



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EXPRESIÓN ALOTÓPICA DE LOS GENES
QUIMÉRICOS *atp6* Y *cox3* EN CÉLULAS
HUMANAS CON MUTACIONES EN EL
GENOMA MITOCONDRIAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
**FRANCISCO JAVIER FIGUEROA
MARTÍNEZ**

Tutor: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN



MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EXPRESIÓN ALOTÓPICA DE LOS GENES QUIMÉRICOS *atp6* y *cox3* EN CÉLULAS HUMANAS CON MUTACIONES EN EL GENOMA MITOCONDRIAL.

RECONOCIMIENTOS.

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen en el laboratorio 324 norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|---|---------------------------------------|
| Dr. Diego González Halphen | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra | Facultad de Química, UNAM |
| Dra. Marietta Tuena Sangri | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |

Se reconoce la colaboración del Dr. Michael P. King y del Dr. Edgar Davidson, del Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular de la Universidad Thomas Jefferson, en Filadelfia E.E.U.U., en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de transfecciones de las células mutantes en el gen *cox3* mitocondrial, así como las inmunotinciones de las proteínas expresadas alotópicamente.

Se reconoce la colaboración del Dr. José de Jesús García Trejo, del Departamento de Biología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de transfecciones de las células mutantes en el gen *atp6* mitocondrial, así como las mediciones de síntesis de ATP e inmunoprecipitación de la ATP sintasa.

Se reconoce la asesoría técnica de la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo en las técnicas de biología molecular y en los experimentos de importación *in vitro*.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Paulina Cortés Hernández para el mantenimiento de los cultivos celulares de los cíbridos mutantes en el gen *atp6*

RECONOCIMIENTOS

mitocondrial, así como en los experimentos de inmunoprecipitación y de síntesis de ATP.

Se reconoce la asesoría técnica de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su apoyo en la secuenciación de los diferentes genes, la síntesis de oligonucleótidos y el revelado de las autoradiografías de los experimentos de importación *in vitro*.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) a través del donativo 27754N, por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM, México) a través del donativo IN202598 y por el Fogarty Internacional Center (National Institutes of Health (NIH), USA) a través del donativo TW01176 (NHLBI, NIH, donativo HL59646)

Durante la realización de los estudios de doctorado se contó con una beca para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) con el número de registro 191084.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en Diciembre del 2010

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

| | |
|------------|---|
| Presidente | Dra. Marietta Tuena Sangri. |
| Vocal | Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann. |
| Secretario | Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco. |
| Suplente | Dra. Sobeida Sánchez Nieto. |
| Suplente | Dr. Alejandro Sosa Peinado. |

DEDICATORIA.

A mi abuelita Mode, mis recuerdos más felices de la infancia siempre la incluyen.

A mis hermanos Adriana, Luisa, José y Edher. Mi familia y mi gran apoyo.

A Fátí y Pau, que nos han traído una gran alegría a casa.

A mis tías y tíos, Mi familia más cercana que siempre me impulsaron a seguir adelante.

A mi tía Margarita y su familia. Me recibieron como en casa en otro país y siempre se preocuparon de cómo iba el trabajo.

Especialmente dedicada Mi madre. Siempre serás la primera persona a la que debo agradecer y a quien dedico todo mi trabajo. Muchas gracias por todo lo que has hecho por nosotros. La humanidad que siempre muestras con todos ha sido un gran ejemplo para mí.

AGRADECIMIENTOS.

Escribir agradecimientos es una de las cosas que más me cuesta trabajo, sin embargo es importante porque las personas que han estado junto a mi, tanto para el trabajo como en el plano personal, con el tiempo se convirtieron en mi segunda familia. Les agradezco a todos los que han estado acompañándome en este largo camino. Siempre es difícil numerar a todos y cada uno de ellos; trataré, pero les pido una disculpa si por mi torpeza olvido incluir a alguno...

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a:

La Universidad Nacional Autónoma de México. He sido parte de la comunidad universitaria por casi 15 años, y estoy orgulloso de serlo. Encontré aquí un mundo totalmente diferente al que conocía y me ha dado la oportunidad de unirme a él.

Mi tutor Diego González. Muchas gracias por haberme recibido en tu laboratorio, por guiarme en este proceso de aprendizaje, por presionar cuando hace falta, por enseñarme que aunque los resultados no sean los que se esperan siempre hay una parte rescatable. Sobre todo quiero agradecerte porque me has enseñado que ser un tutor va mucho más allá de lo académico.

Los Doctores Marieta Tuena Sangri y Francisco Javier Plascencia de la Parra, quienes fungieron como mi comité tutorial a lo largo de mis años de doctorado. Muchas gracias por sus comentarios críticos, por el tiempo que dedicaron a revisar mi proyecto, y por el apoyo para llevar todo esto a buen término.

Los integrantes del Jurado de tesis, los Doctores Marieta Tuena Sangri, Alejandro Fernández Velasco, María del Carmen Gómez Eichelmann, Sobeida Sánchez Nieto y Alejandro Sosa Peinado por su tiempo para revisar mi tesis y por sus valiosos comentarios que me ayudaron a mejorar el trabajo.

Miriam. Muchas gracias por tu amistad. Me he divertido mucho contigo trabajando, platicando, fuera del lab en las birrias y los pozoles o sólo molestando gente jejejeje.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Michael King por haberme recibido en su laboratorio en Filadelfia y por su ayuda en este difícil trabajo en el que nos embarcamos.

Paulina Cortés por su ayuda al inicio del doctorado, cuando fue mi maestra en las cosas relacionadas a los cultivos celulares y la ATPasa. Muchas gracias por el tiempo que invertiste en esto y por ser una buena amiga.

Los integrantes oficiales del 324N: Alain, Alejandra, Araceli, Valentín, Elizabeth, Héctor y Alexa; a los integrantes honorarios del labo Sergio y Luis; y a los miembros del labo que emprendieron su camino hace ya algunos años Lorena y Adelma. El trabajo en un lugar con tanta gente siempre es difícil, pero ustedes siempre han tenido la disposición de ayudar y de hacer un buen ambiente en el lab. Creo que soy afortunado de haber caído con ustedes.

Alexa, quiero agradecerte por todo el apoyo que me has dado, especialmente cuando he pasado por momentos personales muy duros. Tu alegría de vivir, tu disposición a ayudar y tu optimismo, aparentemente sin límites, me hacen ver la vida de otra manera. Gracias.

Los Ruys del lab 201 Ote, particularmente a Nallely Cabrera, y a Itzhel García quienes siempre están dispuestas a ayudar, por sus consejos de biología molecular y por su ayuda también con reactivos y equipo.

Cheli, a ti te agradezco profundamente todo lo que hemos compartido. Porque si no fuera por ti, yo no estaría aquí. Porque hemos compartido grandes alegrías y las más profundas tristezas. Porque no importa cuan enojados estemos, siempre estas dispuesta a ayudar y siempre te alegras de las cosas buenas que me pasan. Muchas gracias.

Los Mases del lab. 322N; especialmente a Chava y al Chore con quienes he compartido mucho: congresos, pláticas grilleras, pláticas científicas, alegrías y penas académicas y personales, además claro, porque siempre estuvieron dispuestos a compartir protocolos y reactivos. Les agradezco por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Mis amigos los Filadelfios, Edgar Davidson y Hyejeong Park quienes me recibieron en un país extraño y me hicieron sentir como en familia. Disfrute mucho su compañía, los partidos de Fútbol, las visitas al fado, y las deliciosas cenas.

Mis amigas del E de química, Ale Chinos y Marianita con quienes siempre es divertido ir a tomar un café y sólo charlar. Les agradezco por tratar de sonsacarme para perder el tiempo y olvidarse un poco de nuestras tareas diarias.

Mis amigas de la facu Gaby y Paty con quienes he convivido por largos años y siempre son una excelente compañía. Muchas gracias por siempre estar conmigo, dispuestas a hablar lo que sea y por sus malos consejos...sé que son una mala influencia pero así me caen bien.

Mi amiga Claudia, con quien me une una gran amistad. Aunque estés lejos y por mucho tiempo no nos vemos, sé que siempre estas pendiente de lo que me pasa y que te alegras por las cosas buenas que pasan en mi vida tanto como yo me alegro de las que pasan en la tuya.

A mis amigos Chore, Maggy, Susan, Oli y Pao Moreno...Sólo por ser mis amigos.

Muchas gracias de nuevo a todos ustedes..., y nuevamente una disculpa a los que omití sin querer.

Paco Figueroa.

ÍNDICE.

| | |
|--|-------------|
| RECONOCIMIENTOS. | II |
| DEDICATORIA. | IV |
| AGRADECIMIENTOS. | V |
| ÍNDICE. | VIII |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| ABREVIATURAS | 3 |
| INTRODUCCIÓN. | 6 |
| Las mitocondrias y sus funciones. | 6 |
| Origen de las mitocondrias. | 7 |
| Evolución del genoma mitocondrial. | 8 |
| Migración de los genes mitocondriales al núcleo. | 11 |
| Importación de proteínas a la mitocondria. | 12 |
| Fosforilación oxidativa. | 14 |
| Enfermedades de origen mitocondrial. | 16 |
| La ATP sintasa. | 17 |
| Citocromo <i>c</i> oxidasa. | 18 |
| Tratamiento de las enfermedades de origen mitocondrial. | 20 |
| Expresión alotópica. | 21 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como modelo natural de expresión alotópica. | 24 |
| Cíbridos como herramienta para el estudio de las enfermedades mitocondriales. | 27 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. | 29 |
| HIPÓTESIS. | 30 |
| OBJETIVOS. | 31 |
| Objetivo general. | 31 |
| Objetivos específicos. | 31 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| Clonación del gen <i>atp6</i> de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . | 32 |
| Construcción de los genes quiméricos de <i>atp6</i> (<i>A6Quim</i>) y de <i>cox3</i> (<i>Cox3-HA</i>). | 32 |
| Clonación de los genes <i>MTSA6-GFP</i> y <i>GFP</i> . | 35 |
| Cultivos celulares. | 35 |
| Transfecciones. | 36 |
| Microscopía de fluorescencia. | 38 |
| Aislamiento de mitocondrias a partir de células en cultivo. | 39 |
| Choque osmótico a mitocondrias. | 40 |
| Determinación de proteína método de Lowry. | 40 |

