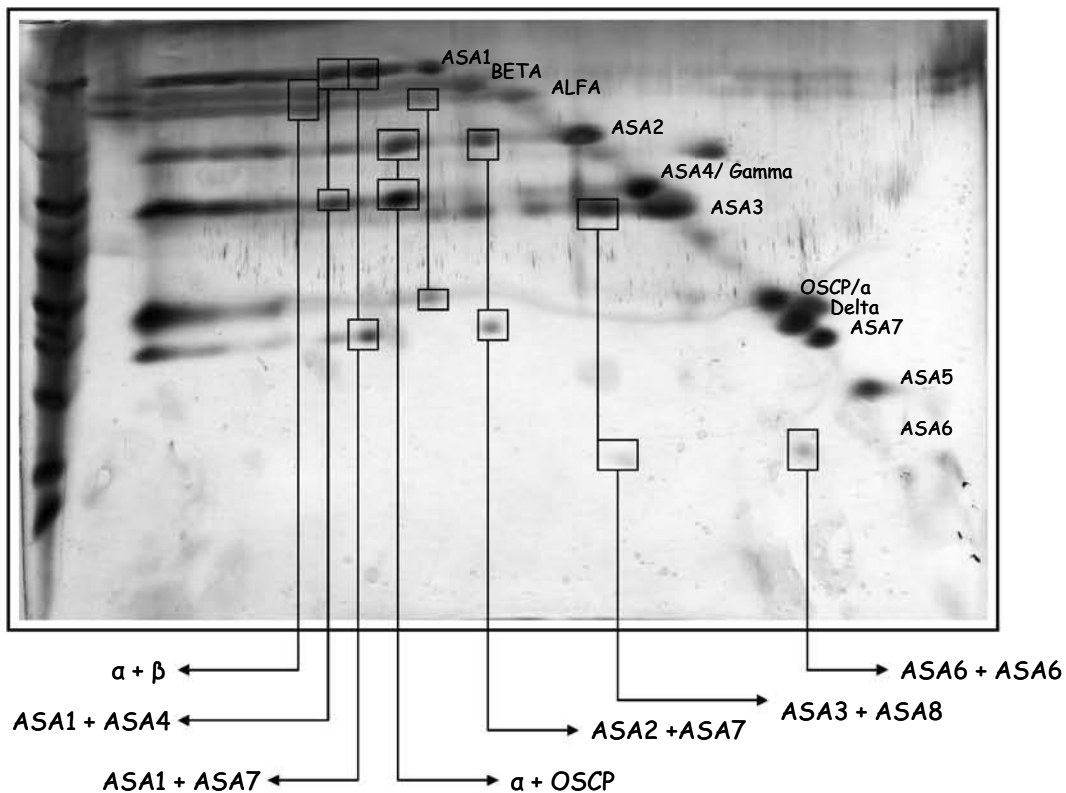


Figura 8. 2D Tricina SDS-PAGE al 12% después del tratamiento con el agente reductor ditioneitol, en el cual se observan la separación de las subunidades que presentaron entrecruzamientos con el agente DSP. Tinción con plata.

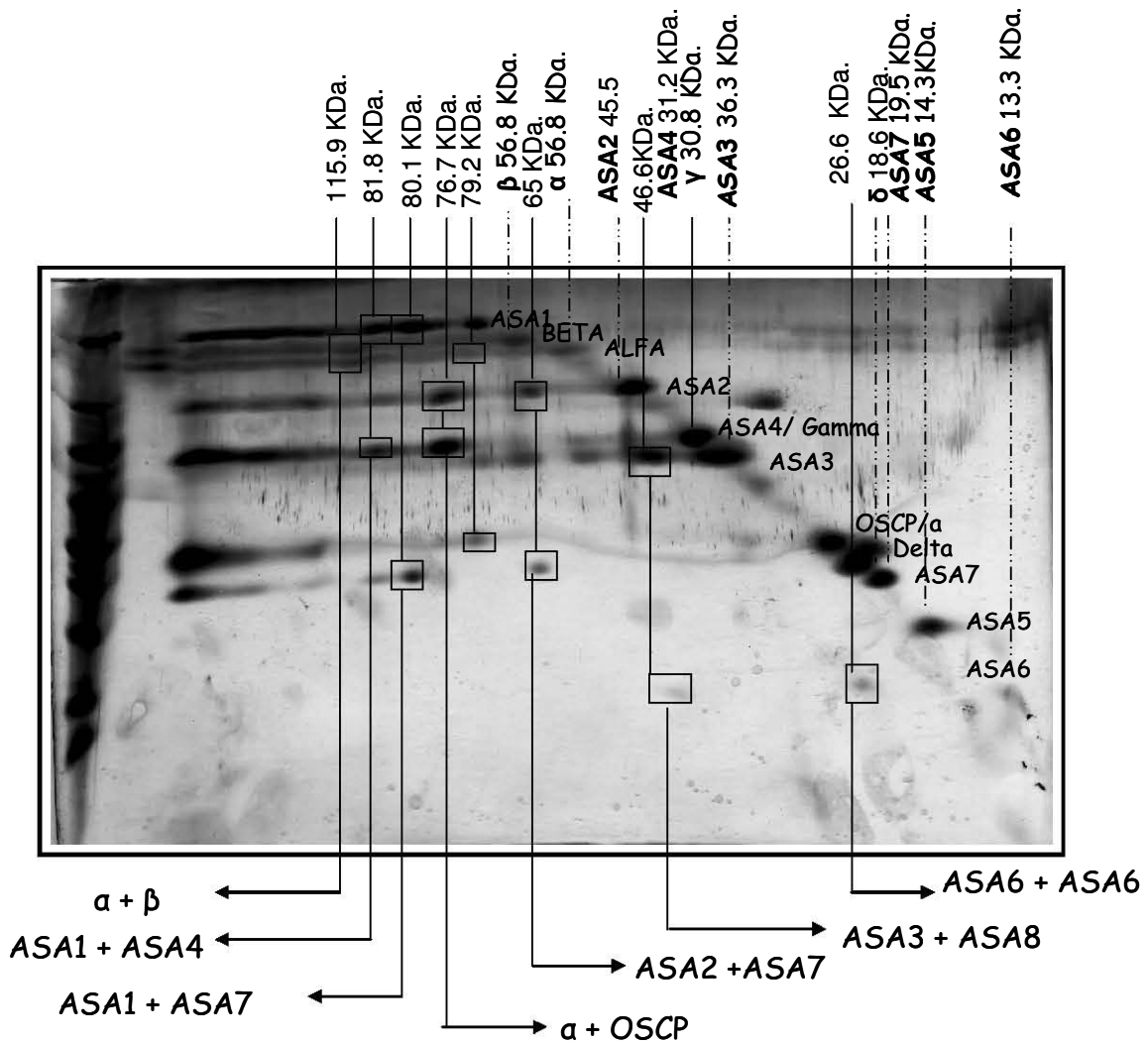


Figura 9. Análisis de las masas moleculares de los diferentes productos de entrecruzamientos obtenidos con DSP (líneas continuas) e identificación de cada subunidades de la ATP sintasa con su respectiva masa molecular (líneas punteadas)

2.2. Entrecruzadores heterobifuncionales.

El objetivo de experimentar con otro tipo de agentes entrecruzadores es la obtención de nueva información sobre la cercanía de las subunidades que componen a la F₁F₀ ATPasa, uniendo diferentes grupos químicos, en este caso grupos aminos primarios con grupos sulfhidrilos. Se utilizaron dos reactivos diferentes SPDP y Sulfo-LC-SPDP, los cuales se diferencian por la longitud de brazo y su solubilidad.

El grupo 2-piridilditiol presente en estos agentes químicos es el responsable de reaccionar con los grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas, desprendiendo el grupo pirimidina 2-tiol, el cual absorbe luz de 343 nm. Esto nos permite seguir la reacción a diferentes tiempos y calcular la concentración de agente que reaccionó siguiendo la ley de Lambert y Beer:

$$A = C\epsilon b$$

Donde:

A es la absorbencia obtenida

b es la longitud del paso de luz de la celda

ϵ es absortividad molar o coeficiente de extinción, donde el valor de 8080 M⁻¹cm⁻¹ corresponde a el grupo pirimidina 2-tiol

Para encontrar el tiempo óptimo de reacción de los agentes entrecruzadores se realizó una curva de la absorbencia del grupo pirimidina 2-tiol a diferentes tiempos, encontrando un tiempo óptimo de 7 a 8 horas en ambos casos.

Los primeros experimentos con los agentes entrecruzadores heterobifuncionales se realizaron con SPDP, de una longitud de brazo de 6.8 Å. La cantidad de proteína se mantuvo fija a 120 µg, como en los casos anteriores, y la concentración de entrecruzador se varió entre 0.5 mM y 2.0 mM, con una concentración óptima de 1.0 mM. La absorbencia del grupo pirimidina 2-tiol

después del tiempo de reacción fue de 0.124 y la concentración de SPDP que reaccionó fue 1.53×10^{-5} M,

Con este nuevo agente entrecruzador se encontró un nuevo producto de entrecruzamiento entre las subunidades $\gamma + \delta$; su peso molecular concuerda con su migración en el gel. Nuevamente, se obtuvieron los productos entre las subunidades $\alpha + \beta$, ASA2 + ASA 4 y $\alpha +$ OSCP. En el gel de primera dimensión se observa la banda del entrecruzamientos entre las subunidades $\alpha + \beta$ (figura 10), por tratarse del entrecruzamientos de mayor masa molecular. También en esta figura se observa un cambio en la movilidad de la subunidad α , que puede deberse a entrecruzamientos dentro de la misma subunidad. Además se aprecia una disminución en las intensidades de las bandas en las proteínas ASA4, γ , OSCP y δ , lo cual concuerda con las subunidades involucradas en los productos de entrecruzamiento identificados en el gel bidimensional (Figura 11).

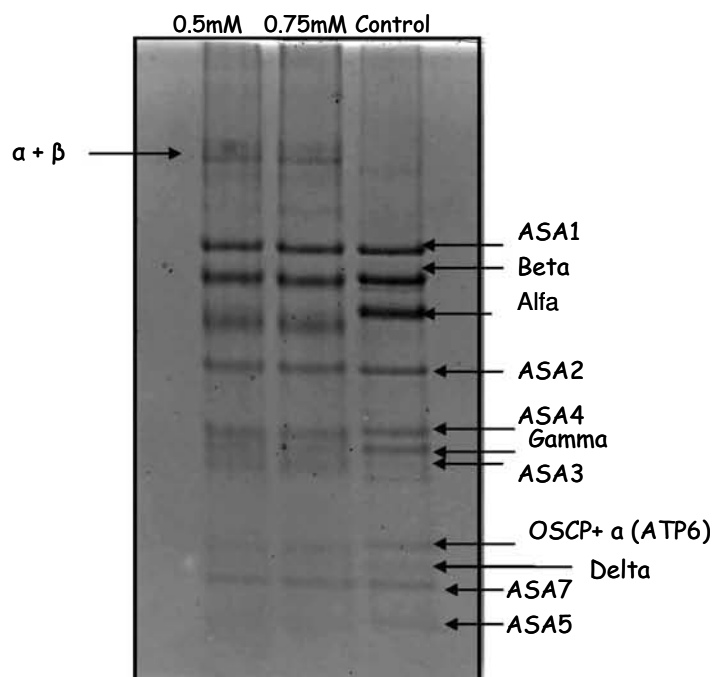


Figura 10. Patrón electroforético de un gel de 1D Tricina SDS-PAGE al 8% realizado después de la reacción con SPDP a una concentración de 0.5mM y 0.75mM, se identifican los entrecruzamientos de mayor masa molecular. Tinción con Azul de Coomassie.

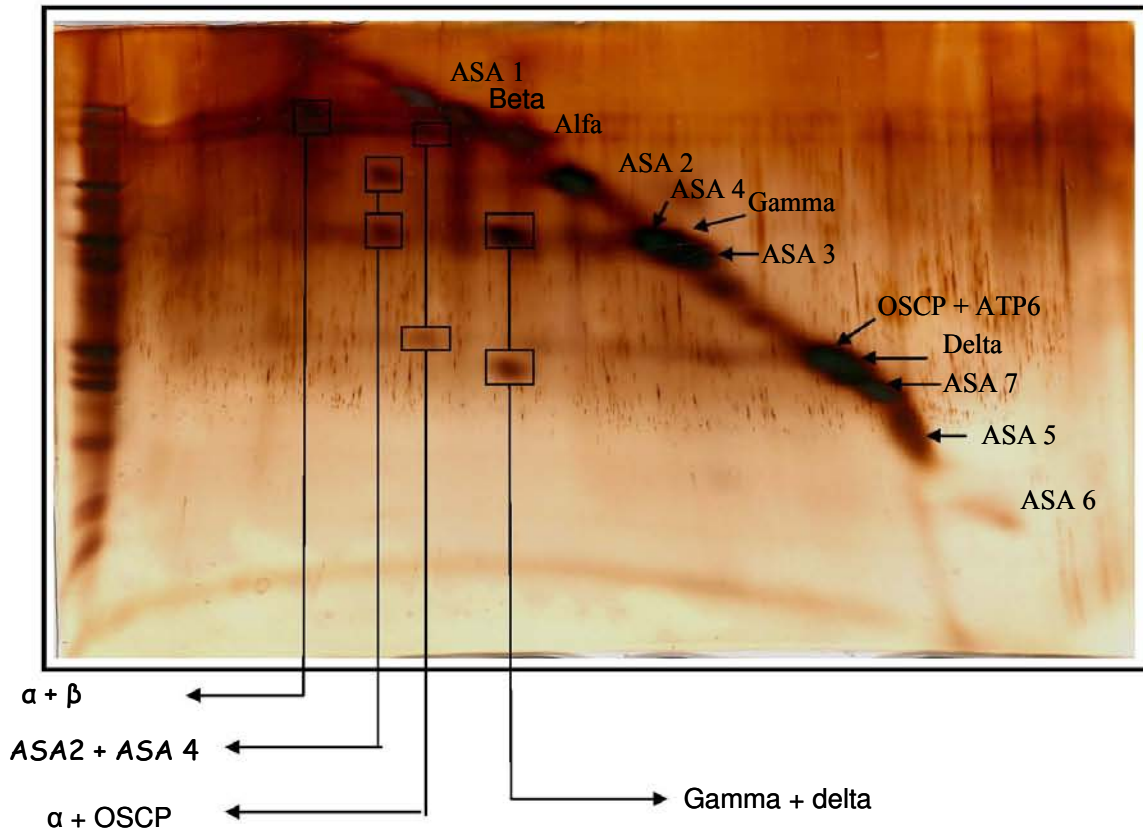


Figura 11. Gel de 2D Tricina SDS-PAGE al 12% después del tratamiento con el agente reductor ditioneitol, en el cual se observan la separación de las subunidades que presentaron entrecruzamientos con el agente SPDP. Tinción con plata.

En la figura 12 se aprecia que la suma de la masa molecular de las subunidades involucradas en el entrecruzamiento entre γ y δ concuerda muy bien con la migración de este producto en el gel.

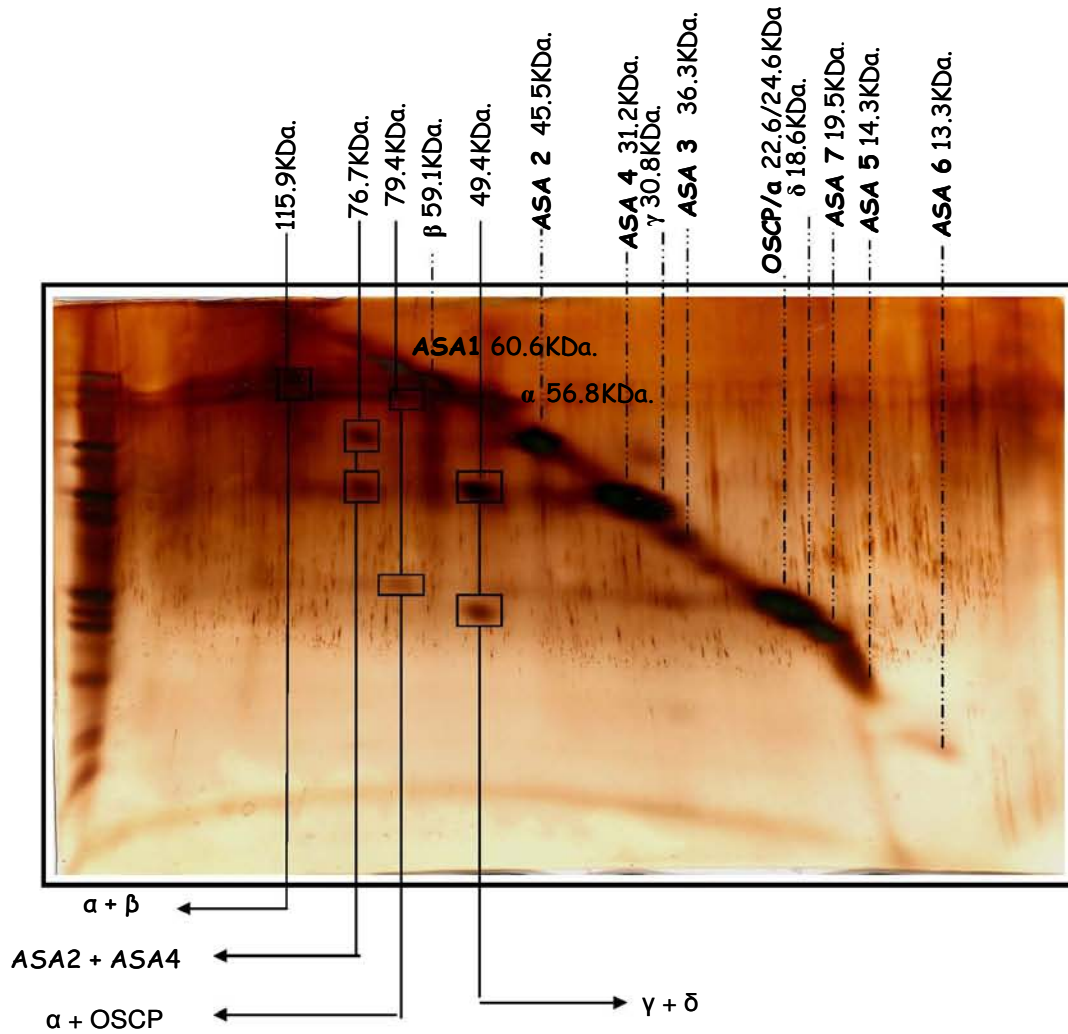


Figura 12. Análisis de las diferentes productos de entrecruzamiento con su respectivo peso molecular (líneas continuas) e identificación de cada subunidades de la ATP sintasa con su respectivo peso molecular (líneas punteadas)

Otro de los agentes heterobifuncionales es el reactivo Sulfo-LC-SPDP, que tiene una longitud de brazo de 15.6 Å y es hidrosoluble.

Con este agente entrecruzador se probaron concentraciones entre 1 mM y 4 mM; no encontrando diferencia en los resultados, se decidió utilizar la concentración menor. El entrecruzador se dejó reaccionar durante 7 horas con 120 µg de proteína, obteniendo un absorbencia a 343 nm de 0.33 que equivale a una concentración de 4.08×10^{-6} M.

En el gel de primera dimensión (figura 13) se observan como en todos los casos los entrecruzamientos de mayor masa molecular: $\alpha + \beta$ y ASA2 + ASA4. Se observa una disminución en la cantidad de proteína principalmente en las subunidades α , γ , ASA3, OSCP/a. La subunidad α presenta una resolución difusa respecto al control, lo cual se explica como un entrecruzamiento interno que le confiere una movilidad anormal, semejante a la observada con SPDP.

En los resultados obtenidos en geles de segunda dimensión (figura 14) se repiten los entrecruzamientos $\alpha + \beta$, ASA2 + ASA4 y $\alpha + \text{OSCP}$, $\gamma + \delta$. Dentro de los nuevos resultados obtuvimos un complejo de las subunidades $\alpha + \text{ASA2} + \text{ASA4} + \text{OSCP}$, otro complejo entre ASA2 + ASA4 + ASA7, a un dímero de ASA4, ASA4 + ASA7 y ASA4 + δ . De los cuales el más interesante resultaría ser el dímero de ASA4, que implica que las subunidades de cada monómero, en algún punto, se encuentran interactuando, y que por lo tanto la subunidad ASA4 estaría implicada en la dimerización de la enzima.

El análisis de la masa molecular del complejo entre las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 concuerda con la suma de la masa molecular de estas subunidades y su migración en el gel, pero la intensidad de la banda que corresponde a ASA7 es menor respecto a la intensidad de las bandas de ASA2 y ASA4, por lo que no parece tratarse de una reacción 1 a 1. Sin embargo, existen entrecruzamientos que corroboran la cercanía de estas tres ASAs, uno de ellos es el producto de entrecruzamientos de ASA2 y ASA4, obtenido con los agentes homobifuncionales. También el producto de entrecruzamiento entre ASA4 y ASA7 obtenido con el agente heterobifuncional Sulfo-LC-SPDP y el producto entre ASA2 y ASA4, obtenido tanto con los agentes homobifuncionales como con los heterobifuncionales.

En el gel se observan productos de entrecruzamientos menores, que se descartaron, ya que no están bien definidos o parecen ser uniones múltiples de polipéptidos. (figura 15).

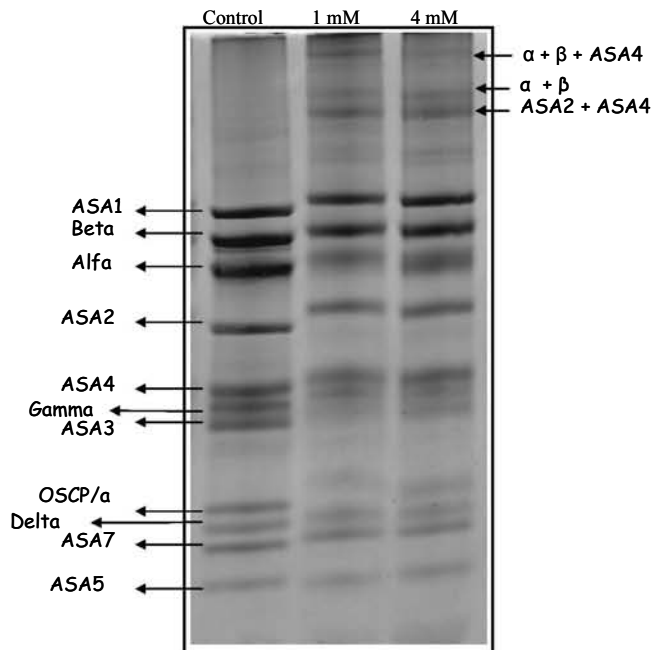


Figura 13. Patrón electroforético de un gel de 1D Tricita SDS-PAGE al 8% realizado después de la reacción con Sulfo-LC-SPDP a una concentración de 1mM y 4mM. Se identifican los entrecruzamientos de mayor masa molecular. Tinción con Azul de Coomassie.

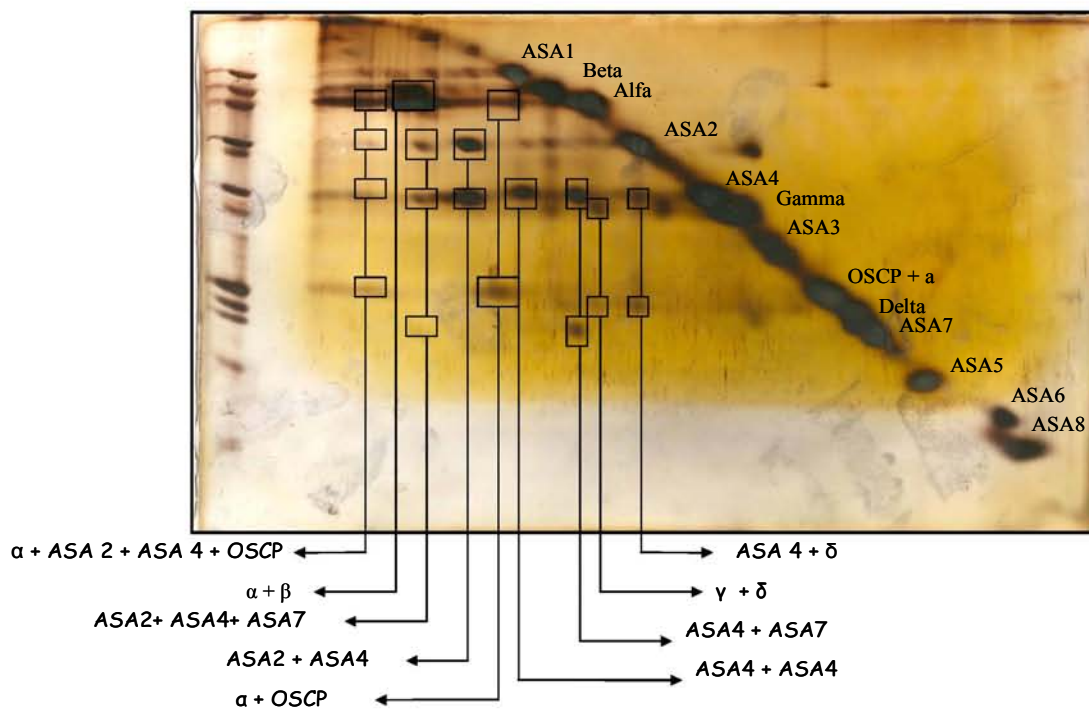


Figura 14. Gel de 2D Tricita SDS-PAGE al 12%, donde se observan los productos de entrecruzamientos encontrados con el agente heterobifuncional Sulfa-LC-SPDP. Tinción con plata.

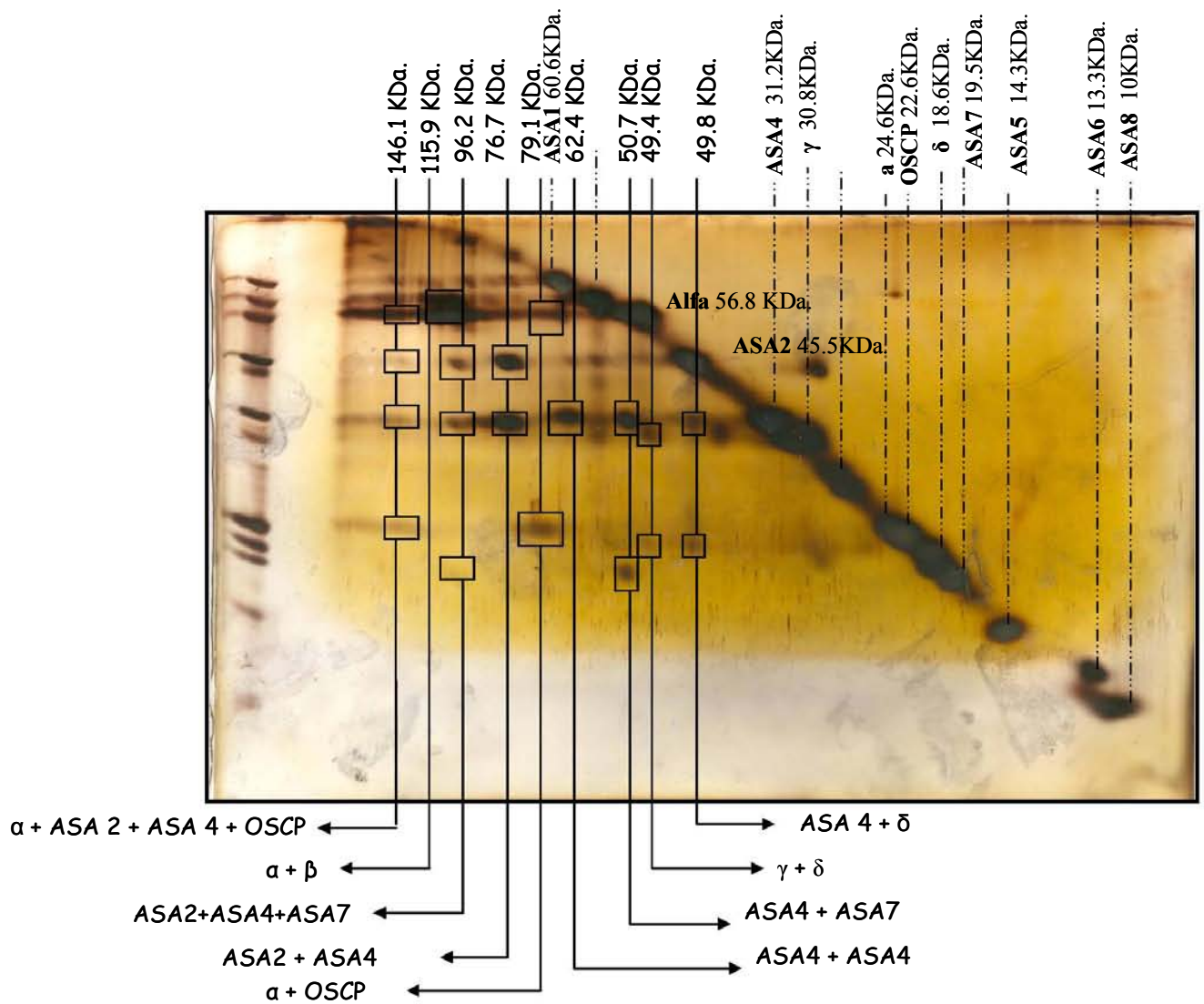


Figura 15. Identificación de las diferentes productos de entrecruzamientos con su respectivo peso molecular (líneas continuas) e identificación de cada subunidades de la ATP sintasa con su respectiva masa molecular (líneas punteadas).

Para obtener mayor información sobre las subunidades que podrían reaccionar por medio de sus grupo sulfhidrilos, se buscaron residuos de cisteína tanto en las secuencias de las subunidades disponibles de *Polytomella sp.*, y las subunidades de *Chlamydomonas reinhardtii*, ya que estas subunidades son las únicas que presentan grupos sulfhidrilos en su estructura. Se hizo una comparación con los datos, y γ , δ , ASA5, ASA7 y c son las únicas subunidades que coinciden en el número de cisteínas presentes en las secuencias de ambas algas, mientras que las subunidades β , OSCP y ASA6 de *Polytomella sp.* presentan un número menor

de cisteínas que las subunidades equivalentes en *C. reinhardtii*. Para las subunidades de *Polytomella sp.* que no se cuenta con la secuencia completa supusimos un número de cisteínas igual al de *C. reinhardtii*. (Tabla 2).

Las subunidades ASA1, ASA2, ASA7, ASA6 y ASA8 no pueden aportar un grupo sulfhidrilo para hacer un entrecruzamiento; por lo tanto, en el resultado entre ASA2 + ASA4 + ASA7 encontrado con Sulfo-LC-SPDP, sólo ASA4 podría reaccionar con los grupos sulfhidrilos, entonces ASA2 y ASA7 deben unirse a ASA4 por medio de grupos aminos primarios.

	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Polytomella sp.</i>
Subunidad	No. De cisteínas presentes en la secuencia	No. De cisteínas presentes en la secuencia
ASA 1	0	0
β	3	2
α	5	4
ASA 2	0	No se tiene la secuencia completa
ASA 3	3	No se tiene la secuencia completa
ASA 4	2	No se tiene la secuencia completa
γ	2	2
a	2	No se tiene la secuencia completa
OSCP	2	1
ASA 7	0	0
δ	1	1
ASA 5	1	1
ASA 6	1	0
ASA8	0	0
ASA 9	2	No se tiene la secuencia completa
ϵ	2	No se tiene la secuencia completa
c	1	1

Tabla 2. Número de residuos de cisteína presentes en cada subunidad de la ATP sintasa en el alga *Polytomella sp* y en *C. reinhardtii*.

En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos con los diferentes agentes entrecruzadores. En todos los casos se obtuvieron tres entrecruzamientos que se repiten: $\alpha + \beta$, ASA2 + ASA4 y $\alpha + \text{OSCP}$. Con DSP y su homólogo DTSSP se encontró un producto más entre ASA2 y ASA7, lo cual sugiere que ASA2 es vecino tanto de ASA4 y ASA7. Con DSP, que no es soluble en agua, también se encuentran entrecruzamientos entre ASA3 + ASA8, ASA1 + ASA7 y entre dos subunidades ASA6, lo que sugiere que esta subunidad sea responsable de la dimerización del complejo enzimático. Las subunidades ASA8 y ASA6 son hidrofóbicas, lo cual explica que estas subunidades reaccionen sólo con DSP.