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Ensayo de síntesis de ATP. _____ | 41 |
| Acoplamiento del anticuerpo 12F4AD8 a esferas de agarosa. _____ | 42 |
| Inmunoprecipitación. _____ | 43 |
| Aislamiento de mitocondrias de rata. _____ | 44 |
| Determinación de proteínas por la reacción de Biuret. _____ | 45 |
| Síntesis de proteínas radioactivas <i>in vitro</i> . _____ | 45 |
| Importación <i>in vitro</i> . _____ | 46 |
| RESULTADOS. _____ | 48 |
| Clonación del gen ATP6 de <i>C. reinhardtii</i> y diseño de las proteínas quiméricas. _____ | 48 |
| ¿Reconoce el sistema de importación mitocondrial de mamífero las secuencias MTS del alga? ____ | 52 |
| Ensayos de transfección con proteína ATP6 del alga (A6Cr-HA) y la proteína quimérica de ATP6 (A6Quim-HA). _____ | 55 |
| Ensayos de transfección de la proteína COX3 quimérica. _____ | 59 |
| Importación <i>In vitro</i> . _____ | 62 |
| DISCUSIÓN. _____ | 65 |
| CONCLUSIONES. _____ | 72 |
| PERSPECTIVAS. _____ | 74 |
| REFERENCIAS. _____ | 76 |
| ANEXO. ARTÍCULOS PUBLICADOS. _____ | 82 |

RESUMEN

Se han reportado más de 150 mutaciones en el DNA mitocondrial relacionadas con enfermedades en humanos, las cuales generalmente afectan en mayor proporción a órganos de alta demanda energética (como el cerebro y el corazón). Como una alternativa de terapia génica para las enfermedades ocasionadas por mutaciones en el DNA mitocondrial se ha propuesto colocar una copia silvestre del gen mitocondrial afectado en el núcleo celular, y posteriormente dirigir el producto génico al interior de las mitocondrias. Ésta estrategia se denomina expresión alotópica.

En este trabajo, exploramos la expresión alotópica de las proteínas humanas ATP6 (subunidad *a* del complejo V) y COX3 (subunidad III del complejo IV) que fueron rediseñadas para su importación al interior de la mitocondria. Para ello tomamos como modelo a las proteínas ATP6 y COX3 del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, las cuales son codificadas de manera natural en el genoma nuclear. Las proteínas del alga presentan largas presecuencias de direccionamiento a mitocondria que van desde 100 a 140 residuos de aminoácidos y una menor hidrofobicidad media en comparación con sus contrapartes codificadas en el genoma mitocondrial.

Los resultados *in vivo* e *in vitro* de experimentos de expresión alotópica en líneas celulares humanas con mutaciones homoplásmicas en su genoma mitocondrial, ya sea la mutación T8993G en el gen *atp6* o la ablación de 15 pares de bases en el gen *cox3*, sugieren que las proteínas humanas rediseñadas para su expresión nuclear se dirigen a la mitocondria, pero no se integran funcionalmente en sus complejos correspondientes.

ABSTRACT

More than 150 mutations in the mitochondrial DNA have been related to human diseases, affecting mainly organs with high energetic demand (like brain and heart). One potential option for the gene therapy of mtDNA-related diseases is to transfer the wild type copy of the affected gene to the nuclear genome, and to direct the resulting protein to the mitochondria. This strategy is called allotopic expression.

In this work, we explored the allotopic expression of the human gene products ATP6 (subunit *a* of complex V) and COX3 (subunit III of complex IV) that were re-designed for mitochondrial import by emulating the structural properties of ATP6 and COX3 proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In this alga, some OXPHOS proteins like ATP6 and COX3 that are typically mtDNA-encoded, are naturally nucleus-encoded. The algal proteins exhibit long mitochondrial targeting sequences ranging from 100 to 140 residues and a diminished overall mean hydrophobicity when compared with their mtDNA-encoded counterparts.

In vivo and *in vitro* data in homoplasmic human mutant cells carrying either a T8993G mutation in the mitochondrial *atp6* gene or a 15 bp deletion in the mtDNA-encoded *cox3* gene suggest that these human mitochondrial proteins re-designed for nuclear expression are targeted to the mitochondria, but fail to functionally integrate into their corresponding OXPHOS complexes.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| A6Cr | Proteína ATP6 de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . |
| A6Quim | Proteína ATP6 quimérica. |
| ADN | Ácido desoxirribonucléico. |
| ADNmt | Ácido desoxirribonucléico mitocondrial. |
| ADP | Adenosin difosfato. |
| ALDH | Aldehído deshidrogenasa. |
| ATP | Adenosin trifosfato. |
| ATP6 | Subunidad 6 ó a de la ATP sintasa. |
| ATP8 | Subunidad 8 ó A6L de la ATP sintasa. |
| ATP9 | Subunidad c de la ATP sintasa. |
| Células CHO | Células de ovario de hámster chino. |
| Células Rho0 | Células que carecen de DNA mitocondrial. |
| COX | Citocromo c oxidasa. |
| COX1 | Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa. |
| COX2 | Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa. |
| COX3 | Subunidad 3 de la citocromo c oxidasa. |
| DMEM | Siglas en inglés de la modificación de Dulbecco del medio de cultivo de Eagle (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). |
| DMSO | Dimetil sulfóxido. |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético. |
| EGFP | Siglas en inglés para la proteína verde fluorescente. |
| EGTA | Ácido glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético. |
| EIM | Espacio Intermembranal. |
| EST | Siglas en inglés para marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag). |
| FBS | Siglas en inglés para suero fetal bovino. |
| Fc | Fracción constante de las inmunoglobulinas. |
| HA | Hemaglutinina del virus de la influenza humana. |
| IgG | Inmunoglobulina G. |
| Met S ³⁵ | Metionina marcada radiactivamente con azufre 35. |
| MIA | Siglas en Inglés para la vía de Importación y ensamblaje de proteínas al espacio intermembranal mitocondrial. |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| MILS | Siglas en inglés para el síndrome de Leigh heredado por vía materna. |
| MMP | Metaloproteasa de la Matriz Mitocondrial. |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero. |
| MTS | Siglas en inglés para secuencia de direccionamiento a mitocondria. |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenin dinucleótido oxidado. |
| NAD7 | Subunidad 7 del complejo I o la NADH deshidrogenasa. |
| NADH | Nicotinamida adenin dinucleótido reducido. |
| NADP ⁺ | Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato oxidado. |
| NADPH | Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido. |
| NARP | Neuropatía ataxia y retinitis pigmentosa. |
| OSCP | Siglas en inglés de la subunidad de la ATP sintasa que confiere sensibilidad a la oligomicina. |
| PAM | Siglas en inglés para Motor de importación Asociado a Translocasas para proteínas con Presecuencias. |
| PBS | Siglas en inglés del amortiguador de fosfatos (Phosphate Buffered Saline). |
| PCR | Siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa. |
| Pi | Fosfato inorgánico. |
| PMSF | Fenilmetanosulfonil fluoruro. |
| PVDF | Polivinilideno fluoruro. |
| RNA | Ácido ribonucleico. |
| rRNA | Ácido ribonucleico ribosomal. |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio. |
| SDS-PAGE | Siglas en inglés de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. |
| SOD2 | Superóxido dismutasa mitocondrial. |
| TCA | Ácido Tricloroacético. |
| TIM | Siglas en inglés para la translocasa de la membrana interna. |
| Tim | Subunidades del complejo TIM. |
| TOB/SAM | Siglas en inglés para maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM) también conocida como translocasa de la membrana externa para proteínas con barriles beta (TOB). Parte de la maquinaria de importación de proteínas. |
| TOM | Siglas en inglés para la translocasa de la membrana externa. |

ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| Tom | Subunidades del complejo TOM. |
| tRNA | Ácido ribonucleico de transferencia. |
| UTR | Siglas en inglés para regiones no traducidas del mRNA. |

INTRODUCCIÓN.

Las mitocondrias y sus funciones.

Las mitocondrias son organelos presentes en la mayor parte de los organismos eucariontes, que han sido descritas como estructuras de forma ovalada localizadas en el citosol de entre 0.5 y 10 μm (Figura 1), las cuales presentan dos compartimentos (la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal) delimitados por un par de membranas (membrana externa y membrana interna) con diferente composición lipídica y por lo tanto con diferentes propiedades de permeabilidad. La membrana interna además presenta múltiples invaginaciones incrementando así su superficie y formando lo que se denomina crestas mitocondriales en donde se alojan los complejos y supercomplejos proteicos que llevan a cabo la fosforilación oxidativa. Actualmente se prefiere hablar de una red de mitocondrias sin dimensiones definidas, cuya morfología es determinada por eventos de fisión y fusión mitocondrial. Las mitocondrias poseen además varias copias de un genoma propio (DNA_{mt}) y cuentan con los mecanismos para la replicación de éste, así como para la transcripción y la síntesis de un conjunto limitado de proteínas que están codificadas en dicho genoma.

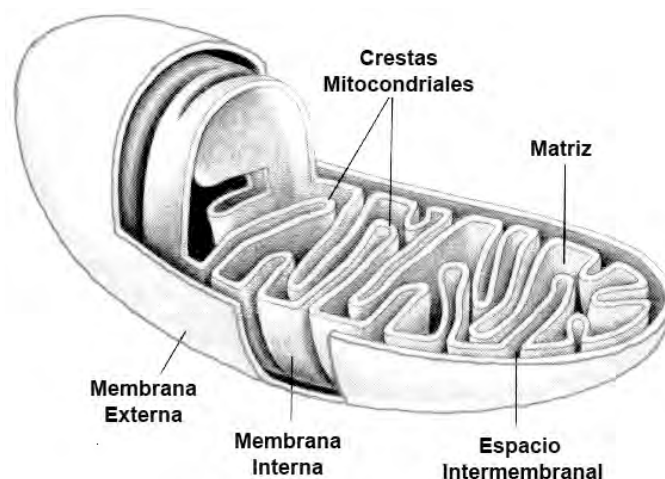


Figura 1. Diagrama esquemático de las mitocondrias.

Tradicionalmente se ha llamado a la mitocondria la “planta energética” de la célula, pues su función principal es la de proporcionar la mayor parte de la energía celular en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, esta es una visión incompleta, ya que en su interior se llevan a cabo diversas reacciones del metabolismo

intermediario como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la beta oxidación, participa también en la síntesis de ácidos grasos y del colesterol, y se le ha implicado en procesos como la regulación del metabolismo, control del ciclo celular, desarrollo, respuesta antiviral, envejecimiento y muerte celular (McBride *et al.* 2006).

Origen de las mitocondrias.