Con ambos agentes heterobifuncionales se obtiene el entrecruzamiento entre γ y δ . Con el agente Sulfo-LC-SPDP se obtuvo un mayor número de productos de entrecruzamiento, ya que este reactivo presenta una longitud de brazo de más del doble que SPDP. Entre los productos obtenidos tenemos a ASA4 + ASA7, lo cual implica que estas subunidades están juntas y a su vez cercanas a ASA2 de acuerdo con resultados anteriores. También se identificaron a ASA4 + δ , y se encontró también un dímero de ASA4; este dímero implicaría una interacción de ambas subunidades ASA4 de cada monómero, o bien que su estequiometría fuera diferente de uno (dos subunidades ASA4 por monómero).

Para las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 se sugiere que se encuentran en un ambiente acuoso (?); por lo tanto, podrían estar formando el tallo periférico de la enzima junto con la subunidad OSCP en el dominio F_1 y la subunidad α uniendo al dominio F_0 . Mientras que las subunidades ASA6, ASA8 y ASA5 estarían en la región membranal y las subunidades ASA1 y ASA3 estarían en la superficie de la membrana.

ENTRECRUZADORES			
Homobifuncionales (NH3-NH3)		Heterobifuncionales (NH3-SH)	
Soluble en agua	Insoluble en agua	Insoluble en agua	soluble en agua
DTSSP (12Å)	DSP (12Å)	SDPD (6.8Å)	Sulfo-LC-SPDP (15.6 Å)
$\alpha + \beta$	$\alpha + \beta$	$\alpha + \beta$	$\alpha + \beta$
$\alpha + \text{OSCP}$	$\alpha + \text{OSCP}$	$\alpha + \text{OSCP}$	$\alpha + \text{OSCP}$
	$\alpha + \beta + \text{ASA4}$		
ASA2 + ASA4	ASA2 + ASA4	ASA2 + ASA4	ASA2 + ASA4
ASA2 + ASA7	ASA2 + ASA7		
	ASA2+ASA4+ASA7		ASA2+ASA4+ASA7
			ASA4 + ASA4
			ASA4 + δ
		$\gamma + \delta$	$\gamma + \delta$
			ASA4 + ASA7
	ASA1 + ASA4		
	ASA1 + ASA 7		
	ASA3 + ASA8		
	ASA 6 + ASA6		

Tabla 3. Resumen de los entrecruzamientos encontrados con diferentes agentes entrecruzadores, donde se observa algunos resultados repetidos en todos los casos y otros que solo reaccionan con un agente insoluble en agua, como ASA3, ASA8, ASA6, ASA1. Otros resultados solo se repiten en un caso como el dímero de ASA4 y el entrecruzamiento entre ASA4 y ASA7.

2.3. Los entrecruzamientos son productos intracomplejo.

Para corroborar que todos los entrecruzamientos obtenidos fueran productos de enlaces intercomplejos se realizaron experimentos con geles azules nativos (NB-PAGE) con la enzima tratada con diferentes concentraciones de agente entrecruzador. Si la muestra presenta entrecruzamientos entre dos complejos enzimáticos (dos dímeros de ATPasa) se obtendría una banda de mayor peso molecular que pertenecería a un tetrámero (productos intercomplejo), debido al enlace covalente que uniría a dos dímeros de ATPasa por medio del agente entrecruzador.

El experimento sólo se realizó con los agentes DSP y Sulfo-LC-SPDP, puesto que con estos agentes se identificó el mayor número de entrecruzamientos, incluyendo dímeros de las subunidades ASA6 y ASA4.

Con el agente DSP se emplearon concentraciones desde 0.2 mM hasta 4.0 mM. En ninguna de estas concentraciones se observó ninguna banda de mayor peso molecular que correspondiera a un tetrámero de ATPasa. Ello permite concluir que los productos obtenidos de los entrecruzamientos con este agente son intracomplejo, incluso a concentraciones altas (figura 16).

Las concentraciones empleadas con el agente Sulfo-LC-SPDP fueron de 1 a 5 mM, debido a que la concentración óptima de este agente para realizar los experimentos de entrecruzamiento se encuentra entre 2 y 4 mM. Al igual que en el caso anterior, no se observó ninguna banda que indicara entrecruzamiento de dos complejos enzimáticos. Por tanto, todos los entrecruzamientos en estos márgenes de concentraciones son intracomplejo.

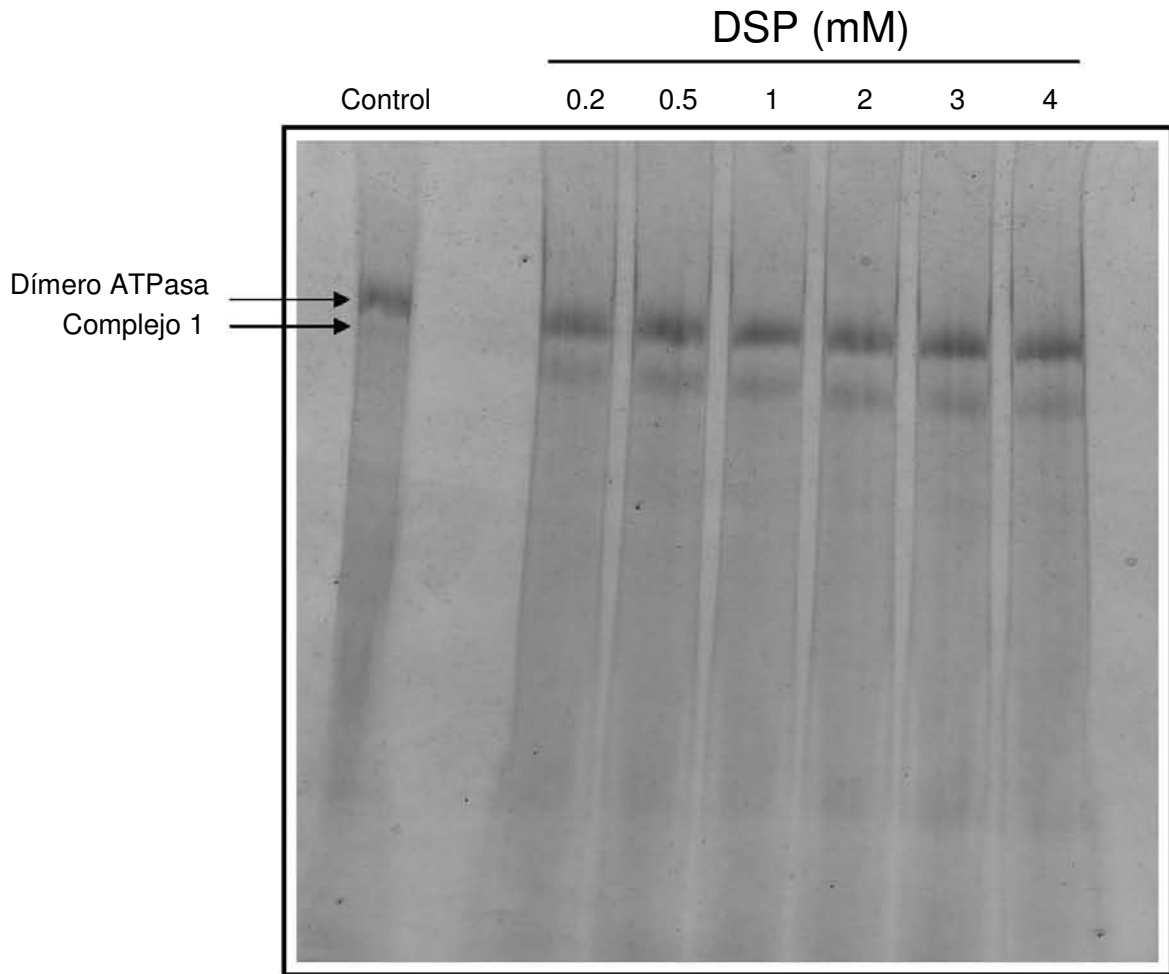


Figura 16. Gel azul nativo de 10% al 5% donde se demuestra que los entrecruzamientos son intramoleculares, la muestra presenta una ligera contaminación con complejo 1.

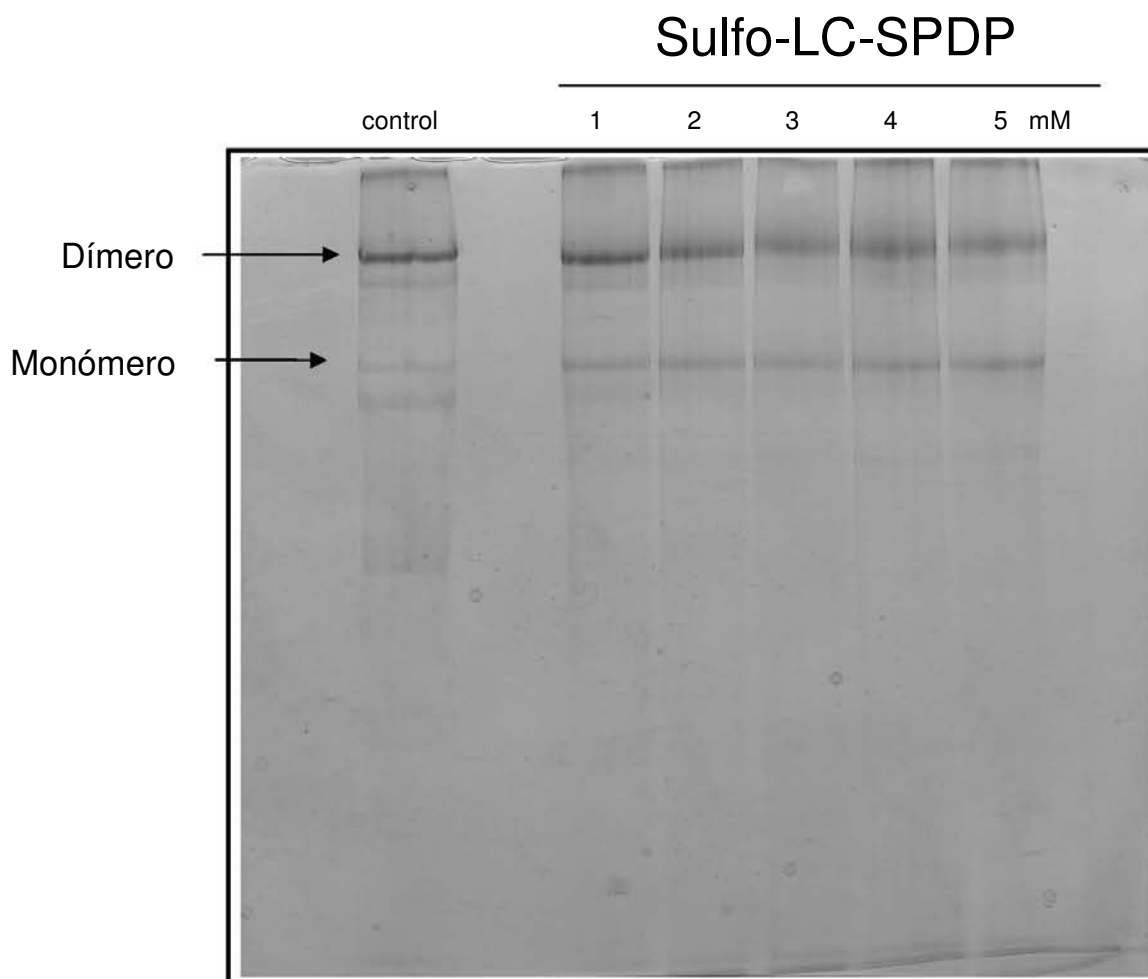


Figura 17. Gel azul nativo de 10% al 5% donde se demuestra que los entrecruzamientos son intramoleculares, la muestra se encuentra parcialmente monomerizada.

2.4. Entrecruzamientos con el monómero de ATP sintasa.

La obtención del monómero de ATPasa se obtuvo con una solución de taurodeoxicolato al 3% (concentración final) incubando la muestra por media hora. Una vez obtenido el monómero, se produjo el entrecruzamiento con el agente DSP, debido a que con este agente se encontró un entrecruzamiento entre dímeros de la subunidad ASA6. Si esta subunidad es la responsable de la dimerización de la enzima, los productos de entrecruzamiento no deberían formarse en presencia del taurodeoxicolato.

Las condiciones de reacción, así como las concentraciones, tanto de proteína como de agente entrecruzador, fueron las mismas que las empleadas en las reacciones de entrecruzamiento con el dímero de la ATPasa.

En la figura 18 se comparan los productos de entrecruzamientos obtenidos, tanto con el monómero como el dímero de la ATPasa. Se observa claramente que el entrecruzamiento identificado como un dímero de la subunidad ASA6 desaparece cuando la reacción de entrecruzamiento se realiza con el monómero de la enzima. Un producto de entrecruzamiento que disminuyó notablemente con el monómero es ASA3 + ASA8, mientras que los resultados restantes se mantienen. Estos datos sugieren que la subunidad ASA6 participa en la dimerización de la enzima.

Aunque el experimento también se realizó con el agente Sulfo-LC-SPDP para conocer si la subunidad ASA4 está también involucrada en la dimerización de la enzima, no se logró obtener un resultado claro. En este trabajo se plantea que la subunidad ASA4 de un monómero interactúa con su homólogo del otro monómero; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que esta subunidad se encuentre en forma dimérica en el monómero de la enzima.

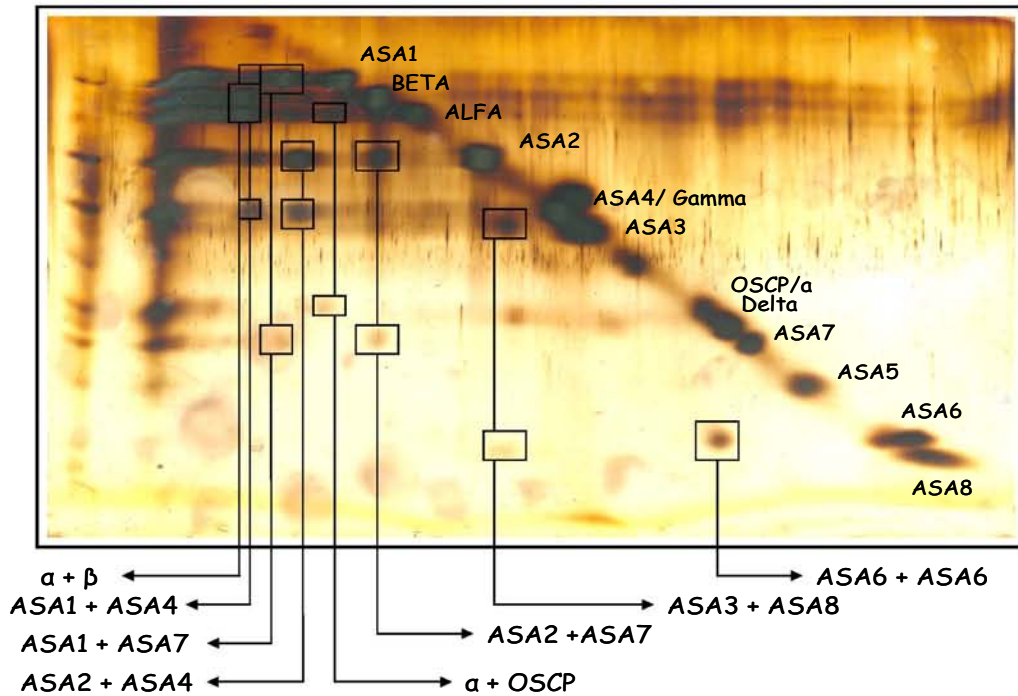
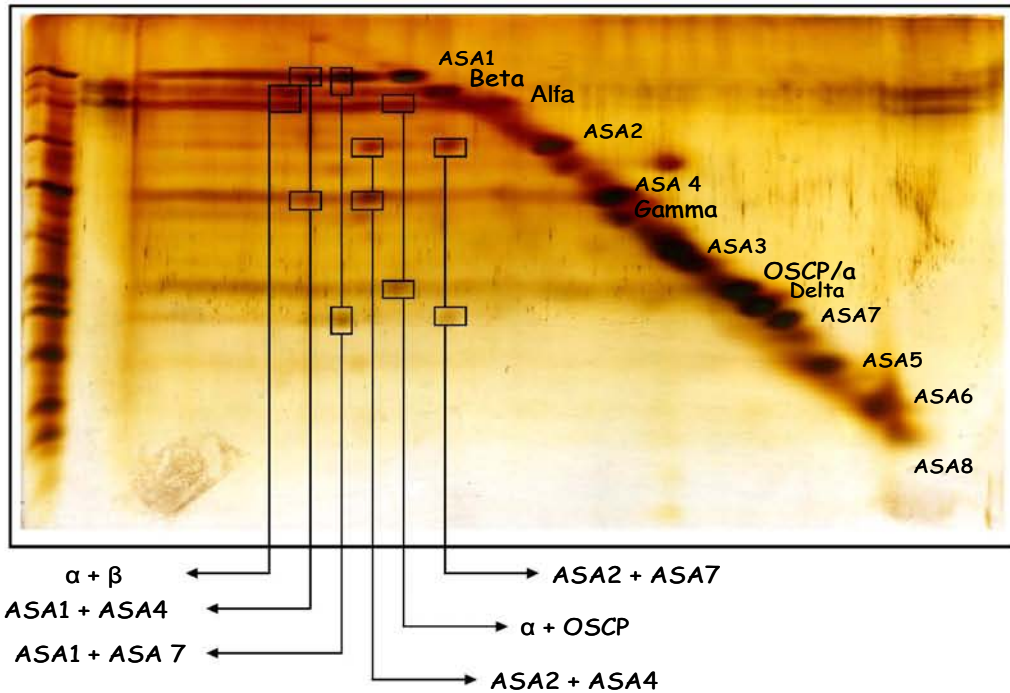


Figura 18. Geles de 2D Tricina SDS-PAGE al 12%. Se observan los productos de entrecruzamientos con el agente DSP después del tratamiento con agente reductor. En la parte superior se observan los resultados obtenidos con el monómero de la enzima, en la parte inferior se muestran los resultados con el dímmero de la ATP sintasa. El producto de entrecruzamiento entre dos subunidades ASAS6 solo se encuentra con el enzima dimérica

2.5. Modelo propuesto de acuerdo con los productos de entrecruzamiento.

De acuerdo con los productos de entrecruzamientos obtenidos, tanto con agentes homobifuncionales como con agentes heterobifuncionales, se realizaron algunas modificaciones al modelo propuesto anteriormente (Figura 19).

Con el agente DSP se obtuvo un entrecruzamiento entre las subunidades ASA6 de cada monómero. Posteriormente se confirmó que ASA6 es responsable de la dimerización, por lo que esta subunidad debe localizarse entre los dos monómeros. Con este mismo agente entrecruzador se obtuvo un entrecruzamiento de las subunidades ASA3 y ASA8, que requiere un cambio de posición de las subunidades ASA1 y ASA3 en el modelo propuesto.

Se encontró un entrecruzamiento de dos subunidades ASA4 con el agente Sulfo-LC-SPDP; por lo tanto, se propone que existe un punto en que las subunidades ASA4 de cada monómero están muy próximas. Por lo tanto también hay un reacomodo de las subunidades ASA2 y ASA7 en el modelo propuesto.

ASA9 también exhibe un cambio en su posición debido a que en su secuencia presenta un segmento hidrofóbico (Van lis *et al.*, 2007) y por lo tanto podría estar anclada a la membrana.

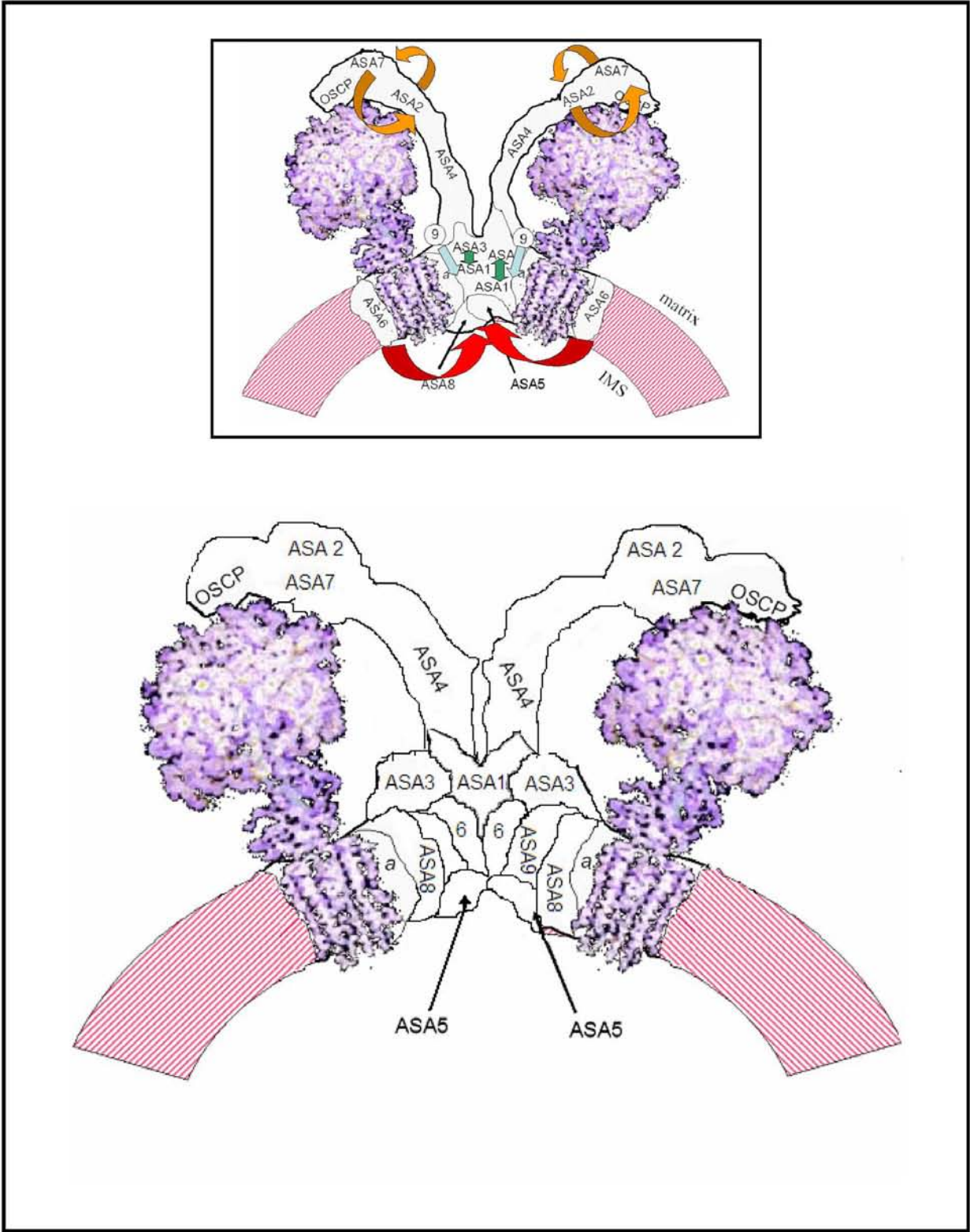


Figura 19. Se muestran las modificaciones que se le realizaron al modelo propuesto anteriormente (parte superior). Al centro se muestra el nuevo modelo.

DISCUSIÓN

La F₁F_o ATP sintasa mitocondrial es una enzima multimérica; cuenta con subunidades catalíticas altamente conservadas, ya que estas subunidades están presentes en la estructura de la enzima tanto de las bacterias como los eucariotes, y son indispensables para la función de la enzima. En los eucariotes se ha identificado un estator más complejo, en comparación con el de la enzima bacteriana, así como subunidades adicionales llamadas supernumerarias.

La purificación de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, permitió identificar a las subunidades que la componen en SDS-PAGE, comprobando que existen 8 subunidades que no tienen ninguna similitud con las presentes en la ATP sintasa de otros eucariotes (en bovino, b, d, e, f, g, F6, IF₁, A6L). Estas subunidades forman parte del estator de la enzima, o bien intervienen en su dimerización, por lo que estos nuevos polipéptidos suplirían estas funciones formando una nueva arquitectura de la enzima en el linaje de las algas clorofíceas. Tanto *Polytomella sp.* como *C. reinhardtii* pertenecen a la familia de las clorofíceas, y la ATP sintasa de ambas algas presenta una composición de subunidades semejantes. También hay evidencia de que el alga *Volvox carterii* presenta esta misma composición de subunidades.

Recientemente se reveló la estructura dimérica de la ATP sintasa de bovino por microscopía electrónica (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005) donde se observan interacciones de los dos dominios F_o por medio de las subunidades e y g, y otra entre los dominios F₁ a través de la formación mediante la subunidad IF₁, que son los responsables de la formación del dímero. Por otra parte, el trabajo de Dudkina *et al.* (2005) reveló la estructura dimérica de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, en la que se observan dos brazos que unen a los dominios F_o y F₁ de cada monómero. La diferencia en la arquitectura de ambas enzimas está dada por la presencia de los nuevos polipéptidos encontrados (ASA1 a ASA9) en las algas clorofíceas.

La estructura de los complejos proteicos puede estudiarse mediante experimentos de entrecruzamiento, y obtener una aproximación de su topología. Se han

estudiado complejos mitocondriales utilizando esta técnica; por ejemplo, a la ATPasa de bovino (Joshi y Burrows, 1990), a la ATPasa de levadura (Velours y Arselin, 2000) y al complejo bc_1 (González-Halphen *et al.*, 1988). Las características de cada uno de los agentes entrecruzadores, su solubilidad, su longitud de brazo y su grupo reactivo, les confieren capacidades de reacción diferentes, y permiten obtener una mayor información sobre la cercanía de las subunidades que componen al complejo proteico.

En este trabajo se utilizaron cuatro diferentes agentes entrecruzadores. Con todos ellos se obtuvieron productos entre las subunidades α y β , así como de α y OSCP. Estos entrecruzamientos se observaron también en los estudios con la ATPasa de bovino, utilizando el agente homobifuncional DSP (Joshi y Burrows, 1990). Estos resultados corroboran que la estructura del dominio F1 se encuentra altamente conservada en los organismos eucariotes. Otra interacción observada en la ATPasa de bovino fue en el dominio Fo, de las subunidades γ y δ . En la ATPasa de *Polytomella sp* se obtuvo el mismo resultado con los agentes SPDP y Sulfo-LC-SPDP, comprobando así la conservación de estas subunidades en ambas enzimas.

Un producto de entrecruzamiento obtenido con todos los reactivos utilizados con la enzima de *Polytomella sp* fue el de ASA4 + ASA2. Para el caso de los agentes homobifuncionales, el resultado sugiere que estas subunidades tienen residuos de lisina muy expuestos. En el caso de agentes heterobifuncionales el residuo de cisteína presente en la subunidad ASA4 se encuentra cercano a dos diferentes residuos de lisinas de ASA2, puesto que los dos reactivos empleados tienen una longitud de brazo muy diferente, alrededor de 9 Å de diferencia.

En el modelo, tanto ASA2 como ASA4 se han propuesto como parte del estator de la enzima, debido a que son proteínas hidrofílicas. Un modelo construido por el servidor Robetta (rosetta.bakerlab.org) de la estructura de ASA4, revela una estructura alargada que presenta estructura de coil-coil, mientras que para el resto de las proteínas se obtuvo una estructura globular. Esto sugiere que ASA 4 sea una subunidad que forme parte del tallo periférico que una a los dominios Fo

y F1. En la estructura de la ATP sintasa de *Escherichia coli*, las subunidades que componen el estator de la enzima son b y δ . Se comprobó por medio de entrecruzamientos que estas subunidades unen al dominio F₁ a través de la subunidad α (Andrew et al. 1998) mientras que el dominio Fo se une a través de la subunidad a. Además, la estructura de la subunidad b de *E. coli* presenta un 80% de α -hélices y es dimérica (Andrew J. W. 1997). No se descarta la posibilidad de que la subunidad ASA4 de la ATPasa de *Polytomella sp.* sea también dimérica.

La subunidad ASA7 se incluyó en este estator de la enzima, junto con ASA2, debido a que se encontraron entrecruzamientos que revelan la cercanía de ASA7 con ASA2 utilizando los agentes homobifuncionales y ASA7 con ASA4 con Sulfo-LC-SPDP. Desafortunadamente no se encontraron entrecruzamientos de estas ASAs con las subunidades OSCP que corroboren su participación en la unión de los dominios Fo y F1 de la ATP sintasa de las algas clorofíceas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el dominio Fo de la enzima estaría formado, según el modelo, por las subunidades a, c y las ASA3, ASA8, ASA6. Además, se encontró que la subunidad ASA6 es responsable de la dimerización de la enzima. En la ATPasa de levadura se identificaron tres proteínas responsables de la dimerización, e, g y k (Arnold et al., 1998), por lo que no hay que descartar la posibilidad de que exista otra subunidad que intervenga en esta función. De las tres proteínas mencionadas, ASA3 no presenta ninguna región hidrofóbica, por esta razón fue colocada en el modelo de manera periférica a la membrana, aunque cerca de la subunidad ASA 8, que es lo que se reveló con el reactivo DSP.

Dado que no se obtuvo ningún resultado con la subunidad ASA5, su presencia en la región membranal se debe a experimentos de disociación con calor (Vázquez Acevedo et al., 2006). En estos experimentos se observa durante la disociación de la enzima a altas temperaturas la formación de un subcomplejo compuesto por las subunidades ASA1, ASA3, ASA5, ASA8; además la secuencia de ASA5 no cuenta con una región hidrofóbica suficiente para atravesar la membrana interna mitocondrial.

El producto de entrecruzamiento entre las subunidad ASA1 y ASA7 es el único resultado que no concuerda con los experimentos realizados por disociación con calor, ya que mientras el resultado del entrecruzamiento sugiere que ASA1 se encuentra en la región soluble de la enzima, los experimentos de disociación sugieren ASA1 forma parte del dominio Fo. En el modelo propuesto se sugiere que ASA1 se encuentra próxima a la región membranal, ya que es difícil imaginar a las subunidades ASA1 y ASA7 juntas, debido a que a su vez estarían cercanas a las subunidades ASA2 y ASA4. Tomando en cuenta que ASA1 y ASA2 son de las proteínas más grandes que componen al complejo enzimático, la densidad electrónica de todas estas subunidades juntas no tendría lugar en la imagen de microscopía electrónica obtenida por Dudkina y colaboradores.

Los estudios de microscopía electrónica, junto con los de entrecruzamientos, permitieron dar una aproximación de la estructura del complejo enzimático en *E.coli*. (Capaldi *et al.*, 2000). Se demuestra que el extremo C-terminal de la subunidad b se une al extremo C-terminal de la subunidad δ , que a su vez interactúa con la subunidad α (Rodgers *et al.* 1998). En otro trabajo se encontró, mediante entrecruzamientos, interacciones de las subunidades α - δ por intermedio de cisteínas (Ogilvie *et al.*, 1997). Con estos resultados se supone que la subunidad δ podría formar una parte del cuello que une a los dominios F₁ y Fo. En este trabajo se encontró entrecruzamiento de la subunidad δ con la subunidad ASA4 con el agente Sulfo-LC-SPDP; por lo tanto, en la estructura de la ATP sintasa de las algas clorofíceas, la subunidad δ también podría encontrarse próxima al estator que une estos dos dominios de la enzima.

Sin duda alguna la estructura de la ATP sintasa de algas clorofíceas es compleja, donde el origen evolutivo de estas nuevas subunidades que la componen denominadas ASAs es aún desconocido. Así como las ventajas que representa tener este tipo de estructura para la actividad de la ATP sintasa y para la fisiología mitocondrial.

BIBLIOGRAFIA.

Andrew J. W. Rodgers, Stephan Wilkens, Robert Aggeler, Michael B. Morris, Susan M. Howitt, and Roderick A. Capaldi. (1997) The Subunit d-Subunit b Domain of the *Escherichia coli* F1F0 ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 31058–31064

Andrew J. W. Rodgers and Roderick A. Capaldi (1998) The Second Stalk Composed of the b- and d-subunits Connects F0 to F1 via an a-Subunit in the Escherichia coli ATP Synthase. J. Biol. Chem. 273, 29406-29410

Aragaos, H. de B. (1910) Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 45-57

Arnald I., Pfeiffer K., Neupert W., Stuart R., A. and Schagger H. (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO Journal* 17, 7170-7178.

Atteia A., Dreyfus G. and González-Halphen D. (1997) Characterization of the a and b-subunits of the F₁F₀-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1320, 275–284.

Atteia A., Van Lis R., Ramirez J. and González-Halphen D. (2000). *Polytomella* spp. growth on ethananol Extracellular pH affects the accumulation of mitochondrial cytochrome c550. *Eur. J. Biochem.*, 267, 2850-2858

Bulygin V., Duncan T. M. and Cross R. L. (2004) Rotor/Stator Interactions of the ϵ Subunit in *Escherichia coli* ATP Synthase and Implications for Enzyme Regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 35616-35621.

Capaldi R.A., Schulenberg B., Murray J. And Aggeler R. (2000) cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase. *The Journal of Experimental Biology* 203, 29-33

Cardol P., González-Halphen D., Reyes-Prieto A., Baurain D., Matagne R. F. and Remacle C. (2005) The Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* Deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology* 137, 447–459.