La teoría más aceptada acerca del origen de las mitocondrias es conocida como la teoría de la endosimbiosis (Margulis 1970), sin embargo hay un gran debate respecto a quienes fueron los organismos participantes en el proceso de endosimbiosis, y las causas o la presión evolutiva que llevaron a perpetuar esta relación o dependencia. A través del estudio de los genes mitocondriales (especialmente los que codifican para los RNA's ribosomales) y su filogenia, se ha determinado que el organismo huésped fue una α -proteobacteria muy probablemente perteneciente al género de los riketsiales. Sin embargo, hay mayores discrepancias con respecto a la naturaleza del organismo hospedero, si fue una eubacteria, una arquea, o una tercera entidad pre-carionte con características intermedias entre las eubacterias y las arqueas, incluso un eucarionte amitocondriado (Vesteg y Krajcovic 2008).

Existen varias hipótesis que tratan de explicar el origen de la mitocondria y la identidad de los organismos participantes, entre las más conocidas están la hipótesis de la sintrofia (Moreira y López-García 1998), la hipótesis del hidrógeno (Martin y Muller 1998), y la del eucarionte amitocondriado (Cavalier-Smith 2002). La hipótesis de la sintrofia plantea que el origen de las mitocondrias se llevó a cabo en dos pasos: primero la fusión de una arquea metanogénica con una δ -proteobacteria (una mixobacteria reductora de sulfatos) dando como resultado, gracias a la simbiosis metabólica o sintrofia, un eucarionte sin mitocondria. Posteriormente, la fusión de este híbrido con una α -proteobacteria dio origen a las mitocondrias. Otra hipótesis propuesta establece que el ancestro de la mitocondria fue una α -proteobacteria predadora que parasitó un organismo pre-carionte de doble membrana estableciéndose en el espacio intermembranal (Moreira y López-García 1998), un fenómeno similar al que puede observarse en la actualidad con el parásito *Bdellovibrio sp.*, que parasita bacterias Gram negativas (Saier 1994). La respuesta del organismo hospedero contra la invasión fue clave para el establecimiento de los eucariontes, pues incluyó la remodelación completa de su membrana interna,

INTRODUCCIÓN

dando origen a la envoltura nuclear y al retículo endoplásmico, mientras que la membrana externa se convirtió en la membrana plasmática; la relocalización de los ribosomas en el espacio intermembranal, dando origen al citosol; y la inserción de una translocasa ADP/ATP en el huésped bacteriano, el cual finalmente dio origen a la mitocondria (Moreira y López-García 1998).

Existe también la teoría del hidrógeno, que sugiere la asociación entre una α -proteobacteria anaeróbica facultativa que generaba hidrógeno y dióxido de carbono como productos de desecho y una arquea metanógena anaeróbica estricta que dependía del hidrógeno para sobrevivir. Esto pudo haber representado una presión evolutiva para el establecimiento de la endosimbiosis. Es importante resaltar que esta hipótesis propone la aparición simultánea del ancestro de los eucariontes actuales y de su mitocondria (Martin y Muller 1998).

Finalmente, existe la teoría del protoeucarionte amitocondriado. Esta postula que el organismo huésped no podría ser una arquea dado que estos organismos no tienen capacidad de fagocitosis, y que algunas de las similitudes entre arqueas y eucariontes se deben a que son linajes hermanos con un ancestro en común. Por lo tanto, el organismo hospedero de la α -proteobacteria que daría origen a la mitocondria, era ya un eucarionte con algunas de las características propias de este linaje, tales como poseer la maquinaria para realizar la fagocitosis y probablemente un sistema de endomembranas que forman el retículo endoplásmico y el núcleo. De esta manera, el eucarionte fagocitó a la α -proteobacteria, y esta logró evitar la digestión del predador en la forma en la que algunas bacterias logran evadir la lisis en el interior de amibas o de macrófagos, llegando con el tiempo a establecer la endosimbiosis (Cavalier-Smith 2002).

Evolución del genoma mitocondrial.

Aún cuando se cree que todas las mitocondrias provienen de un ancestro común, ya que se piensa que la endosimbiosis ocurrió una sola vez en la evolución, los genomas mitocondriales de los diferentes organismos han sido sometidos a un proceso de reducción, por lo que son muy variados en tamaño y complejidad génica. Existen genomas mitocondriales circulares y lineales, con un tamaño variable desde 6 Kb en *Plasmodium falciparum* (Feagin 2000) hasta más de 2000 Kb en algunas plantas (Stern y Newton 1985). Las diferencias principales en el tamaño de los genomas mitocondriales

INTRODUCCIÓN

están relacionadas mas bien con las regiones intergénicas no codificantes que con el contenido de sus genes estructurales. Es notable sin embargo, que prácticamente todos los genomas mitocondriales presentan genes que codifican para los RNA ribosomales, RNA's de transferencia y un conjunto limitado de subunidades proteicas que forman parte de los complejos membranales que participan en la fosforilación oxidativa (Gray *et al.* 1999).

Respecto a la complejidad génica, existen también enormes variaciones en cuanto al número de genes funcionales que contienen los genomas mitocondriales de diferentes especies. El DNA mitocondrial con mayor número de genes funcionales se encuentra en el protista *Reclinomonas americana* (Lang *et al.* 1997), se trata de un genoma de 69 Kb, el cual codifica para 24 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa, y 38 proteínas que tienen funciones en la transcripción, traducción, importación y maduración de proteínas. Además, confirmando su origen endosimbiótico, la organización y disposición de los genes de *Reclinomonas* es muy parecida al genoma bacteriano de los *Rickettsiales* (Lang *et al.* 1999). En contraste, el genoma mitocondrial de *Plasmodium falciparum*, que ya mencionamos es el más pequeño en tamaño, sólo contiene tres genes que codifican para los componentes de la cadena respiratoria: el citocromo *b* y *a* las subunidades 1 y 3 de la citocromo *c* oxidasa. En la figura 2 se observa un diagrama de Venn en donde se muestran los genes más conservados en algunos genomas mitocondriales representativos.

Por su parte, el DNA mitocondrial humano es un DNA circular de doble cadena de 16.8 kb que codifica para 13 proteínas que forman parte de los complejos de la fosforilación oxidativa: 7 subunidades del complejo I (ND), tres subunidades de la citocromo *c* oxidasa (COX), el citocromo *b* del complejo III (Cyt *b*) y dos subunidades de la ATP sintasa (A6 y A8). También codifica para los RNA ribosomales 12S y 16S (que se muestran en verde en la figura 3) y 22 RNA's de transferencia (señaladas en azul oscuro).

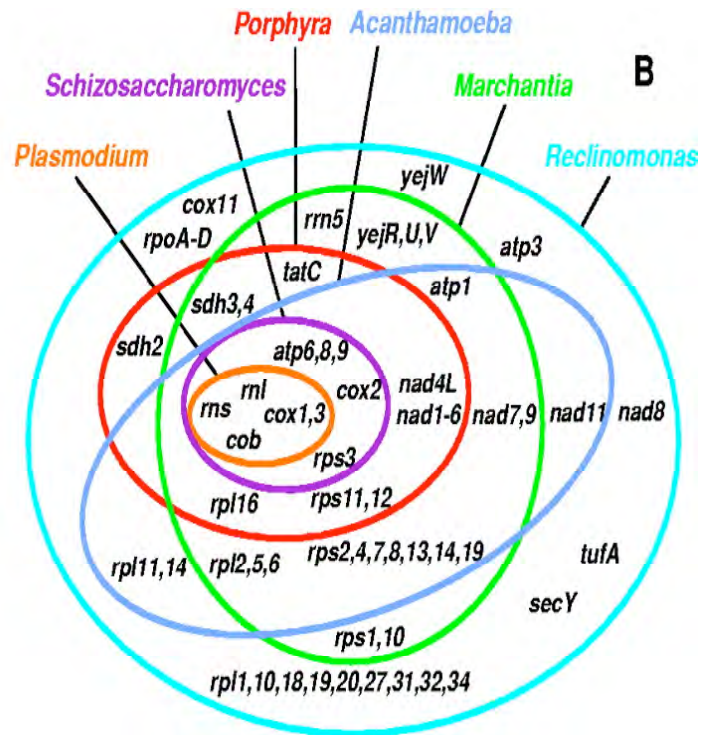


Figura 2. Diagrama de Venn que muestra la distribución de los genes mitocondriales en diferentes organismos. Los genes *cob*, *cox1*, *cox3*, se encuentran conservados en el genoma mitocondrial de todos los organismos (tomado de Gray *et al.* 1999).

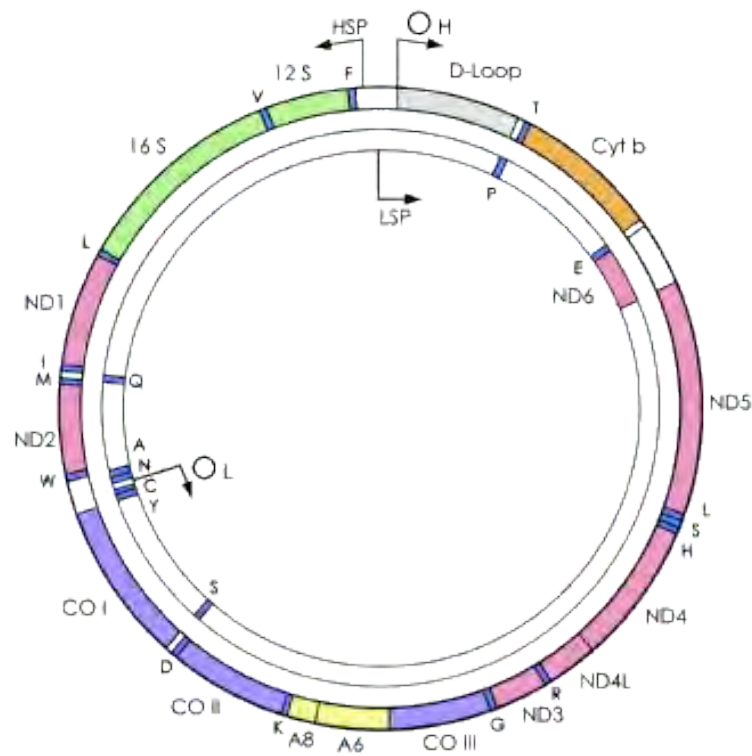


Figura 3. Representación esquemática del DNA mitocondrial humano (tomado de DiMauro *et al.* 2006).

Migración de los genes mitocondriales al núcleo.

La diferencia en el contenido génico entre los genomas mitocondriales y los genomas bacterianos es resultado de la reducción progresiva del genoma mitocondrial, ocasionado principalmente por dos razones: por un lado la eliminación de genes redundantes (presentes en el hospedero y en el huésped) y por otro lado, la migración masiva de los genes originalmente del endosimbionte al núcleo del hospedero.

La migración de genes de la mitocondria al núcleo es un proceso complejo que puede ser dividido en varias etapas: primero el material genético (DNA o RNA) debe atravesar las membranas mitocondriales y entrar al núcleo, posteriormente, estas secuencias deben integrarse al genoma nuclear y adquirir elementos regulatorios y de expresión nucleares, así como adquirir una presecuencia de direccionamiento a la mitocondria. Durante un tiempo, ambas copias del gen coexisten en ambos compartimentos celulares y son funcionales, y finalmente una de las copias es inactivada y eventualmente eliminada (Brennicke *et al.* 1993; Blanchard y Schmidt 1996)

La reducción de los genomas mitocondriales por migración de genes mitocondriales al núcleo es un proceso que aún se encuentra activo, y la mejor evidencia de esto es que existen organismos que poseen genes que codifican para la misma proteína tanto en el genoma mitocondrial como en el genoma nuclear, como es el caso de la subunidad ATP9 de la ATP sintasa en *Neurospora crassa* (Bittner-Eddy *et al.* 1994), o la subunidad COX2 en plantas leguminosas, en donde se ha reportado que tanto la copia nuclear como la mitocondrial del gen *cox2* son transcritos y editados (Adams *et al.* 1999). Además, en este mismo grupo de plantas se pueden encontrar ejemplos de pasos intermedios en el proceso de migración del gen *cox2* al núcleo, como el caso del chícharo, en donde coexisten la copia nuclear con la mitocondrial, pero el gen nuclear no es funcional. En contraste en la soya, es el gen mitocondrial el que no se transcribe aún cuando se encuentra intacto, mientras que el gen nuclear sí es transcrito. En el género *Dumasia* ambas copias son funcionales y en el frijol mungo, la copia mitocondrial presenta varias mutaciones que lo convierten en un pseudogen, mientras que la copia nuclear es transcrita e importada a la mitocondria (Adams *et al.* 1999). Algo similar ocurre con el gen *rpl2* (proteína ribosomal 12) en plantas angiospermas, en las cuales se puede encontrar el gen en cuatro diferentes formas: el gen mitocondrial activo, el gen funcional en el genoma nuclear, el gen fragmentado en dos regiones, la región 5' se encuentra en la

mitocondria y la región 3' en el genoma nuclear, o el gen fragmentado con ambos fragmentos en el genoma nuclear (Adams *et al.* 2001).

Importación de proteínas a la mitocondria.

Dado lo reducido del contenido génico de los genomas mitocondriales, la mayor parte de las proteínas que se encuentran en la mitocondria son codificadas en el genoma nuclear y sintetizadas en el citosol, por lo que posteriormente deben ser importadas al interior de la mitocondria a través de los complejos translocadores localizados en la membrana externa y en la membrana interna mitocondrial (Wickner y Schekman 2005).

Las proteínas que son direccionadas a un organelo en particular presentan una secuencia señal que es reconocida por otras proteínas presentes en el organelo y posteriormente son translocadas. En el caso de las proteínas mitocondriales, las señales de direccionamiento pueden estar localizadas en el extremo amino terminal o bien ser señales internas en el polipéptido.

Las señales internas generalmente están presentes en proteínas cuyo destino final es el espacio intermembranal o la membrana interna mitocondrial, no están bien caracterizadas y no se sabe si los aminoácidos que las forman están conservados, pues no necesariamente se encuentran adyacentes unos con otros.

Las secuencias señal en el extremo amino terminal pueden a su vez, ser de dos tipos: las proteínas hidrofóbicas cuyo destino final es la membrana externa mitocondrial poseen lo que se llama la señal- β , dado que estas proteínas por lo general son barriles- β , mientras que proteínas solubles destinadas a la matriz mitocondrial, o proteínas con alfa-hélices que son integradas en la membrana interna, presentan una región amino terminal denominada presecuencia de direccionamiento a mitocondria o MTS por sus siglas en inglés (Mitochondrial Target Sequence). La MTS es una región de entre 20 y 40 aminoácidos generalmente, cuya secuencia primaria no está conservada pero que tiene una estructura de alfa hélice anfipática. Por una cara la hélice presenta residuos de aminoácidos hidrofóbicos y en la cara polar se encuentran una serie de aminoácidos cargados positivamente.

El mecanismo de importación de proteínas se resume en la figura 4. Las proteínas sintetizadas en el citosol interactúan con proteínas chaperonas que las mantienen en estado desplegado, e impiden su agregación en el citosol. Posteriormente la presecuencia

INTRODUCCIÓN

de direccionamiento o la señal interna de la proteína interactúan con el complejo de la Translocasa de la Membrana Externa (TOM por sus siglas en inglés). Prácticamente todas las proteínas que son dirigidas a la mitocondria pasan a través de este complejo. A partir de este punto, las proteínas se distribuyen a uno de los 4 posibles subcompartimentos mitocondriales: la membrana externa, la membrana interna, la matriz o el espacio intermembranal.

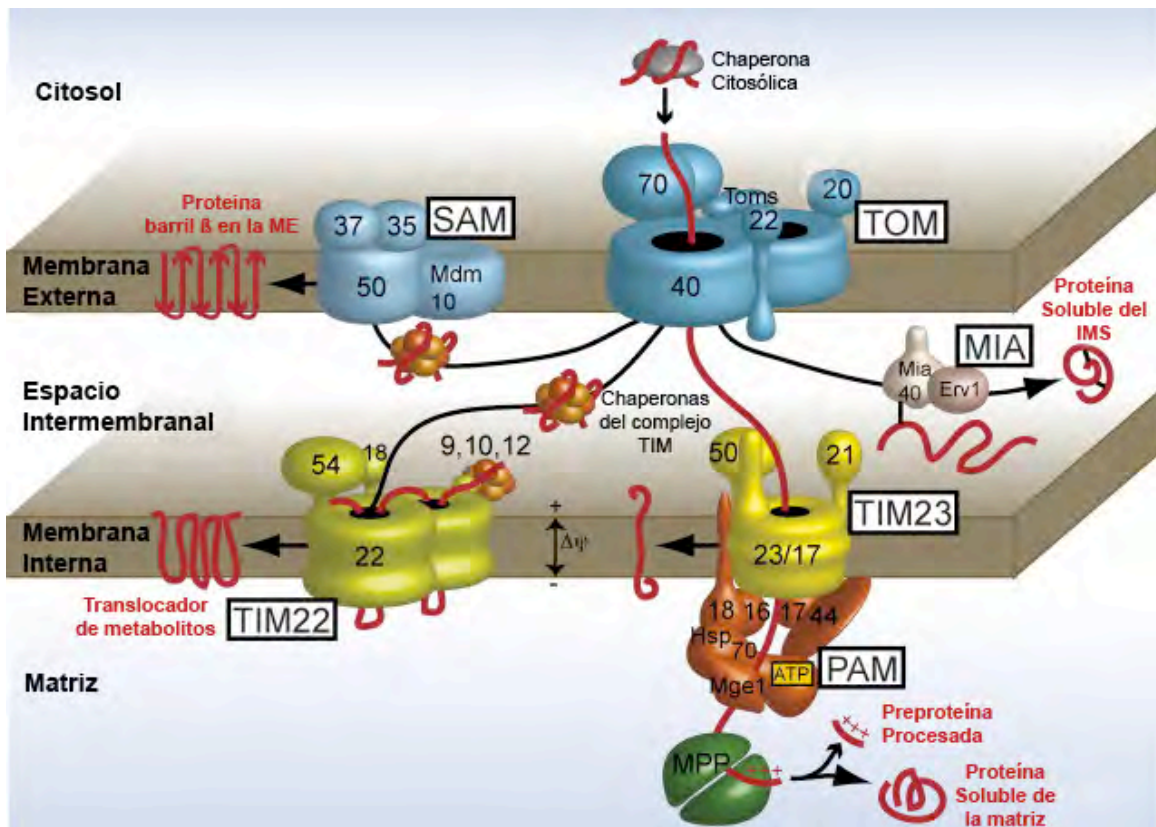


Figura 4. Diagrama esquemático de los mecanismos de importación de proteínas en la mitocondria. (modificado de Bohnert *et al.* 2007).

Si la proteína que está siendo translocada es una proteína altamente hidrofóbica, se une a la proteína el complejo de chaperonas de TIM (Translocase of the Inner Membrane) para evitar que se agregue antes de alcanzar su destino final. Las proteínas que tienen estructura de barriles β son incorporadas a la membrana externa a través del complejo SAM (Sorting and Assembly Machinery), mientras que las proteínas que tienen como destino final el espacio intermembranal y que tienen motivos ricos en cisteínas requieren seguir la vía MIA (Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, en la membrana interna mitocondrial hay un par de complejos especializados en la translocación de proteínas, hacia la matriz o hacia la membrana interna mitocondrial, denominados complejos TIM (Translocase of the Inner Membrane). Las proteínas que tienen una MTS editable en el extremo amino terminal se transfieren directamente desde el complejo TOM al complejo TIM23. Estas proteínas pueden entonces ser liberadas de manera lateral en la membrana interna en respuesta a una secuencia de paro hidrofóbica río arriba de la MTS o importadas hasta la matriz mitocondrial. Es importante mencionar que la translocación a través de la membrana interna es totalmente dependiente de la fuerza protón-motriz derivada de la cadena respiratoria, y que las proteínas requieren además de la asociación ATP dependiente del Motor Asociado a la Translocasa (PAM) en el lado matricial del complejo TIM23. El principal componente del complejo PAM es la chaperona Hsp70 mitocondrial (Hsp70m). Finalmente, las proteínas con múltiples secuencias internas, como los translocadores de metabolitos, son transferidos del complejo TOM al complejo TIM22, el cual integra la proteína de manera lateral en la membrana interna de la mitocondria (Bohnert *et al.* 2007).

Fosforilación oxidativa.

La mayor cantidad de ATP que se produce en una célula eucarionte no fotosintética es sintetizada en la mitocondria a través de un proceso denominado fosforilación oxidativa, en la cual se acopla la oxidación de sustratos como el NADH, el succinato y el FADH₂ a través de la cadena respiratoria con la síntesis de ATP por la ATP sintasa. El proceso se encuentra esquematizado en la figura 5.