Devenish, R., Prescott, M., Roucou, X., and Nagley, P., (2000) Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1458, 428-442

Dudkina N. V., Heinemeyer J., Keegstra W., Boekema E. J. and Braun H. P. (2005) Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane *FEBS* 579, 5769-5772

Funes, S., Davison, E., M.G. Van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P. and González Halphen, D. (2002) The Typically Mitochondrial DNA-encoded ATP6 Subunit of the F1F0-ATPase Is Encoded by a Nuclear Gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 277, 6051-6058

Groth G. and Walker J.E. (1996) ATP synthase from bovine heart mitochondria: reconstitution into unilamellar phospholipid vesicles of the pure enzyme in a functional state. *Biochemistry* 318, 351-357

Gonzalez-Halphen D., Lindorfer M. A. And Capaldi R. A. (1988) Subunit arrangement in Beef Heart Complex III. *Biochemistry* 27, 7021-7031

Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, ., Yasuda, R., Yhosida, M. and Kinoshita, K. (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature* 427, 465-468

Joshi S. and Burrows R. (1990), ATP Synthase Complex from Bovine Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 14516-14525.

Lowry O.H. Rosemnbrough, N.J, Farr A.L. y Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Menz R.I., Walker R.E, Leslie A., J., W. (2001) Structure of Bovine Mitochondrial F1-ATPase with Nucleotide Bound to All Three Catalytic Sites: Implications for the Mechanism of Rotary Catalysis. *Cell* 106, 331-341.

Minauro-Sanmiguel F., Wilkens S. and García J.J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel FO bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis *PNAS* 102, 12356–12358.

Müller M., and Martin W. (1999) The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *BioEssays* 21, 377–381.

Ogilvie I., Aggeler R. And Capaldi R. A. (1997) Cross-linking of the δ subunit to the Three α Subunits has no effect on the functioning as expected if δ is part of the stator that links the F₁ and Fo parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 16652-16656

Rodgers, A. J. W. and Capaldi, R. A. (1998) The second stalk composed of the b- and delta-subunits connects FO to F1 via an alpha-subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 29406–29410.

Saddar S. and Stuart R.A. (2005) The Yeast F1FO-ATP Synthase. *J. Biol. Chem.* 280. 24435–24442.

Schägger H. and V Jagow (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.*, 199(2), 223-231.

Schägger H. Y Von Jagow (1987). Tricina-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100KDa. *Anal Biochem.* 166, 368-379.

Van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernández, G and González Halphen, D. (2003) Identification of Novel Mitochondrial Protein Components of *Chlamydomonas reinhardtii* A Proteomic Approach. *Plant Physiol.*, 132, 318-330.

Van Lis, R., Mendoza-Hernández G., Groth G. and Atteia A. (2007) novel ATP synthase structure in *Chlamydomonas* algae. *Plant Phisiol.*, 144(2) 1190-1199.

Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, González-Halphen D (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomem* 38, 271-282

Velours J. and Arselin G. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* ATP Synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32 383-389

Weber, J., Senior, A., (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS letter* 545 61-70

Yasuda R. Noji H, Kinosita K Jr and Yoshida M (1998) F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* 93, 1117-1124.

The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex

Miriam Vázquez-Acevedo · Pierre Cardol · Araceli Cano-Estrada · Marie Lapaille · Claire Remacle · Diego González-Halphen

Received: 20 May 2006 / Accepted: 29 June 2006 / Published online: 8 December 2006
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Abstract Mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp. is a dimer of 1,600,000 Da. In *Chlamydomonas* the enzyme lacks the classical subunits that constitute the peripheral stator-stalk as well as those involved in the dimerization of the fungal and mammal complex. Instead, it contains eight novel polypeptides named ASA1 to 8. We show that homologs of these subunits are also present in the chlorophycean algae *Polytomella* sp. and *Volvox carterii*. Blue Native Gel Electrophoresis analysis of mitochondria from different green algal species also indicates that stable dimeric mitochondrial ATP synthases may be characteristic of all Chlorophyceae. One additional subunit, ASA9, was identified in the purified mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. The dissociation profile of the *Polytomella* enzyme at high-temperatures and cross-linking experiments finally suggest that some of the ASA polypeptides constitute a stator-stalk with a unique architecture, while others may be involved in the formation of a highly-stable dimeric complex. The algal enzyme seems to have modified the structural features of its surrounding scaffold, while conserving almost intact the structure of its catalytic subunits.

Keywords Oxidative phosphorylation · F_1F_0 -ATP synthase · Dimeric mitochondrial complex V · Chlorophycean algae · Stator-stalk · *Chlamydomonas reinhardtii* · *Volvox carterii* · *Polytomella* sp. · ASA subunits

Introduction

Mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase (complex V) plays a major role in oxidative phosphorylation (OXPHOS). Two multisubunit domains constitute the enzyme, a soluble fraction called the F_1 factor and a membrane bound sector F_0 (Alfonzo et al., 1981). F_1F_0 -ATP synthase is also a molecular motor in which a central rotor-stalk [$\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}$] (subunits of beef mitochondria) rotates around an axis perpendicular to the plane of the membrane, while other polypeptides constitute the fixed elements of the motor, subunit *a*, the catalytic core [α_3/β_3], the peripheral stator-stalk [OSCP/*b/d/F*₆], and the so-called minor subunits [A6L/*e/f/g*] (Golden and Pedersen, 1998; Ko et al., 2000; Walker and Dickson, 2006). Proton flux across subunit *a* causes a rotary movement of the membrane-embedded ring *c*₁₀ and its bound, protruding central-stalk [$\gamma/\delta/\epsilon$]. In a full cycle, three sequential 120° movements of subunit γ induce consecutive conformational changes in the three catalytic β subunits leading to substrate binding (ADP + Pi), ATP synthesis, and ATP release (Itoh et al., 2004). Additional subunits play a regulatory role, such as the inhibitory protein IF₁ (Gledhill and Walker, 2005); or are involved in the formation and stabilization of a dimeric complex, such as subunits *e* and *g* (Brunner et al., 2002; Fronzes et al., 2006).

While a dimeric form is observed *in vivo* (Schägger, 2002), complex V from different sources, including mammals, fungi and higher plants, usually migrates in Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE)

M. Vázquez-Acevedo · A. Cano-Estrada ·
D. González-Halphen (✉)
Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología
Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado
Postal 70-600, Delegación Coyoacán,
04510 México D.F., Mexico
e-mail: dhalphen@ifc.unam.mx

P. Cardol · M. Lapaille · C. Remacle
Genetics of Microorganisms, Institute of Plant Biology B22,
University of Liège,
B-4000 Liège, Belgium

(Schägger, 1994) as a monomer of 550–600 kDa. In addition, it is often observed that in these conditions, the enzyme partially dissociates with the concomitant appearance of the free F_1 subcomplex (Jänsch et al., 1996; Arnold et al., 1998; Horvath et al., 2000; Eubel et al., 2004). In sharp contrast, complex V of the chlorophycean algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp. migrates in BN-PAGE as a stable dimer of 1,600 kDa (van Lis et al., 2003; van Lis et al., 2005; Dudkina et al., 2005). Furthermore, monomeric F_1F_0 or free F_1 moieties were never detected in BN-PAGE. Recently, an electron microscopy (EM) study (Dudkina et al., 2005) revealed that the structure of the ATP synthase of *Polytomella* sp. is different from the dimeric enzyme isolated from bovine mitochondria (Minauro-Sanmiguel et al., 2005).

Combining biochemical and computational analyses, the mitochondrial ATP synthase from *C. reinhardtii* was found to contain 14 subunits of 7 to 60 kDa (van Lis et al., 2003; Franzén and Falk, 1992; Nurani and Franzén, 1996; Funes et al., 2002a; Cardol et al., 2005). Seven polypeptides were identified as subunits α , β , γ , δ , a (ATP6), c (ATP9), and OSCP, while no homologs of the ϵ , b , d , e , f , g , IF₁, A6L, and F6 subunits were found. The other seven polypeptides, named ASA1 (for **A**TP **S**ynthase **A**ssociated protein), ASA2, ASA3, ASA4, ASA5, ASA6, and ASA7 (previously NUOP6), in accordance with the *C. reinhardtii* genome project nomenclature, had no counterparts in the databases. This suggested that unique proteins were associated with chlorophycean mitochondrial ATP synthases (Cardol et al., 2005). The ASA1 polypeptide (61 kDa), initially named MASAP (for **M**itochondrial **A**TP **S**ynthase **A**ssociated **P**rotein), MAAP67, or P60, was found in the isolated mitochondrial ATP synthases of both *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. (Accession numbers CAD29654 and CAD90158). It was put forth that ASA1 stabilizes the chlorophycean ATP synthase dimer in BN-PAGE (van Lis et al., 2003; van Lis et al., 2005).

In this work, we demonstrate that the subunit composition of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is similar to the one of the *C. reinhardtii* enzyme. Also, we describe the presence of the classical subunit ϵ and of the novel polypeptides ASA8 and ASA9. We also report that homologous genes are present in the chlorophycean alga *Volvox carterii*. In addition, we sought the presence of dimeric mitochondrial ATP synthases in some algal species, which could be indicative of enzymes with an atypical subunit composition. Heat-treatment dissociation and cross-linking experiments on the purified ATP synthase from *Polytomella* sp. indicated that some of the ASA1 to 9 subunits are constituents of the peripheral stator-stalk of the enzyme, while others may be involved in the dimerization of the complex. A model for the topological arrangement of the ASA subunits is presented. Altogether, the data suggest that chlorophycean

algae contain novel polypeptide constituents in their mitochondrial ATP synthase which give rise to a highly-stable, dimeric enzyme with unique architectural features.

Materials and methods

Algal strains and growth conditions

Polytomella sp. (198.80, E.G. Pringsheim) was grown aerobically in wide-bottom flasks for 48 h at 25 °C in 2 L of MAP medium (pH 7.0) as previously described (van Lis et al., 2005). The other chlorophyte algae used in this work were all axenic cultures known to grow relatively rapidly: *Scenedesmus obliquus* (SAG 276–3b), *Chlorogonium elongatum* (SAG 12–2b), *Chlorococcum ellipsoidum* (SAG 63.80), *Chlamydomonas reinhardtii* (137C), *Chlamydomonas smithii* (cc-1373, Duke University), *Chlamydomonas moewusii* (SAG 21.90), *Tetraselmis chui* (SAG 8–6), *Pseudendoclonium basiliense* (SAG 466.1), and *Chlorella vulgaris* (UTEX 259). Strains were grown in liquid or on solid agar medium under continuous illumination ($45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25°C. Tris-acetate-phosphate medium (TAP) (Gorman and Levine, 1965) was used for all the green algae, except for *T. chui* which was grown on solid Marine medium (Difco Marine Broth 2216, BD).

Polytomella ATP synthase purification

Polytomella sp. cells were centrifuged at $2000 \times g$ for 5 min, resuspended in 200 ml of a cold buffer containing 0.3 M sucrose, 4 mM potassium EDTA, and 20 mM Tris (pH 7.2) (SPT buffer) and centrifuged again. All steps were carried out at 4 °C. The pellet was resuspended in 10 to 20 ml of SPT buffer and the cells were broken mechanically with a Potter homogenizer with five to six gentle manual strokes of the teflon-pestle. The broken cells were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min and the supernatant (S1) saved. The pellet was resuspended in SPT buffer and treated again with five to six strokes of the Potter homogenizer, in order to break the cells that were not lysed in the first treatment. The sample was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min; the resulting supernatant (S2) was mixed with S1 and centrifuged at $17,000 \times g$ for 10 min. The resulting mitochondrial pellet was resuspended in a small volume of SPT buffer. The protein concentration of the mitochondrial fraction was estimated, and then diluted to a final concentration of 10 mg of protein/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgSO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 $\mu\text{g/ml}$ tosyl-lysyl-chloromethylketone (TLCK) and 100 mM NaCl. N-dodecyl- β -maltoside (added from a 10 mg/ml stock solution) was added drop by drop until it reached a final w/w ratio of 2 mg of detergent per mg of protein. The mixture was incubated with gentle stirring for 30 min, and centrifuged at $90,000 \times g$ for

20 min. The supernatant was recovered and dialyzed for two hours against 2 L of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM MgSO₄. The dialyzed sample was loaded onto a DEAE-Biogel A column (70 ml) equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgSO₄, 0.1 mg/ml of n-dodecyl- β -maltoside, 1 mM PMSF, and 50 μ g/ml TLCK (TMT buffer). The column was washed with 3–4 column volumes of the same buffer and then eluted with a linear NaCl gradient (0 to 125 mM in TMT buffer). The fractions enriched in *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase were recovered and concentrated by ultrafiltration in an Amicon chamber with a YM100 membrane. After adding glycerol to a final concentration of 10%, the sample was loaded onto seven-ml tubes containing 15 to 40% glycerol gradients in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM sodium EDTA, 10 mM succinate, 35 mM NaCl, 2 mM ATP and 0.1 mg/ml of n-dodecyl- β -maltoside. The gradients were centrifuged at 40000 $\times g$ for 17 h in a swingout rotor. The purified ATP synthase complex was recovered in a band that migrated around 20% glycerol.

Protein analysis

To prepare the total membrane fraction from algae, about 5×10^6 cells were frozen in liquid nitrogen and mechanically disrupted in a mortar. The broken cells were suspended in a MOPS buffer (280 mM mannitol, 10 mM MOPS-KOH pH 7.4, 0.1% BSA, 1 mM PMSF) and the solution was homogenized by sonication (two times for 10 sec; Vibra Cell sonicator, Danbury, CT). The suspension was centrifuged at low speed (10 min at 480 $\times g$ followed by 5 min at 3000 $\times g$) and the resulting supernatant was then centrifuged at high speed (27000 $\times g$ for 15 min). The final pellet containing membranes was suspended in the MOPS buffer. Proteins were solubilized in the presence of n-dodecyl- β -maltoside and subjected to BN-PAGE as described by Schagger (1994). The stacking gel contained 4% (w/v) acrylamide, and the separating gel was a gradient from 5 to 12% (w/v) acrylamide. Complex I resolved by BNE-PAGE was identified by its NADH dehydrogenase activity detected by incubating the gel in 100 mM MOPS-KOH (pH 8.0) containing 100 mM NADH and 1 mg per ml Nitro blue Tetrazolium (NBT). Complex V was identified by its ATP synthase activity detected by incubating the gel in 50 mM HEPES (pH 8.0) containing 10 mM ATP and 30 mM CaCl₂. When indicated, BN-PAGE was followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE (Schagger, 1994). Protein concentrations were estimated according to Bradford (1976), or to Markwell et al. (1978). The isolation of polypeptides for N-terminal sequencing was carried out as previously described (Atteia et al., 1997). N-terminal sequencing was carried out by Dr. J. d'Alayer on an Applied Biosystems Sequencer at the Laboratoire de Microsequenage des

Proteines, Institut Pasteur, Paris (France). Cross-linking experiments were carried out with the water-soluble, homobifunctional, thiol-cleavable reagent 3,3'-dithio bis-(sulfo succinimidyl propionate) (DTSSP). The enzyme (4 mg protein /ml), in a buffer containing 20 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM sodium EDTA, 10 mM succinate, 35 mM NaCl, 2 mM ATP and 0.1 mg/ml of n-dodecyl- β -maltoside, was incubated in the presence of 0.75 mM DTSSP, for one hour, at 6 $^{\circ}$ C. The reaction was stopped by the addition of 25 mM Tris (pH 8.0) (final concentration). The sample (100 μ g of protein) was subjected to Tricine-SDS-PAGE [7% (w/v) acrylamide] in non-reducing conditions. The lanes of interest were cut and incubated for one hour in the presence of 50 mM 1,4-dithiothreitol, 0.1% SDS, 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine (pH 8.25) and loaded onto 2D-Tricine-SDS-PAGE [12% (w/v) acrylamide].

Results

Update on the subunit composition of mitochondrial ATP synthase from the chlorophycean alga *C. reinhardtii*

A new version of the genome sequence of *C. reinhardtii* has recently become available (*C. reinhardtii* v3.0 at the Department of Energy Joint Genome Institute, <http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>). So, we carried out an extensive search of *Arabidopsis thaliana* ATP synthase subunit homologs in the *Chlamydomonas* genome using BLAST (Altschul et al., 1990). Among the 16 polypeptides that form the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase of *Arabidopsis*, including the plant-specific 24 kDa F_Ad subunit (Heazlewood et al., 2004), only eight homologous subunits and an isoform could be identified in the green alga [α , β , γ , δ , ϵ , OSCP, *a* (ATP6) and *c* (ATP9)]. The other eight constituents of the higher plant mitochondrial ATP synthase had no counterparts in *Chlamydomonas* [A6L (ATP8), IF₁, F_Ad, *b*, *d*, *e*, *f*, and *g*]. Instead the algal enzyme contains the seven novel polypeptides ASA1 to 7 whose corresponding genes were previously identified in the *C. reinhardtii* genome sequence (Cardol et al., 2005). An additional subunit, ASA8, was found based on its similarity to its *Polytomella* homolog (see below). Table 1 summarizes and updates the constituents of the mitochondrial ATP synthase of *C. reinhardtii*.

One can hypothesize that subunits ASA1 to 8 were recruited to the mitochondrial ATP synthase from pre-existing subunits belonging to another ATP synthase/ATPase of *C. reinhardtii* (either the chloroplast or the vacuolar enzymes). Nevertheless, none of the novel F₁F₀-ATP synthase subunits share any significant sequence similarity with subunits of CF₁F₀-ATP synthase or of V₁V₀-ATPase. Moreover, with the exception of ASA1 of *Polytomella* sp.,

Table 1 Polypeptides associated with *C. reinhardtii* F₁F₀-ATP synthase

Subunit name	Molecular mass (kDa) pp/ms	N-terminal sequence of the mature subunit (and reference)	<i>Chlamydomonas</i> genome identifier
ASA1	63.1/60.6	YVTALKVEF (<i>a</i>)	estExt_GenewiseW_1.C_160132
β (ATP2)	61.8/59.1	AEPAAAAT (<i>b</i>)	estExt_GenewiseW_1.C_130017
α (ATP1)	61.5/56.8	ASDAKALD (<i>c</i>)	estExt_GenewiseW_1.C_50221
ASA2	48.4/45.5	ATATFVPGVSGDASG (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_pg.C_300145
ASA3	39.7/36.3	GAPAGSHDHP (<i>d</i>)	Chlre2_kg.scaffold_50000016
ASA4	34.0/31.2	ATGAAPSKK (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_kg.C_20106
γ (ATP3)	35.1/30.8	ASNQAVKQRI (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_pg.C_570033
<i>a</i> (ATP6)	35.5/24.6	STAAQVQSGATVNSL (<i>d</i>)	estExt_gwp_1W.C_10357
OSCP (ATP5)	25.9/22.6	AKTAPKA (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_pg.C_280199
ASA7	22.2/19.5	LSTLVEKFTFGSAAD (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_pg.C_300161
δ (ATP16)	21.2/18.6	EEVAVPAGPKE (<i>e</i>)	estExt_fgenes2_kg.C_410003
ASA5	14.3	MKLLPESLQEEA (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_kg.C_320014
ASA6	16.1/13.3	EESSVANLVKS (<i>d</i>)	estExt_fgenes2_pg.C_70146
ASA8	10.0	MTLGEAYLKDIL (<i>e</i>)	estExt_fgenes2_pg.C_250059
ε (ATP15)	8.3	MCPPSGPFYRVA (<i>e</i>)	estExt_gwp_1W.C_80137
<i>c</i> (ATP9)	9.9/7.3	SVLAASKMVGA (<i>e</i>)	e_gwW.68.39.1

Note. Molecular masses were calculated from the deduced sequences of the preproteins (pp) and from the mature sequences (ms). ASA1 to ASA8 subunits are the novel components of *C. reinhardtii* ATP synthase. Sequences in italics were not determined experimentally, but predicted from sequence similarities with the corresponding *Polytomella* sp. polypeptides. Subunit ASA7 corresponds to the previously identified subunit NUOP6, and *c* (ATP9) corresponds to the previously described ATP9B isoform (Cardol et al., 2005). ATP9A (*C. reinhardtii* genome identifier e_gwH.68.58.1) is not present in *V. carterii*, and is probably also not expressed in *C. reinhardtii*. The presence of an homolog of *Polytomella* ASA9 remains to be found in *C. reinhardtii*.

References: (a) Atteia (1994). (b) Franzén and Falk (1992). (c) Nurani and Franzén (1996). (d) Funes et al., (2002a). (e) This work.

Chlamydomonas subunits ASA1 to 8 have no homologs in the databases and therefore, their evolutionary origin remains obscure.

Subunit composition of the mitochondrial ATP synthase from the colorless chlorophycean alga *Polytomella* sp

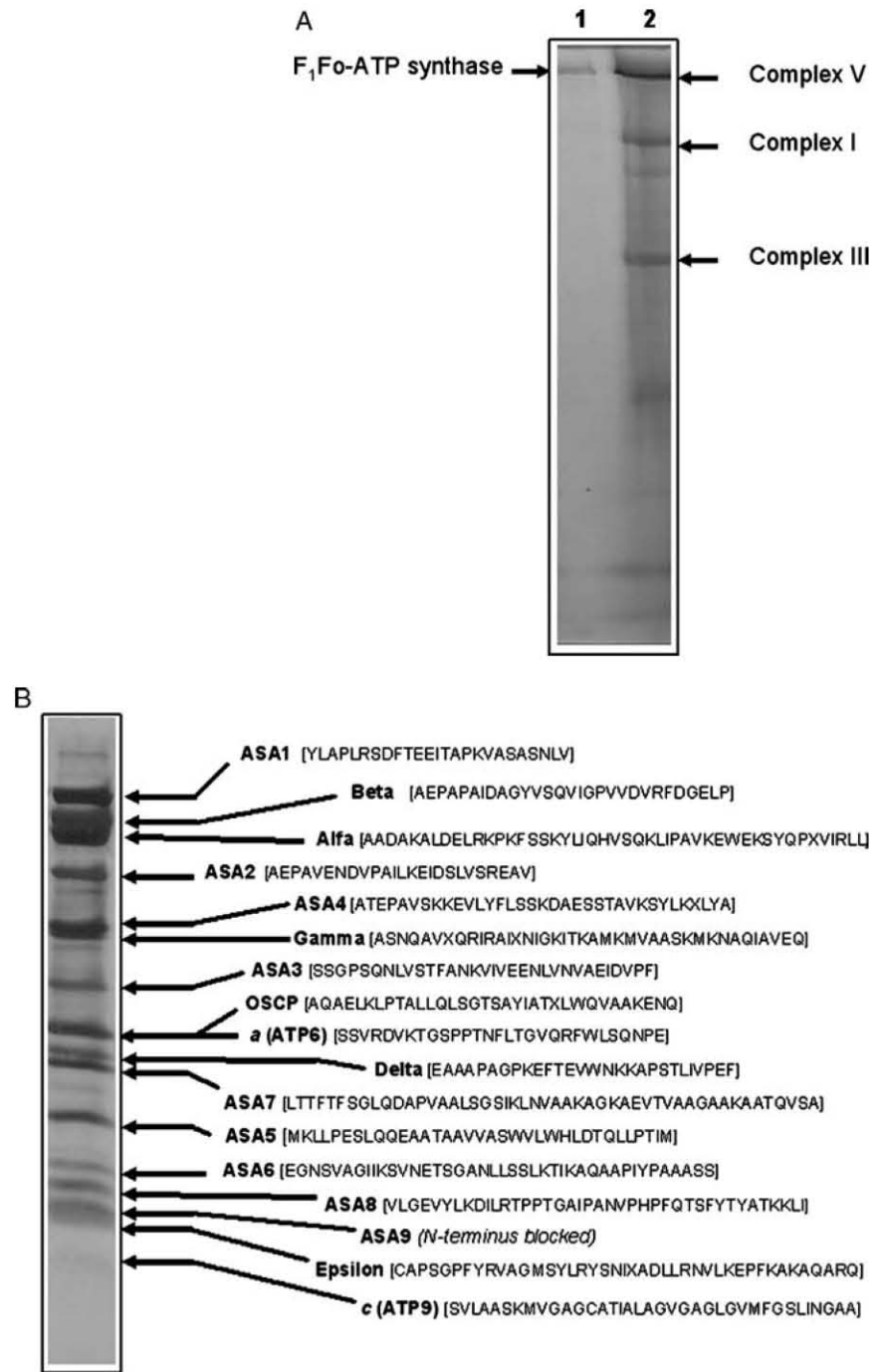
To explore the subunit composition of mitochondrial ATP synthase in another chlorophycean alga, we obtained a highly homogeneous preparation of *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase through a two-step purification procedure (see Materials and Methods). When the purified enzyme was run in BN-PAGE side by side with solubilized mitochondria from *Polytomella*, it exhibited the same mobility as complex V (Fig. 1A). Therefore, the *Polytomella* mitochondrial ATP synthase obtained from the glycerol gradients also behaves as a dimeric complex. This purified enzyme exhibited a polypeptide pattern after SDS-PAGE similar to the one previously characterized (Atteia et al., 1997; Funes et al., 2002; van Lis et al., 2005). In addition, the number and size of the *Polytomella* ATP synthase polypeptide constituents are similar to that of the *C. reinhardtii* enzyme (van Lis et al., 2005).

All the polypeptides of the purified *Polytomella* mitochondrial ATP synthase resolved by SDS-PAGE were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and subjected to N-terminal sequence analysis. Except for ASA9 which exhibited a blocked N-terminus, N-terminal sequences—from 21 to 47 residues—were obtained for all polypeptides (Fig. 1B). Since each one matched a *C. reinhardtii* counterpart, the analysis allowed the unambiguous identification of 16 of the 17 polypeptides that constitute the mitochondrial ATP synthase of the colorless alga. The N-terminal sequence of an 8 kDa subunit, upon BLAST analysis, revealed a *C. reinhardtii* homolog, (gene identifier estExt_fgenes2_pg.C_250059). This novel polypeptide was named ASA8.

Some minor differences were found between the *Chlamydomonas* and *Polytomella* subunits. For example, *Polytomella* subunit ASA3 was found to be partially proteolyzed, since its N-terminal sequence determined by Edman degradation is similar to a *C. reinhardtii* mature ASA3 subunit that would have lost its MTS plus 44 additional residues from its N-terminus.

The polypeptide patterns of the *Polytomella* sp. enzymes obtained from glycerol gradients and by BN-PAGE (by

Fig. 1 Coomassie Blue stained electrophoretic patterns of purified mitochondrial ATP synthase from *Polytomella* sp. (A) Blue native-PAGE of purified ATP synthase obtained from glycerol gradients (30 μ g of protein) (lane 1) and total mitochondrial proteins from *C. reinhardtii* (0.5 mg of protein) (lane 2). (B) The subunits of the *Polytomella* ATP synthase complex after electrophoresis through a Tricine-SDS polyacrylamide gel and transfer onto a PVDF membrane. The N-terminal sequences of the polypeptides were determined and the identified subunits are indicated. The sequences of the β and α subunits were taken from Atteia et al. (1994). The additional faint bands found in the preparation were considered to be contaminants and were not further explored



cutting the corresponding complex V band from the first dimensional gel and loading it onto SDS-PAGE) were compared and were found identical (data not shown). This suggests that ASA1 to 9 polypeptides are genuine components of ATP synthase, since they remain associated with the enzyme complex isolated by two different purification procedures.

Considering the theoretical molecular masses of the *Chlamydomonas* subunits, the observed apparent molecular mass of the *Polytomella* dimeric complex as judged by

BN-PAGE (1600 kDa), is consistent with a stoichiometry [$\alpha_3/\beta_3/\gamma/8/\epsilon/a/c_{10}/OSCP/ASA1/ASA2/ASA3/ASA4/ASA5/ASA6/ASA7/ASA8/ASA9$] for each monomer, with a theoretical molecular mass of 787.9 kDa (1575.8 kDa for the dimer). Altogether, the data suggest that the newly-identified polypeptides ASA2 to 8 are real subunits of the mitochondrial ATP synthase of the colorless alga *Polytomella* sp. The sequence of the *Polytomella* ASA9 subunit and the possible presence of a counterpart in *C. reinhardtii* remain to be explored.

Homologs of the genes encoding the *C. reinhardtii* ATP synthase subunits are also present in the genome of the chlorophycean alga *V. carterii*

The genome of the chlorophycean alga *V. carterii*, another close-relative of *C. reinhardtii*, has been subjected to a first round of sequencing using a shot-gun approach. Comparisons between *Chlamydomonas* and *Volvox* sequences are publicly available at the *C. reinhardtii* genome web page. We searched the *V. carterii* genome for homologs of the genes encoding the 16 subunits of the *C. reinhardtii* mitochondrial ATP synthase. *V. carterii* contains gene homologs encoding subunits α , β , γ , δ , ϵ , a , c , OSCP, and subunits ASA1 to 8 (data not shown). Of the two c (ATP9) isoforms, ATP9A and ATP9B described for *C. reinhardtii* (Cardol et al., 2005), only ATP9B has a counterpart in *V. carterii*. No homologs for the classical ATP synthase subunits, b , d , e , f , g , IF₁, A6L, and F6 could be found in the *Volvox* genome. Thus, the data indicate that the novel subunits ASA1 to 8 are characteristic of at least three chlorophycean algae: *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp., and *V. carterii*. These findings led us to hypothesize that the presence of a highly-stable dimeric mitochondrial ATP synthase with an atypical subunit composition may be characteristic of the whole lineage of chlorophycean algae, and led us to explore additional algal species.

Highly stable dimeric mitochondrial ATP synthases are present in several algae from the chlorophycean lineage

The Chlorophyta lineage comprises four major classes of green algae with more than two thousand species: Chlorophyceae, Prasinophyceae, Trebouxiophyceae, and Ulvophyceae. We assumed that the presence of a stable dimeric complex V (with apparent molecular masses close to 1,600,000 Da) could represent mitochondrial ATP synthases with an atypical subunit composition. Since it is not feasible to purify the mitochondrial ATP synthase from all green algal species, we choose at least one representative from each class, and resolved their OXPHOS complexes by BN-PAGE from crude membrane fractions. Specific activity stainings were used for the detection of complexes I and V. Dimeric complex V, stained with Coomassie-Blue is visualized only for the Chlorophycean species. Figure 2 shows the electrophoretic patterns after BN-PAGE of solubilized complexes from six chlorophycean algae of various orders (*Scenedesmus obliquus*, *Chlorogonium elongatum*, *Chlorococcum ellipsoidum*, *Chlamydomonas moewusii*, *C. reinhardtii*, and *Chlamydomonas smithii*), the Trebouxiophyceae *Chlorella vulgaris*, the Prasinophyceae *Tetraselmis chui*, and the Ulvophyceae *Pseudendoclonium basiliense*. The position of complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase, about 1000 kDa), detected as a control of the presence of

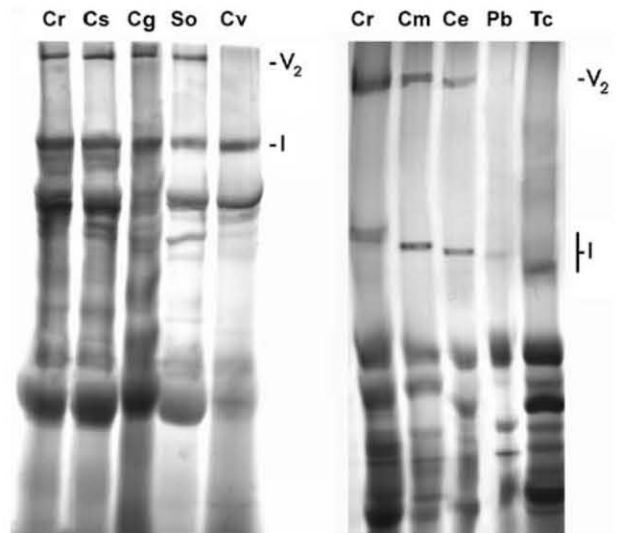


Fig. 2 Coomassie-Blue stained image of the native membrane protein complexes from different Chlorophyta separated by BN-PAGE. In each lane 120 μ g of protein were loaded. The positions of mitochondrial dimeric complex V (V_2) and complex I (I) are indicated. Both complexes were identified by their specific activity stainings. Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*, Cs: *Chlamydomonas smithii*; Cg: *Chlorogonium elongatum*; So: *Scenedesmus obliquus*; Cv: *Chlorella vulgaris*; Cm: *Chlamydomonas moewusii*; Ce: *Chlorococcum ellipsoidum*; Pb: *Pseudendoclonium basiliense*; Tc: *Tetraselmis chui*

respiratory-chain complexes in the protein extracts, is indicated on the figure. Only the chlorophycean algae showed the presence of dimeric complex V. No high molecular mass bands related to complex V and running above complex I could be identified in *C. vulgaris*, *T. chui*, or *P. basiliense*.