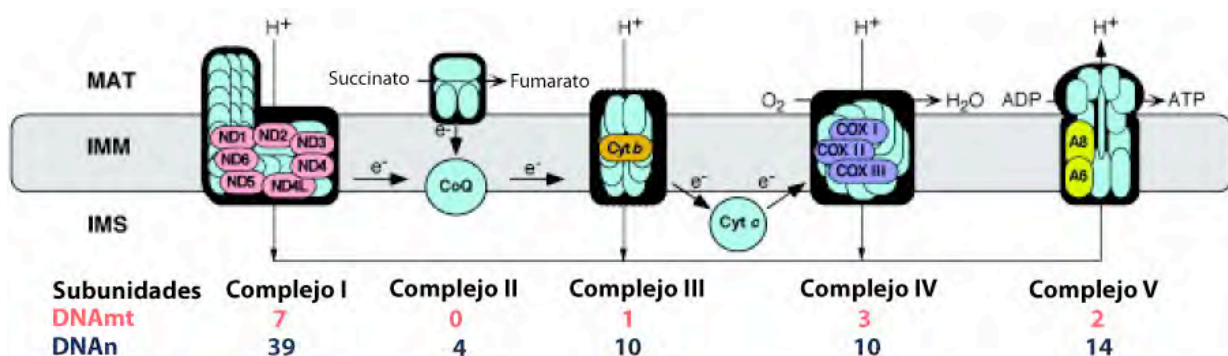


Figura 5. Diagrama esquemático del mecanismo de la fosforilación oxidativa. Las subunidades representadas en azul son codificadas en el DNA nuclear, mientras que las subunidades codificadas en el genoma mitocondrial se muestran en varios colores. Sólo el complejo II está totalmente codificado en el genoma nuclear (tomado de DiMauro *et al.* 2006).

INTRODUCCIÓN

La oxidación de los sustratos se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial (IMM), mediante cuatro complejos enzimáticos multiméricos que se encuentran embebidos en ésta y que tienen grupos prostéticos capaces de llevar a cabo reacciones redox. De esta forma, se transfieren electrones secuencialmente entre los diferentes complejos a partir de los sustratos reductores NADH, el succinato y el FADH₂, hasta el oxígeno molecular. Con excepción del complejo II, los demás complejos translocan protones desde la matriz mitocondrial (MAT en la figura 5) hacia el espacio intermembranal (IMS), los cuales forman un gradiente electroquímico que es utilizado para la síntesis de ATP por la ATP sintasa o complejo V.

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

El complejo I, también llamado NADH: ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa transfiere dos electrones del NADH hacia la ubiquinona y simultáneamente transporta cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembranal. El complejo I en mamíferos posee entre 38 y 43 subunidades, mientras que en las bacterias sólo cuenta con 13 subunidades.

El complejo II o succinato deshidrogenasa cataliza la transferencia de electrones del succinato a la poza de quinonas. Esta enzima cuenta con cuatro subunidades de las cuales dos son hidrofílicas y dos son membranales y todas ellas son codificadas en el genoma nuclear.

El complejo III, ubiquinona: citocromo *c* oxidoreductasa o complejo bc₁ lleva a cabo la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH₂) al citocromo *c* acoplado con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembranal. La enzima mitocondrial cuenta con once subunidades, de las cuales sólo el citocromo *b* es codificado en el genoma mitocondrial en todos los organismos eucariontes.

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa transporta electrones desde el citocromo *c* al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua. El complejo VI posee en mamíferos trece subunidades de las cuales COX1, COX2 y COX3 son codificadas en el genoma mitocondrial. En bacterias está presente una forma más sencilla, con sólo tres o cuatro subunidades.

Finalmente, el complejo V o la ATP sintasa utiliza el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte de electrones para formar ATP a partir del ADP y fosfato inorgánico. En el caso de la F₁F₀ ATP sintasa mitocondrial de mamíferos, sólo las subunidades 6 y A6L están codificadas en el genoma mitocondrial.

Enfermedades de origen mitocondrial.

Se han descrito un grupo de enfermedades humanas producidas por un fallo en el sistema de la fosforilación oxidativa, con la consiguiente deficiencia en la biosíntesis de ATP. Estas enfermedades pueden ser consecuencias de mutaciones tanto en el DNA mitocondrial (DNAMt), como en el DNA nuclear (Solano 2001). Hasta la fecha se han reportado más de 100 mutaciones puntuales y varias ablaciones y duplicaciones que involucran regiones relativamente grandes del DNAMt (DiMauro y Andreu 2000).

Las enfermedades mitocondriales son heterogéneas y frecuentemente multisistémicas y afectan principalmente a tejidos con alta demanda energética como el cerebro, el músculo y el sistema endocrino, aunque cualquier órgano puede verse afectado. En consecuencia, las alteraciones energéticas han sido implicadas en ceguera, debilidad muscular, demencia, intolerancia progresiva al ejercicio, miopatías, encefalopatías, disfunción renal e incluso se han relacionado con desórdenes metabólicos como la diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular y cáncer.

Cada mitocondria contiene múltiples copias de su genoma, y las mutaciones en el DNA mitocondrial pueden ser homoplásmicas, cuando el 100% de las copias de DNAMt tienen la mutación, o heteroplásmicas si solo una proporción del DNAMt es mutante. Es necesario que la proporción de DNA mutante sobrepase un umbral crítico antes de que puedan observarse defectos bioquímicos o que se observe una disfunción en un determinado tejido. El umbral varía para diferentes mutaciones e incluso para una misma mutación en diferentes tejidos, siendo más bajo para los tejidos más dependientes del metabolismo oxidativo. Típicamente el umbral varía entre 60% y 90% de DNAMt mutante con respecto al silvestre. La severidad de los trastornos ocasionados por mutaciones en el DNAMt está directamente relacionada con la proporción del DNA mutante presente en un organismo o en un órgano en particular.

De nuestro particular interés, son dos mutaciones en el DNA mitocondrial humano: la mutación T8993G en el gen *atp6* que afecta la actividad de la ATP sintasa y la ablación 9480del15 en el gen *cox3* que afecta el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa. Ambas mutaciones han sido reportadas como causantes de enfermedades mitocondriales (Holt *et al.* 1990; Keightley *et al.* 1996).

INTRODUCCIÓN

movimientos de 120 grados cada uno (Yasuda *et al.* 1998). Estos movimientos inducen cambios conformacionales alternados en cada una de los tres pares catalíticos α/β , de manera que simultáneamente, en uno de los sitios se unen los sustratos ADP y P_i , en el segundo sitio se lleva a cabo la reacción de formación del ATP y en el tercer sitio se libera el ATP recién sintetizado (Kayalar *et al.* 1977; Gresser *et al.* 1982).

Las ATP sintasas mitocondriales presentan proteínas homólogas a las proteínas bacterianas, y presentan además subunidades supernumerarias que forman parte del tallo lateral y que podrían tener una función regulatoria o participar en la formación de dímeros.

En la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial, las subunidades ATP6 y A6L son codificadas en el DNA mitocondrial. La subunidad ATP6 es la proteína homóloga a la subunidad *a* de *E. coli* y en la interfase con el anillo de subunidades *c* forma dos semicanales que son una ruta obligada para los protones durante la síntesis de ATP.

Mutaciones en el gen mitocondrial *atp6* han sido asociadas con diversas patologías, por ejemplo, la mutación puntual T8993G resulta en el cambio de una leucina altamente conservada por una arginina en uno de los segmentos transmembranales de la subunidad ATP6 (Mostrada en la Figura 6). La proteína mutante se ensambla correctamente en el complejo V, sin embargo la mutación introduce una carga adicional en el hemicanal que forma la subunidad ATP6 con el anillo de subunidades *c*, del lado de la matriz mitocondrial. Este cambio bloquea la eficiencia de translocación de protones guiada por el gradiente electroquímico y por lo tanto reduce la velocidad de síntesis de ATP por la ATP sintasa (Cortés-Hernández *et al.* 2007). Esta mutación ha sido relacionada con el Síndrome de Neuropatía Ataxia y Retinopatía Pigmentosa (NARP) (Holt *et al.* 1990) y Síndrome de Leigh de Herencia Materna (MILS, por sus siglas en inglés) (Tatuch *et al.* 1992).

Citocromo c oxidasa.

La citocromo *c* oxidasa (COX, Figura 7), es el componente terminal de la cadena respiratoria. Transfiere electrones del citocromo *c* reducido al oxígeno molecular, al mismo tiempo que bombea protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, contribuyendo a la generación del gradiente electroquímico.

El complejo IV humano está compuesto por 13 subunidades, de las cuales tres, COX1, COX2 y COX3, están codificadas en el genoma mitocondrial. Estas tres

INTRODUCCIÓN

subunidades son además las proteínas homólogas a las tres subunidades mas grandes de la citocromo c oxidasa bacteriana y forman el núcleo catalítico de la enzima.

El complejo IV contiene cuatro componentes redox, tres de ellos se encuentran localizados en la subunidad COX1 (hemo a , y el centro bimetálico hemo a_3 -Cu_B) y el cuarto (Cu_A) se encuentra unido al dominio polar de la subunidad COX2. La subunidad COX3 no tiene grupos prostéticos, pero parece desempeñar un papel estructural esencial para la viabilidad del complejo (Capaldi 1990).

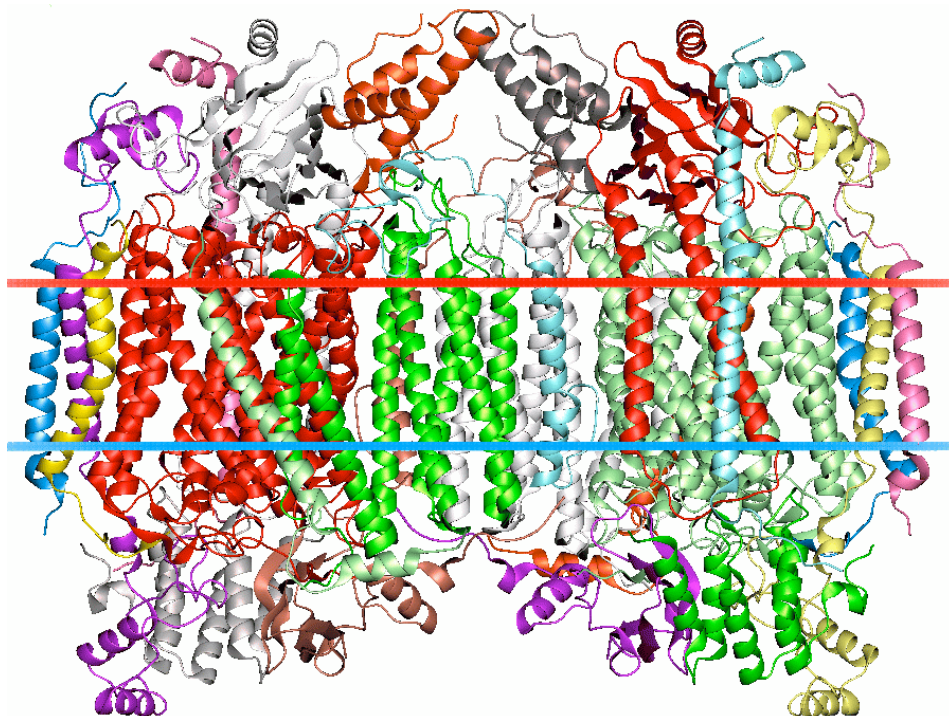


Figura 7. Representación de la estructura cristalográfica de la citocromo c oxidasa bovina. El complejo IV forma dímeros embebidos en la membrana interna mitocondrial. La subunidad COX3 tiene 7 cruces transmembranales y se encuentra representada en verde (Tsukihara *et al.* 1996).