Table 2 summarizes the data concerning subunit composition of mitochondrial F₁F₀-ATP synthase among eukaryotes. Since the b (ATP4) and A6L (ATP8) subunits are absent from the three chlorophycean species *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. and *Volvox carterii* investigated in this work, we suggest that the presence of mitochondrial genes coding for these two subunits is a clue indicating the presence of a classical enzyme. Both the *atp4* and *atp8* genes are found in the mitochondrial genomes of non-chlorophycean green algal classes and of higher plants. Although specific subunits remain to be genetically or biochemically identified, the available data suggest that subunits ASA1 to 8 are components characteristic of the chlorophycean algae and responsible for the highly-stable dimeric form of the enzyme in this lineage.

Some of the novel subunits ASA1 to 9 are constituents of the peripheral stator-stalk of *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase, while others may participate in its dimerization

To test the stability of the purified *Polytomella* mitochondrial ATP synthase, the enzyme was subjected to incubation at 60 °C for various periods of time. Samples were subjected

Table 2 The subunit composition of mitochondrial F₁F₀-ATP synthase from various organisms is indicated. Subunits present in an organism are marked as (●) if mitochondria encoded or as (○) if nucleus encoded. Missing subunits are marked as (–). Blank spaces indicate that neither biochemical nor molecular genetic evidence for the presence or for the absence of a particular subunit is available. Subunits marked in bold over gray background are the ones conserved in all mitochondrial F₁F₀-ATP synthases. Except for *V. carterii* (*V.c.*) and *Polytomella* sp. (*P.s.*), representative species whose mitochondrial genomes have been fully sequenced were chosen to construct this table. Therefore, some algal species differ from those used in Fig. 2. Abbreviations (and accession numbers of the mtDNA sequences): *B.t.*, *Bos taurus* (NC_006853); *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae* (NC_001224); *A.t.*, *Arabidopsis thaliana* (NC_001284); *N.o.*, *Nephroselmis olivacea* (AF110138); *P.w.*, *Prototheca wickerhamii* (NC_001613); *P.a.*, *Pseudodendroclonium akinetum* (NC_005926); *S.o.*, *Scenedesmus obliquus* (NC_002254); and *C.r.*, *Chlamydomonas reinhardtii* (NC_001638). The mtDNA sequences of *Polytomella* sp. and *V. carterii* are assumed to be highly similar to the ones of *Polytomella parva* (AY062933) and *C. reinhardtii* respectively.

Subunit Name			Viridiplantae								
	Metazoa	Fungi	Streptophyta	Chlorophyta				Chlorophyceae			
				Prasinophyceae	Trebouxiophyceae	Ulvoophyceae	<i>S.o.</i>	<i>C.r.</i>	<i>P.s.</i>	<i>V.c.</i>	
											<i>N.o.</i>
α (ATP1)	○	○	●	●	●	●		○	○	○	
β (ATP2)	○	○	○					○	○	○	
γ (ATP3)	○	○	○					○	○	○	
δ (ATP16)	○	○	○					○	○	○	
ε (ATP15)	○	○	○					○	○	○	
OSCP (ATP5)	○	○	○					○	○	○	
A6L (ATP8)	●	●	●	●	●	●		-	-	-	
F6	○	○	-					-	-	-	
IF ₁	○	○	○					-	-	-	
F _A d (24 kDa)	-	-	○					-	-	-	
a (ATP6)	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	
b (ATP4)	○	○	●	●	●	●		-	-	-	
c (ATP9)	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○	
<i>d</i>	○	○	○					-	-	-	
<i>e</i>	○	○	○					-	-	-	
<i>f</i>	○	○	○					-	-	-	
<i>g</i>	○	○	○					-	-	-	
ASA1	-	-	-					○	○	○	
ASA2	-	-	-					○	○	○	
ASA3	-	-	-					○	○	○	
ASA4	-	-	-					○	○	○	
ASA5	-	-	-					○	○	○	
ASA6	-	-	-					○	○	○	
ASA7	-	-	-					○	○	○	
ASA8	-	-	-					○	○	○	
ASA9	-	-	-						○		

to BN-PAGE followed by 2D SDS-PAGE. Figure 3A shows a typical pattern of dissociation of the enzyme. The high molecular mass species corresponded to the intact, dimeric enzyme of 1,600 kDa. After 20 s of incubation, a second band with an estimated apparent molecular mass of 800 kDa appeared; followed by a pair of bands around 400 kDa and 200 kDa that appeared between 30 and 40 s, and several additional bands of 70 kDa or less that increased after longer times of incubation at 60 °C. Complex I present as a residual contaminant in this particular preparation disappeared after 30 s incubation at 60 °C. Analysis by 2D SDS-PAGE of the polypeptide pattern generated by each band allowed its iden-

tification (Fig. 3B). The 800 kDa band gave rise to a polypeptide pattern identical to the one of 1,600 kDa, suggesting that in short incubation times at high temperature, the dimeric ATP synthase dissociates into two monomers. Longer times of incubation gave rise to soluble F₁ (400 kDa band) formed by subunits [α₃/β₃/γ/δ] (Fig. 3C). In some experiments, subunit ε remained attached to the F₁ subcomplex. In contrast, the 200 kDa band resolved into five polypeptides. Four of them could be readily identified by their mobility in SDS denaturing gels: ASA1, ASA3, ASA5, ASA8, and *c* (ATP9) (Fig. 3C). The fifth subunit could correspond to either OSCP or *a* (ATP6), since they both exhibit the same mobility in the

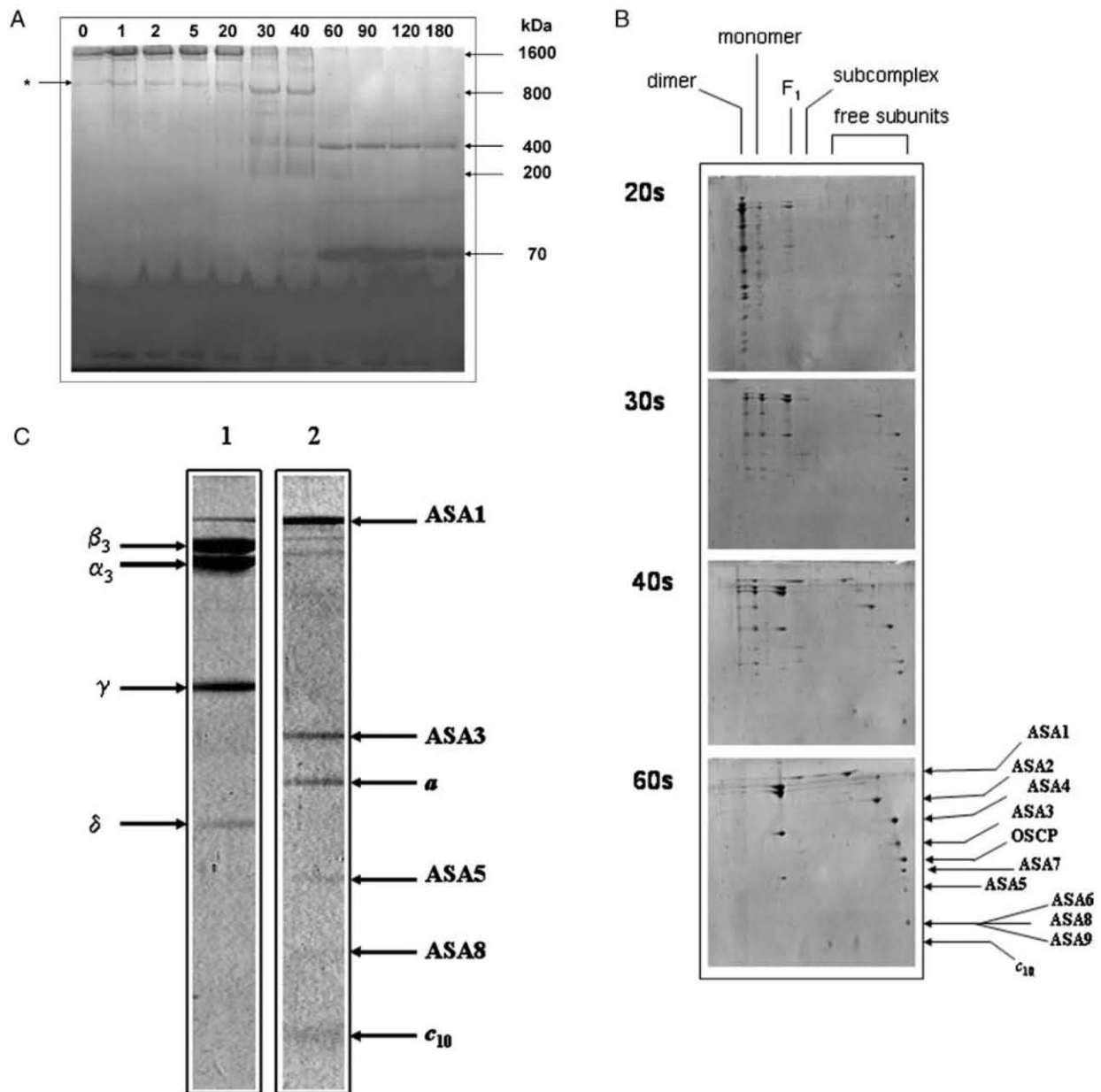


Fig. 3 Electrophoretic patterns obtained for the time course of heat-induced dissociation of the isolated ATP synthase from *Polytomella sp.* (A) Blue native-PAGE of purified ATP synthase incubated at 60 °C for the indicated periods of time (in seconds). The control without heating is labelled zero. The approximate apparent molecular masses of the identified complexes and subcomplexes are indicated. The asterisk indicates the presence of residual complex I in this particular ATP syn-

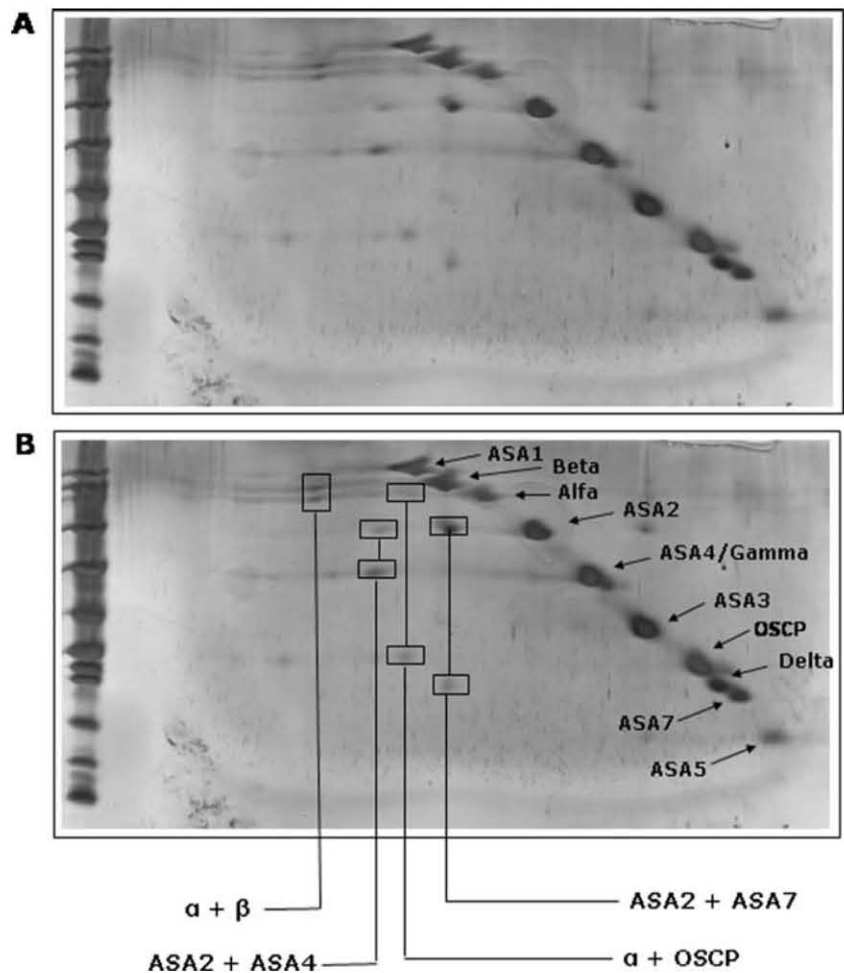
these preparation. (B) Two-dimensional resolution of the ATP synthase protein subcomplexes of samples obtained after different incubation times at 60 °C. (C) Amplification of a 2D-Tricine-SDS gel showing the subunit composition of the two main subcomplexes generated during heat dissociation. Lane 1 shows the 400 kDa F₁ subcomplex, lane 2 the 200 kDa subcomplex

gel system used (see Fig. 1B). In order to ascertain the fifth subunit identity, a 2D gel was run and then transferred to a PVDF membrane. The band of interest was subjected to N-terminal sequence analysis. The sequence SSVRD allowed the unambiguous identification of the fifth component of the 200 kDa subcomplex as subunit *a* (ATP6). We thus conclude that subunits [ASA1/ASA3/ASA5/ASA8/*a*/*c*₁₀] form a transient 200 kDa subcomplex during the dissociation process

of the enzyme at high temperatures. In contrast, subunits ASA2, ASA4, ASA6, ASA7 and ASA9 readily dissociated from the ATP synthase complex and migrated independently towards the front of the first dimension Blue Native gel.

To gain further insights into the vicinity and the possible interactions of subunits ASA1 to 9, purified *Polytomella* ATP synthase was incubated with the water-soluble,

Fig. 4 Second dimensional analysis of the *Polytomella* ATP synthase subunits cross-linked with DTSSP. *Polytomella* ATP synthase treated with the cross-linking agent was resolved in a Tricine-SDS gel in non-reducing conditions (100 μ g of protein). The 1D gel was then incubated in the presence of DTT to release the cross-linked products and subjected to 2D Tricine-SDS-PAGE and silver staining. Panel A shows the original 2D gel. Panel B shows the same gel, indicating the intact ATP synthase subunits that run on the diagonal. The identified cross-linked subunits, released upon DTT treatment and running out of the diagonal, are indicated by boxes and connecting lines



homobifunctional, thiol-cleavable reagent DTSSP (containing a spacer arm of 12 Å). The cross-link products were then released in the presence of DTT in order to analyze the resulting polypeptide pattern with 2D-Tricine-SDS gels. Other than the expected major cross-link product between subunits α and β , three additional interactions were revealed: ASA2 with ASA4, α with OSCP, and ASA2 with ASA7 (Fig. 4).

Discussion

In this work, we demonstrate that the eight novel subunits (ASA1 to 8), absent from the typical mitochondrial ATP synthase, are genuine components of the enzyme in at least three members of the chlorophycean lineage. In contrast, subunits A6L (ATP8), F6, IF₁, *b*, *d*, *e*, *f*, and *g* typical of ATP synthase, are absent from the three algal enzymes. Recently, the structures of two dimeric forms of the ATP synthase were obtained by EM studies. Beef heart dimeric ATP synthase purified from digitonin-solubilized mitochon-

dria showed associations between its monomers at the level of both the F₁ and F_o sectors, with a closer packing in the F_o-F_o interface (Minauro-Sanmiguel et al., 2005). In contrast, the dimeric ATP synthase of the alga *Polytomella* sp. exhibited two large, protruding arms that extend from the membrane to the upper regions of the F₁ moieties (Dudkina et al., 2005). Based on the results described here, the large structural differences observed between the beef and algal dimeric enzymes should be ascribed to the different polypeptides, other than the catalytic core [α_3/β_3], that constitute the fixed subunits of the enzyme [*a/b*/OSCP/A6L/F₆/*d/e/f/g*] in bovine, versus [*a*/OSCP/ASA1/ASA2/ASA3/ASA4/ASA5/ASA6/ASA7/ASA8/ASA9] in the alga. The different subunit compositions imply that the molecular mass of the algal fixed subunits (560.5 kDa) is twice that of the beef dimeric enzyme (272.1 kDa). The temperature-dissociation and cross-linking experiments carried out with the isolated *Polytomella* ATP synthase, reinforce the idea that some of the novel subunits are the building blocks of the stator-stalk, while others are involved in the dimerization of the complex. Upon incubation at high temperature for short periods of time, the enzyme

dissociated into its monomers and subsequently into two large subcomplexes: the 400 kDa F_1 moiety [$\alpha_3/\beta_3/\gamma/\delta$], and the 200 kDa subcomplex [ASA1/ASA3/ASA5/ASA8/ a/c_{10}]. In addition, subunits ϵ , ASA2, ASA4, OSCP, ASA6, ASA7, and ASA9 seem to dissociate independently. Nevertheless, cross-linking experiments suggest that subunits ASA2, ASA4, and ASA7 are in close proximity and may form their own subcomplex. Each of the two long protruding arms of the *Polytomella* ATP synthase was interpreted to be formed by the dimer-specific component MASAP (ASA1), and a classical peripheral stalk (Dudkina et al., 2005). However, we clearly demonstrate here that the classical peripheral stalk components are absent in chlorophycean algae. Therefore, the structure of the *Polytomella* ATP synthase dimer observed by EM must be reinterpreted. Most probably, the two F_0 moieties are held together through their a subunits by subcomplex [ASA1/ASA3/ASA5/ASA8], while the protruding arms formed by two [ASA2/ASA4/ASA7/OSCP] subcomplexes are the stator-stalks that stabilize the F_1 sectors (see models in Fig. 5).