Se han reportado deficiencias en la actividad de COX causadas por mutaciones en tRNA's codificados por el genoma mitocondrial o por grandes ablaciones en el DNA mitocondrial. Uno de los primeros reportes de mutaciones en un gen de COX fue una microablación de 15 pb (9480del15) en el gen mitocondrial que codifica para COX3 (Keightley *et al.* 1996). Esta ablación elimina 5 aminoácidos (92del-Phe-Phe-Phe-Ala-Gly) de un cruce transmembranal altamente conservado dentro de una de las dos regiones que

tienen contacto con COX1 en la holoenzima y provoca deficiencia en la actividad de COX y mioglobinuria.

Un estudio más detallado de las consecuencias de esta microablación en híbridos 100% mutantes (9480del15) mostró que la actividad de COX y la síntesis de ATP se ven gravemente afectadas, además de que las células mostraban requerimientos similares a las de las células ρ^0 para sobrevivir, como consecuencia de la falla en el ensamblaje de la holoenzima y de la baja estabilidad de los péptidos COX1, COX2 y COX3 (Hoffbuhr *et al.* 2000).

Tratamiento de las enfermedades de origen mitocondrial.

Hasta la fecha no hay un tratamiento eficaz para las enfermedades mitocondriales, excepto en raros casos en los que se puede realizar transplante del órgano afectado. Los tratamientos farmacológicos están dirigidos a mitigar los síntomas de las mismas, y se incluyen medicamentos anticonvulsivantes, y medicamentos para el control de disfunciones endocrinas. Por otra parte, resulta importante el control de la acumulación de metabolitos nocivos, cómo el ácido láctico.

Uno de los tratamientos más utilizados es la administración de metabolitos y cofactores, especialmente cuando en las enfermedades mitocondriales se detecta la pérdida de compuestos específicos como la carnitina o la coenzima Q₁₀. También se ha observado un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno cuando se encuentra afectada la función mitocondrial, por lo que se administran compuestos antioxidantes, como la vitamina E (DiMauro *et al.* 2006). Se ha intentado también el manejo de las enfermedades mitocondriales a través del ejercicio físico, particularmente en enfermedades con altos niveles de heteroplasmía en músculo, y se ha detectado una mejora en calidad de vida y en la función de la cadena respiratoria. Sin embargo, no se obtiene una disminución en la proporción de DNAm_t mutante y los beneficios obtenidos desaparecen si se elimina el ejercicio aeróbico (Tuppen *et al.* 2010).

En la búsqueda de opciones para el tratamiento de enfermedades mitocondriales, se han propuesto varios métodos genéticos, y se han realizado diversos estudios en modelos celulares y animales con mutaciones en el DNA mitocondrial. Entre estas alternativas, podemos identificar principalmente tres opciones (Wallace y Fan 2010; Doyle and Chan 2008):

INTRODUCCIÓN

1. Inhibición selectiva del DNAMt mutante. Se trata de introducir a la mitocondria enzimas de restricción o de pequeñas regiones de ácidos nucleicos antisentido capaces de inhibir la traducción y replicación del DNA mutante. Para poder utilizar esta estrategia, la mutación en el DNA mitocondrial debe ser heteroplásmica, y las moléculas antisentido o la enzima de restricción deben ser capaces de distinguir entre el DNA silvestre y el DNA mutante.
2. Vectores de expresión mitocondriales. Teóricamente, esta opción podría adaptarse a cualquier tipo de mutación y corregir defectos homoplásmicos o heteroplásmicos, y básicamente consiste en introducir DNA mitocondrial recombinante en el organelo, ya sea completo o en fragmentos, que contenga una copia del gen silvestre y cuya expresión sea controlada por promotores de genes mitocondriales (Doyle y Chan 2008). A la fecha no se ha logrado la clonación de DNAMt humano, y tampoco se ha mostrado que se puedan transformar mitocondrias *in vivo*, sin embargo se ha clonado el DNA mitocondrial de ratón (de 16.3 kb) en *E. coli*, y se ha demostrado que esté puede ser electroporado con éxito en mitocondrias aisladas de ratón (Yoon y Koob 2003).
3. Expresión alotópica. Esta técnica está basada en la optimización de genes mitocondriales para que ser expresados desde el núcleo, y la adquisición de una MTS para ser importados a la mitocondria. Por ser el enfoque utilizado en este trabajo, describiremos más en detalle esta estrategia en el siguiente apartado.

Expresión alotópica.

Se entiende como expresión alotópica la expresión de un gen fuera del compartimiento celular al que pertenece (Nagley y Devenish 1989). El término se ha utilizado para referirse a la posibilidad de expresar un gen, que originalmente se encuentra localizado en el DNA mitocondrial, desde el núcleo de una célula eucarionte, lo cual hace posible la perspectiva de una futura terapia génica para corregir enfermedades ocasionadas por mutaciones en el DNA mitocondrial. La estrategia es básicamente la siguiente: recodificar el gen mitocondrial considerando el uso de codones y el código genético nuclear (en muchas especies el código genético mitocondrial es diferente en algunos codones respecto al nuclear), añadir una secuencia que codifique para una MTS en el extremo amino terminal de la proteína correspondiente e introducir la construcción

INTRODUCCIÓN

en el núcleo de la células desde donde se va a expresar, bajo el control de promotores adecuados de acuerdo a la célula de que se trate.

La expresión alotópica tiene al menos tres grandes ventajas: primero, hay técnicas establecidas para introducir material genético en el núcleo celular; segundo, la expresión alotópica podría servir para el tratamiento tanto de enfermedades homoplásmicas como heteroplásmicas; y tercero, la proteína resultante podría llegar a todas las mitocondrias que se encuentran en la célula afectada (Doyle y Chan 2008).

Los trabajos pioneros de expresión alotópica comenzaron en 1988, por Nagley y sus colaboradores (Nagley *et al.* 1988) en los que se logró la expresión de la proteína ATP8 de *Saccharomyces cerevisiae*, a la cual se le adicionó la MTS de la subunidad ATP9 de *Neurospora crassa*. Los autores lograron no sólo la complementación del metabolismo aeróbico de una cepa de *S. cerevisiae* que tenía una ablación en el gen *atp8* mitocondrial, sino que también demostraron, mediante la inmunoprecipitación de la ATP sintasa, que la proteína ATP8 expresada alotópicamente se integra en el complejo de la ATP sintasa (Law *et al.* 1990). Este no es un resultado trivial, sobre todo considerando que ATP8 es una proteína integral de membrana, y que para que se integre al complejo de la ATP sintasa, primero debe alcanzar el compartimiento mitocondrial al que pertenece, plegarse de manera correcta tanto en las regiones transmembranales como en las solubles y adquirir la correcta orientación en la membrana para poder interactuar con el resto de las subunidades del complejo V justo cuando se están ensamblando.

A partir de estos experimentos se ha intentado la expresión alotópica de otras proteínas, entre las que destacan ATP9 de *S. cerevisiae* (Farrell *et al.* 1988), el apocitocromo *b* y la subunidad ND4 en células 143B y CHO (Oca-Cossio *et al.* 2003), NAD7 en *Nicotiana sylvestris* (Pineau *et al.* 2005) y ATP6 en diferentes tipos de células de mamífero como la 143B y las células CHO (Manfredi *et al.* 2002; Zullo *et al.* 2005). Se han utilizado también MTS's de diferentes proteínas y de diferente longitud. En otros trabajos se ha propuesto incluir las regiones 3'UTR de genes que codifican para proteínas mitocondriales. Se ha descrito que estas regiones no traducidas son importantes para dirigir el mRNA a la membrana externa mitocondrial, por lo que la traducción ocurre en la periferia de la membrana externa y con ello se evita la agregación de la proteína en el citosol, reduciendo la posibilidad de que la proteína exógena resulte tóxica para la célula (Kaltimbacher *et al.* 2006; Bonnet *et al.* 2007). Los resultados sin embargo son controversiales, y en algunos casos completamente contrarios entre sí, aún entre grupos que trabajan con los mismos genes y en el mismo tipo de células. Mientras que algunos

INTRODUCCIÓN

reportan que la expresión alotópica es exitosa y que son capaces de restaurar totalmente los defectos en la fosforilación oxidativa (Manfredi *et al.* 2002; Kaltimbacher *et al.* 2006), hay otros autores que reportan serias dificultades técnicas, especialmente cuando las proteínas que se pretenden expresar alotópicamente son altamente hidrofóbicas (Oca-Cossio *et al.* 2003; Bokori-Brown y Holt 2006)

De acuerdo a lo reportado en la literatura, sólo hay tres casos en los que la evidencia de la expresión alotópica exitosa es irrefutable, pues en los tres trabajos se muestra evidencia funcional y bioquímica de la incorporación de la proteína exógena en su correspondiente complejo multimérico: el caso de la subunidad ATP8, descrito arriba, en donde se rescata el defecto en el gen *atp8* mitocondrial utilizando una versión nuclear fusionado a una secuencia de nucleótidos que codifican para la MTS de la subunidad ATP9 de *N. crassa* (Nagley *et al.* 1988; Law *et al.* 1990). El segundo caso es el de la subunidad NAD7 en *Nicotiana sylvestris*. Las plantas que presentan la ablación del gen *nad7* mitocondrial no logran ensamblar el complejo I y presentan un fenotipo muy diferente al de las plantas silvestres. Cuando la proteína NAD7 es expresada de manera alotópica en las plantas mutantes, los análisis bioquímicos muestran la presencia del complejo I totalmente ensamblado y la presencia en el complejo de la subunidad NAD7, además, las plantas transformadas recuperan el fenotipo de la planta silvestre (Pineau *et al.* 2005). En un trabajo más reciente se logró la expresión alotópica del gen *cox2* en levadura, en donde la disminución de la hidrofobicidad de la proteína mediante la mutación de un solo aminoácido hidrofóbico (triptófano) por uno polar (arginina) en el primer cruce transmembranal resultó ser la clave para lograr la expresión alotópica y la complementación de la actividad de citocromo oxidasa en levaduras con el gen *cox2* mitocondrial interrumpido (Supekova *et al.* 2010).

En los trabajos de expresión alotópica publicados hasta la fecha se han utilizado MTS's de distinta procedencia y longitud, en parte debido a que las presecuencias no tienen aminoácidos conservados y a que al parecer la estructura de alfa hélice anfipática es suficiente para lograr la importación de proteínas al interior de las mitocondrias; sin embargo, se ha demostrado tanto que no todas las presecuencias son capaces de importar una determinada proteína al interior de la mitocondria (Supekova *et al.* 2010), como que la longitud de la presecuencia es determinante en la eficiencia de importación de las proteínas (Galanis *et al.* 1991; Bokori-Brown y Holt 2006).

Dada la controversia en cuanto a la viabilidad de la expresión alotópica de proteínas altamente hidrofóbicas y la contundencia de los reportes de expresión alotópica

de ATP8, NAD7 y COX2, queda claro que es necesario mostrar en trabajos futuros tanto la evidencia bioquímica (prueba de la integración de la proteína a su respectivo complejo multimérico) como la evidencia funcional (la restauración total o parcial de la actividad de dicho complejo) para poder afirmar que una proteína realmente ha sido expresada alotópicamente de manera exitosa (Kyriakouli *et al.* 2008).

***Chlamydomonas reinhardtii* como modelo natural de expresión alotópica.**

En nuestro laboratorio hemos trabajado con el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Es un alga de aproximadamente 10 µm diámetro, posee dos flagelos y crece en agua dulce. Es un organismo que se usa como modelo en la biología celular por su fácil manipulación, porque se pueden aislar mutantes con diversas características fenotípicas que permiten el estudio de diversos procesos biológicos, como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas, y la cadena de transporte de electrones entre otras. Además existen técnicas para la transformación genética del alga y se conocen las secuencias completas de su DNA mitocondrial, de su DNA cloroplastídico y de su genoma nuclear (Vahrenholz *et al.* 1993; Maul *et al.* 2002; Merchant *et al.* 2007).

El DNA mitocondrial de *C. reinhardtii* fue totalmente secuenciado en 1993, y se trata de un DNA lineal de doble cadena de 15.8 kb (Vahrenholz *et al.* 1993). Al hacer un análisis del contenido génico de DNAm_t se notó que algunos genes que se encuentran altamente conservados en los genomas mitocondriales, como el caso de *atp6*, *cox2*, *cox3*, *nad3* y *nad4l* no están presentes en el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas* (Figura 8).

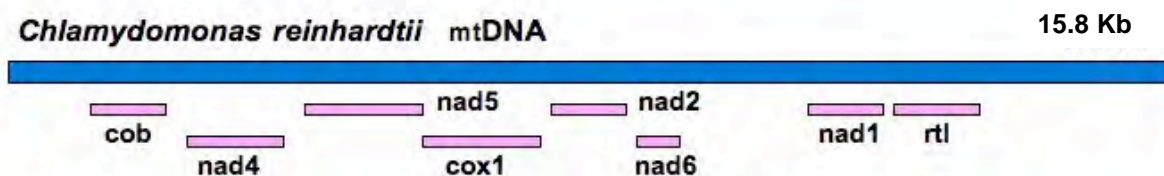


Figura 8. Representación del genoma mitocondrial de *C. reinhardtii*. Los genes que codifican para las proteínas ATP6, COX2, COX3, NAD3 y NAD4L (las cuales forman parte de alguno de los complejos de la fosforilación oxidativa y usualmente son codificadas por el DNA mitocondrial) no están presentes en el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii*.

INTRODUCCIÓN

En trabajos previos en nuestro laboratorio se demostró que los genes *atp6* y *cox3* de *Chlamydomonas reinhardtii* migraron al núcleo, adquirieron intrones, promotores y secuencias 5'UTR y 3'UTR (Funes *et al.* 2002; Pérez-Martínez *et al.* 2002). Más sorprendente aún, se demostró también que el gen *cox2* de *Chlamydomonas* (que codifica para la subunidad 2 de la citocromo oxidasa) también migró al núcleo, pero en este caso, dividido en dos genes funcionales, *cox2a* y *cox2b*, los cuales son transcritos independientemente y sus productos polipeptídicos (COXIIA y COXIIB) interaccionan para formar un heterodímero funcional similar a la proteína COXII ortodoxa (Pérez-Martínez *et al.* 2001). Otros grupos demostraron que ocurrió lo mismo con los genes que codifican para las subunidades NAD3 y NAD4L del complejo I (Cardol *et al.* 2006). Todas estos genes codifican para proteínas altamente hidrofóbicas, con dos o más cruces transmembranales, las cuales son sintetizadas en el citosol, posteriormente importadas a la mitocondria (ya sea de manera postraducciona l o cotraducciona l), integradas en la membrana interna mitocondria l y ensambladas en sus respectivos complejos de manera funcional.

Analizando como fue que las algas verdes lograron relocalizar los genes de proteínas altamente hidrofóbicas que prácticamente en todos los organismos son codificadas por el genoma mitocondria l, descubrimos dos características que podrían ser la clave del éxito: en primer lugar, estas proteínas adquirieron MTS's inusualmente largas; y segundo la hidrofobicidad media de las proteínas mitocondria les disminuyó sustancialmente.

Las MTS's de la mayoría de las proteínas que son importadas a al mitocondria usualmente son alfa hélices anfipáticas de entre 20 y 60 aminoácidos. En el caso de las proteínas ATP6 y COX3 de *Chlamydomonas* las presecuencias presentan la estructura de alfa hélice anfipática, pero su longitud es de 110 aminoácidos en el caso de COX3 (Pérez-Martínez *et al.* 2002), y de 106 aminoácidos en ATP6 (Figura 9) (Funes *et al.* 2002). Dado que se ha demostrado que una mayor longitud de la MTS incrementa la eficiencia de importación (Galanis *et al.* 1991), y que en el caso de COX2 de soya se requiere una presecuencia de más de 100 aminoácidos para lograr la importación de COX2 a la mitocondria (Daley *et al.* 2002), hemos postulado que la longitud de las presecuencias podría ser un factor importante para lograr la importación de proteínas hidrofóbicas (González-Halphen *et al.* 2004).

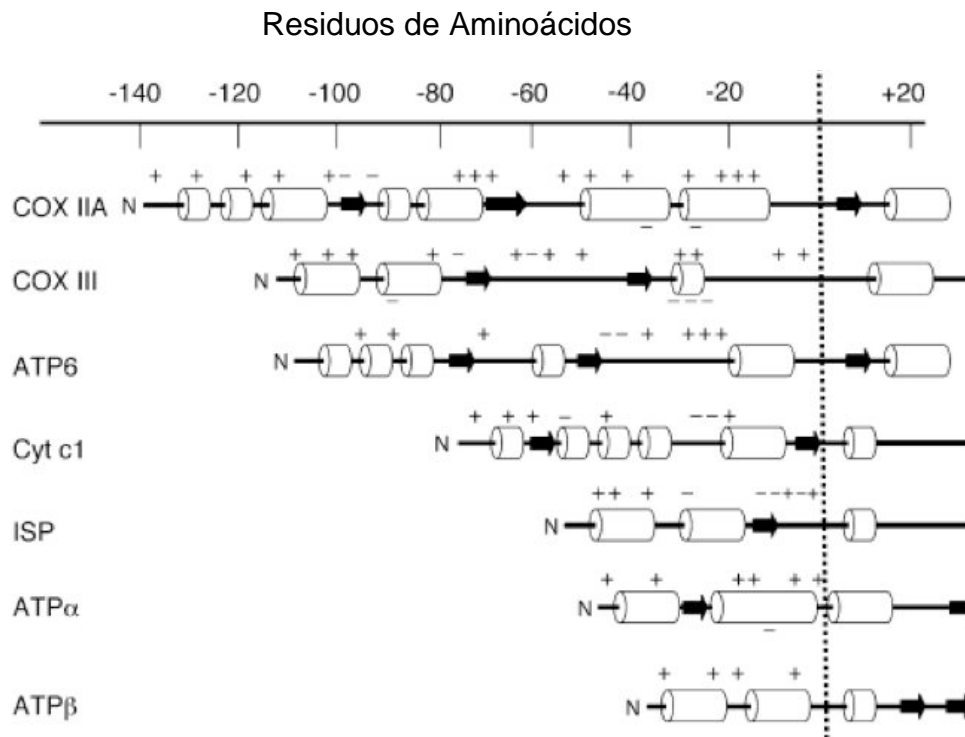


Figura 9. Representación de las Presecuencias de Direccionamiento a Mitocondria (MTS) de las proteínas COXIIA, COXIII, ATP6, Cyt c1, ISP (Proteína Hierro-Azufre), la subunidad α de la ATPasa (ATP α), la subunidad β de la ATPasa (ATP β) de *C. reinhardtii*. Los cilindros representan hélices alfa, las flechas negras representan láminas beta y las líneas son regiones no estructuradas. La línea punteada representa el primer aminoácido de la proteína madura. Las presecuencias de las proteínas hidrofóbicas COX2A, COX3 y ATP6 son mucho más largas que las de proteínas que usualmente son expresadas desde el genoma nuclear, como las subunidades alfa y beta de la ATPasa (tomado de González-Halphen *et al.* 2004)

También en trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos reportado que las proteínas de *C. reinhardtii* son menos hidrofóbicas que sus contrapartes codificadas en el DNAm_t en otros organismos (Funes *et al.* 2002, González-Halphen *et al.* 2004). En la figura 10 se observa la comparación de la hidrofobicidad media de la proteína ATP6 de *C. reinhardtii* (barras negras) con el promedio de la hidrofobicidad media de las proteínas ATP6 codificadas en el genoma mitocondrial de diferentes plantas (barras blancas). Como se puede observar, hay una disminución en la hidrofobicidad en tres de los cinco cruces transmembranales de la proteína codificada en el núcleo (segmentos A, B y C), mientras que en los otros dos cruces se mantiene la hidrofobicidad prácticamente sin cambios (segmentos D y E). Estos últimos son los que están directamente involucrados en la función de la proteína, que en el caso de ATP6 es la formación de los dos hemicanales

por donde ocurre la translocación de protones desde el espacio intermembranal hasta la matriz mitocondrial durante la síntesis de ATP.