The drastic modification in composition and architecture of a highly-conserved, universally-distributed energy transducing enzyme, that is found exclusively in a particular lineage of eukaryotes, is remarkable. For yet unknown evolutionary reasons, chlorophycean algae have recruited the eight novel polypeptides ASA1 to 8 to its mitochondrial ATP synthase complex, while keeping the orthodox, universal components in its catalytic core [α_3/β_3], in its rotary central-stalk [$c_{10}/\gamma/\delta/\epsilon$], and in the two subunits that are the binding sites for the peripheral stator-stalk (a and OSCP). Notably, subunit a and OSCP of the algae are the polypeptides that exhibit the least sequence similarity when compared with their higher plant counterparts (data not shown). Very likely, their sequences have been modified in order to efficiently interact with the new stator-stalk components (at least, with subunits ASA2, ASA4 and ASA7). Apparently, during the course of evolution, chlorophycean algae have designed a novel ATP synthase molecular motor, in which the peripheral stator-stalk is built with different components in a rather unique architecture, albeit the basic rotary and catalytic elements are conserved. This type of structural transformation in an oligomeric complex is, to our knowledge, without precedent in enzymology.

The dimeric nature of chlorophycean mitochondrial ATP synthase and mitochondrial cristae morphology

Mitochondrial dimeric F_1F_0 -ATP synthase of *C. reinhardtii* behaves as a highly-stable dimer, even when it is solubilized with relatively high concentrations of n-dodecyl- β -maltoside (van Lis et al., 2003). It requires incubation at high-temperature in order to dissociate. The presence of some of the novel subunits (like ASA1 and ASA3) seems

to be responsible for the extraordinary stability of the enzyme.

Eukaryotic organisms may be divided into three groups according to the morphology of their mitochondrial cristae: (i) discoidal as in trypanosomatids, (ii) flattened as in several fungi, and (iii) tubular as in photosynthetic organisms and in many protists (Gray et al., 1998). When dimerization of the yeast mitochondrial ATP synthase is abolished by deletion of the genes encoding the e and g subunits, the mutants exhibit mitochondria with altered cristae morphology (Arselin et al., 2004). Remarkably, the structures of the dimeric enzymes of both beef (Minauro-Sanmiguel et al., 2005) and *Polytomella* (Dudkina et al., 2005) show a sharp angle between the two F_0 sectors of each monomer, which is thought to induce a curvature in the inner membrane and thus contribute to mitochondrial cristae morphology. A recent EM study of ultrathin sections of *Polytomella* mitochondria indicated that ATP synthase seems to arrange in a helical fashion in the tubular-shaped cristae membranes of this colorless alga (Dudkina et al., 2006). With notable exceptions, mitochondrial ATP synthases from chlorophycean algae are “all nucleus-encoded” OXPHOS complexes.

In the majority of the mitochondrial DNAs (mtDNA) of the chlorophycean algae characterized to date – *Chlamydomonas eugametos* (Denovan-Wright and Lee, 1994) [AF008237], *Chlamydomonas reinhardtii* (Boer and Gray, 1988; Michaelis et al., 1990) [U03843], *Chlorogonium elongatum* (Kroymann and Zetsche, 1998) [Y07814, Y13643, and Y13643], and *Polytomella parva* (Fan and Lee, 2002) [AY062933, AY062934] – all genes encoding ATP synthase subunits (*atp* genes) are absent. However, there are two notable exceptions: the mtDNA of *Scenedesmus obliquus* (Kück et al., 2000; Nedelcu et al., 2000) [AF204057] has retained the genes *atp6* and *atp9*, and the mtDNA of *Pedinomonas minor* (Turmel et al., 1999) [AF116775] has retained *atp6* and *atp8*. Nevertheless, these two algae exhibit unique mitochondrial genetic codes, and are therefore thought to be evolutionary intermediates that interrupted prematurely the migration of mitochondrial genes to the nucleus, due to codon code incompatibilities (Kück et al., 2000; Nedelcu et al., 2000; Funes et al., 2002b). In addition, the *atp8* gene found in the *P. minor* mtDNA encodes an extremely small A6L subunit (of only 49 residues) as compared to the 134 residues or more in the rest of Viridiplantae (Gray et al., 1998); it is therefore a pseudogene, or a gene that expresses a truncated polypeptide. Aside from *S. obliquus* and *P. minor*, it may be assumed that the vast majority of the chlorophycean ATP synthases have become “all nucleus-encoded” H^+ translocating complexes. No other eukaryotic organism exhibits this remarkable property, except the apicomplexan parasites, which also lack all *atp* genes in their mtDNAs (Feagin, 2000), but whose mitochondrial ATP synthases remain to be characterized.

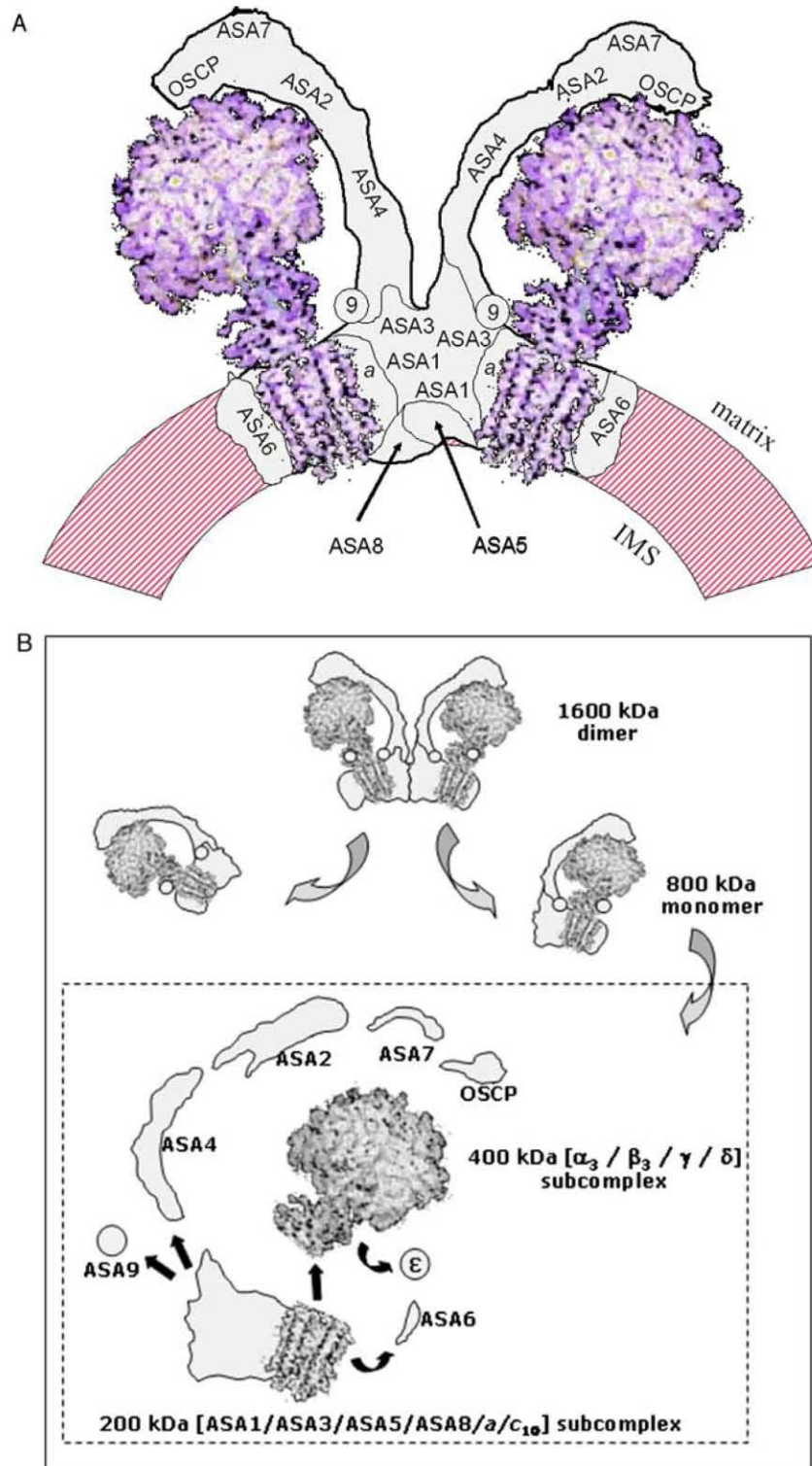


Fig. 5 Models for the arrangement of subunits in the mitochondrial *F1Fo*-ATP synthase of *Polytomella* sp. and for the dissociation of the complex after heat treatment. (A) Subunit arrangement of the dimeric algal mitochondrial ATP synthase. The model is based on the overall structure of the complex found in the EM study of Dudkina et al. (2005), and on the data obtained from the heat treatment dissociation assays and cross-linking experiments (this work). For illustration purposes, the F_1F_0 moiety comprising subunits [$\alpha_3/\beta_3/\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}$] corresponds to the yeast crystallographic model obtained by Stock et al. (1999). Subunit

ASA6 is shown as an integral membrane protein, since hydrophobic analysis suggests the presence of one transmembrane helix. Number 9 indicates subunit ASA9. Subunits ASA8 and ASA5 are shown located towards the intermembrane space (IMS), since both polypeptides lack a MTS, and are therefore potential candidates to be inserted through the IMS. (B) Model for the sequential dissociation of mitochondrial ATP synthase from *Polytomella* sp. The subunit composition of the two subcomplexes was inferred from the 2D gel patterns shown in Fig. 3

Concluding remarks

The loss of the subunits involved in the dimerization of the mitochondrial ATP synthase, the loss of its classical stator-stalk constituents, the appearance of the nucleus-encoded polypeptides ASA1 to 8, and the loss of the mitochondrial genes encoding ATP synthase components, are all characteristic of several chlorophycean algae. Therefore, it may be hypothesized that at some point in evolution eight novel polypeptides were recruited to the mitochondrial ATP synthase of these algae. The integration of these new constituents to the enzyme may have brought evolutionary advantages that eventually led to the loss of the genes encoding the original components of the complex (subunits *b*, *d*, *e*, *f*, *g*, F₆, F_Ad, IF₁ and A6L, or those that were actually present in the ancestor of the chlorophycean lineage). The evolutionary origin of the novel chlorophycean ATP synthase subunits ASA1 to 8 still remains obscure, as well as the way the corresponding genes were acquired: either by duplication of pre-existing genes or by horizontal gene transfer. Whatever their origin may be, these subunits are probably essential constituents of mitochondrial F₁F_o-ATP synthase in chlorophycean algae. To our knowledge, this is the only example of an oligomeric enzyme that has recruited new non-conserved subunits, thus largely modifying the structural features of its scaffold, while conserving almost intact the structure of its catalytic subunits. In addition, while the vast majority of mitochondrial ATP synthases are invariably encoded by both nuclear and organellar genomes, to date, the chlorophycean enzyme is a unique example of an “all nucleus-encoded” H⁺ translocating OXPHOS complex.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr. J. d’Alayer (Institut Pasteur) for his expert help in sequencing peptides. The authors are grateful Drs. G. Dreyfus, D. Georgellis and A. Gómez-Puyou (IFC, UNAM), to Dr. D. W. Krogmann (Purdue University), and to Dr. R. F. Matagne (University of Liège) for their critical comments on the manuscript. This research was supported by grants TW01176 from the Fogarty International Center at NIH (USA); HL59646 from NHLBI, NIH, (USA); 40696-Q from CONACyT (Mexico) IN218705-3 from DGAPA, UNAM (Mexico) and by grants from the Belgian FRFC (2.4587.04, 2.4582.05 and F.4735.06). P.C. is a postdoctoral researcher of the FNRS, Belgium. M.L. is a Fellow of FRIA, Belgium.

References

- Alfonzo M, Kandrach MA, Racker E (1981) *J Bioenerg Biomembr* 13:375–391
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) *J Mol Biol* 215:403–410
- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schägger H (1998) *EMBO J* 17:7170–7178
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J (2004) *J Biol Chem* 279:40392–40399
- Atteia A (1994) *C R Acad Sci III* 317:11–19
- Atteia A, Dreyfus G, González-Halphen D (1997) *Biochim Biophys Acta* 1320:275–284
- Boer PH, Gray MW (1988) *Curr Genet* 14: 583–590
- Bradford MM (1976) *Anal Biochem* 72:248–254
- Brunner S, Everard-Gigot V, Stuart RA (2002) *J Biol Chem* 277:48484–48489
- Cardol P, González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C (2005) *Plant Physiol* 137:447–459
- Denovan-Wright EM, Lee RW (1994) *J Mol Biol* 241:298–311
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005) *FEBS Lett* 579:5769–5772
- Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ (2006) *FEBS Lett* 580:3427–3432
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP (2004) *Plant Physiol* 134:1450–1459
- Fan J, Lee RW (2002) *Mol Biol Evol* 19:999–1007
- Feagin JE (2000) *Int J Parasitol* 30:371–390
- Franzén L-G, Falk G (1992) *Plant Mol Biol* 19:771–780
- Fronzes R, Weimann T, Vaillier J, Velours J, Brethes D (2006) *Biochemistry* 45:6715–6723
- Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D (2002a) *J Biol Chem* 277:6051–6058
- Funes S, Davidson E, Reyes-Prieto A, Magallon S, Herion P, King MP, González-Halphen D (2002b) *Science* 298:2155
- Gledhill JR, Walker JE (2005) *Biochem J* 386:591–598
- Gorman DS, Levine RP (1965) *Proc Natl Acad Sci (USA)* 54:1665–1669
- Golden TR, Pedersen PL (1998) *Biochemistry* 37:13871–13881
- Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y and Burger G (1998) *Nucleic Acids Res* 26:865–878
- Groth G, Walker JE (1996) *Biochem J* 318:351–357
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH (2004) *Plant Cell* 16:241–256
- Horvath A, Kingan TG, Maslov DA (2000) *J Biol Chem* 275:17160–17165
- Itoh H, Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K (2004) *Nature* 427:465–468
- Jänsch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (1996) *The Plant J* 9:357–368
- Ko YH, Hüllihnen J, Hong S, Pedersen PL (2000) *J Biol Chem* 275:32931–32939
- Kroymann J, Zetsche K (1998) *J Mol Evol* 47:431–440
- Kück U, Jekosch K, Holzamer P (2000) *Gene* 253:13–18
- Markwell MAK, Hass SM, Biber LL, Tolbert NE (1978) *Anal Biochem* 87:206–210
- Michaelis G, Vahrenholz C, Pratje E (1990) *Mol Gen Genet* 223:211–216
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García, JJ (2005) *Proc Natl Acad Sci (USA)* 102:12356–12358
- Nedelcu AM, Lee RW, Lemieux C, Gray MW, Burger G (2000) *Genome Res* 10:819–831
- Nurani G, Franzén, L-G (1996) *Plant Mol Biol* 6:1105–1116
- Schägger H (2002) *Biochim Biophys Acta* 1555:154–159
- Schägger H (1994) In *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*. In von Jagow G, Schägger H (eds) Academic Press, San Diego, pp. 59–166
- Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999) *Science* 286:1700–1705
- Turmel M, Lemieux C, Burger G, Lang BF, Otis C, Plante I, Gray MW (1999) *Plant Cell* 11:1717–1730
- van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D (2003) *Plant Physiol* 132:318–330
- van Lis R, González-Halphen D, Atteia A (2005) *Biochim Biophys Acta* 1708:23–34
- Walker JE, Dickson VK (2006) *Biochim Biophys Acta* 1757:286–296