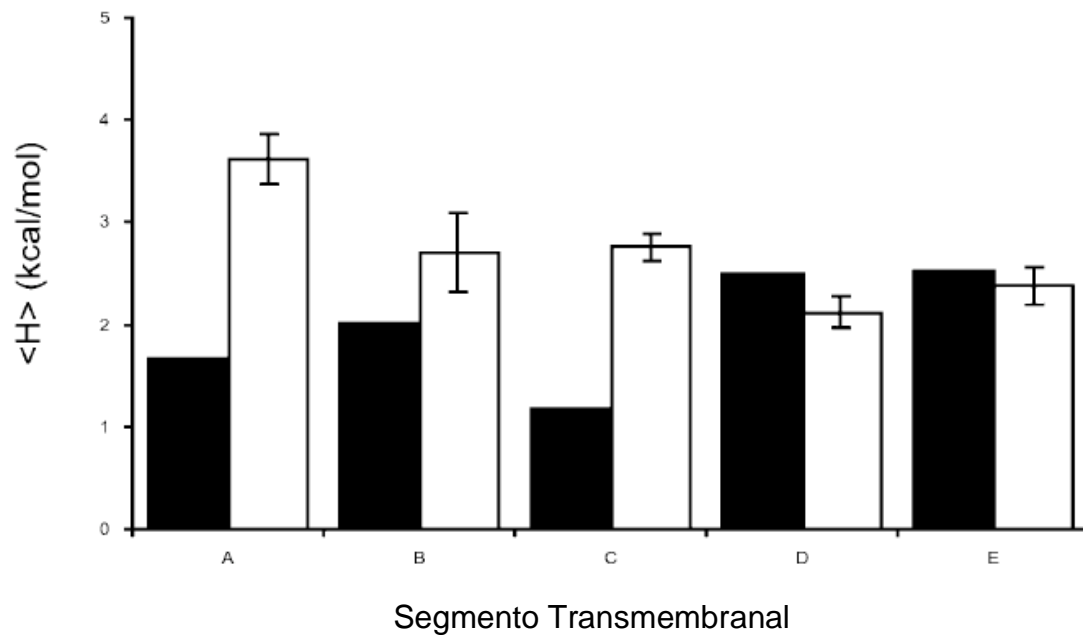


Figura 10. Comparación de la hidrofobicidad media de los cruces transmembranales de la proteína ATP6 de *C. reinhardtii* (barras negras), codificada en el núcleo, con el promedio de 21 diferentes proteínas ATP6 de plantas (barras blancas), todas ellas codificadas en el genoma mitocondrial. Observamos una disminución de hasta el 50% en la hidrofobicidad media en los tres primeros cruces transmembranales de la proteína ATP6 del alga (segmentos A, B y C) mientras que la hidrofobicidad de los cruces transmembranales que se cree están involucrados en la translocación de protones durante la síntesis de ATP (segmentos E y F) se mantienen sin cambios (tomado de Funes *et al.* 2002).

Cíbridos como herramienta para el estudio de las enfermedades mitocondriales.

Los cíbridos son una herramienta muy poderosa para el estudio de las enfermedades mitocondriales, ya que permiten observar cual es el efecto de una mutación en el DNA mitocondrial en un fondo genético (DNA nuclear) conocido. Los cíbridos son híbridos citoplásmicos, líneas celulares eucariontes que se producen por la fusión de una célula completa con un citoplasto (células enucleadas por centrifugación) (King y Attardi 1989). En el caso de los cíbridos que se usan como modelo para las enfermedades mitocondriales, los citoplastos se producen a partir de las células de un paciente con mutaciones en el DNA mitocondrial, y se fusionan con células cancerosas (en el caso de los cíbridos que se usaron en este trabajo es de la línea celular de osteosarcoma 143B)

INTRODUCCIÓN

que han sido tratadas con bromuro de etidio para eliminar el DNA mitocondrial (rho0). De esta manera, los cíbridos resultantes poseen el genoma nuclear de las células 143B y el genoma mitocondrial con la mutación que se desea explorar, proveniente de las células del paciente. Una vez obtenidos los cíbridos se puede además manipular los niveles de DNA mitocondrial mutante con la intención de obtener una línea celular homoplásmica para la mutación deseada. Para ello se seleccionan las células heteroplásmicas con alto porcentaje de DNA mutante y se someten a ciclos de cultivo en medio con bromuro de etidio seguidos de cultivos en medio sin bromuro de etidio. El bromuro de etidio inhibe la replicación del DNA mitocondrial, por lo que los diversos ciclos van favoreciendo la acumulación de la población de DNAm_t con la mutación hasta lograr una homoplasmía mutante del 100%.

Para nuestro trabajo contamos con cíbridos homoplásmicos para la mutación T8993G que afecta a la subunidad ATP6 de la ATPasa (Carrozzo *et al.* 2004), y con cíbridos homoplásmicos en la ablación 9480del15 que afecta a la subunidad COX3 de la citocromo c oxidasa (Hoffbuhr *et al.* 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Con base en toda la información anterior, planteamos para el presente proyecto de doctorado realizar la expresión de las subunidades ATP6 y COX3 desde el núcleo celular y aportar evidencia bioquímica y funcional de que la expresión alotópica fue exitosa. Utilizamos un modelo *in vitro* de células homoplásmicas con dos mutaciones mitocondriales, una en el gen *cox3* y otra en el gen *atp6* asociadas a enfermedades mitocondriales. En la mayoría de los ensayos de expresión alotópica, la estrategia consiste en recodificar el gen mitocondrial para que utilice el código genético universal, y añadir una MTS bien caracterizada para que la proteína alcance el compartimiento mitocondrial. En nuestro trabajo, usamos como modelo las proteínas del alga verde *C. reinhardtii* para diseñar nuevas proteínas COX3 y ATP6 quiméricas que comparten características de las proteínas humanas y de sus homólogos en *Chlamydomonas*. Tratamos de emular en el humano las características de las proteínas de *Chlamydomonas* que asumimos como la clave para que proteínas hidrofóbicas puedan ser expresadas desde el genoma nuclear. Con este fin disminuimos la hidrofobicidad media de las proteínas ATP6 y COX3 humanas, y añadimos las presecuencias largas que utilizan las proteínas ATP6 y COX3 de *Chlamydomonas* para mejorar la importabilidad de las proteínas quiméricas.

HIPÓTESIS.

La disminución en la hidrofobicidad media de las proteínas ATP6 y COX3 de *C. reinhardtii*, aunada a las inusualmente largas presecuencias de direccionamiento a la mitocondria, permite que los genes *atp6* y *cox3* sean expresados desde el núcleo celular, y que las proteínas resultantes, sintetizadas en el citosol, sean importadas exitosamente a la mitocondria. Por lo tanto subunidades ATP6 o COX3 quiméricas (humana-*Chlamydomonas*) que mimeticen las características fisicoquímicas de las proteínas ATP6 y COX3 del alga verde, podrían ser expresadas alotópicamente y compensar mutaciones en los genes *atp6* y *cox3* del DNA mitocondrial humano.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Utilizar las proteínas COX3 y ATP6 de *Chlamydomonas reinhardtii* como modelos para la construcción de proteínas quiméricas y expresarlas alotópicamente en células humanas con mutaciones homoplásmicas en los genes *cox3* y *atp6* mitocondriales.

Objetivos específicos.

- Expresar alotópicamente el gen *atp6* de *C. reinhardtii* en cíbridos de fibroblastos 100% mutantes en el gen *atp6* mitocondrial (T8993G) y aportar evidencia bioquímica de que la proteína correspondiente se incorpora al complejo de la ATP sintasa.
- Construir un gen *atp6* quimérico que codifique para una proteína ATP6 que mimetice las características fisicoquímicas de la subunidad ATP6 de *C. reinhardtii*.
- Expresar alotópicamente el gen quimérico de *atp6* en cíbridos de fibroblastos 100% mutantes para la mutación T8993G en el gen *atp6* mitocondrial. Demostrar la localización intracelular de la proteína correspondiente y aportar evidencia bioquímica de que dicha subunidad se incorpora al complejo de la ATP sintasa.
- Construir un gen *cox3* quimérico que codifique para una proteína COX3 que mimetice las características fisicoquímicas de la subunidad COX3 de *C. reinhardtii*.
- Expresar alotópicamente el gen quimérico de *cox3* en cíbridos 100% mutantes para la ablación 9480del15 en el gen *cox3* mitocondrial, demostrar su localización intracelular y aportar evidencia que la proteína correspondiente se incorpora al complejo de la citocromo c oxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación del gen *atp6* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

El gen *atp6* de *Chlamydomonas reinhardtii* se amplificó a partir de una genoteca de cDNA en fago lambda utilizando los cebadores descritos a continuación que incluyen tanto el codón de inicio como el codón de terminación:

Cebador en Sentido: 5'-c **gga att ctt** gga tta ccc ATG gcg ctg cag ca-3'

Cebador Antisentido: 5'-c **gga att cga** ggc tgc TTA cag cgc ctt ctt ga-3'

En ambos cebadores se incluyó el sitio de restricción *EcoRI* (negritas) para su posterior clonación. El gen se amplificó por PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 15 minutos (esto debido al alto contenido de CG en el DNA de *C. reinhardtii*); posteriormente, se realizaron 30 ciclos de reacción diseñados como sigue: desnaturalización del DNA a 94°C por 30 segundos, seguido de 60 segundos de alineamiento a 55°C y 90 segundos de extensión a 72°C; finalmente, incubamos la mezcla de reacción a 72°C durante 10 minutos.

El producto de PCR resultante de alrededor de 1050 pares de bases, se purificó mediante el kit de extracción de gel (Quiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto de PCR se clonó entonces en el vector pcDNA3.1/-V5-His-TOPO (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se transformó en la cepa de *E. coli* DH5α.

Purificamos DNA de las colonias seleccionadas y comprobamos la presencia del gen *atp6* de *C. reinhardtii* mediante restricción, además se secuenciaron un par de clonas en la Unidad Biología Molecular del IFC y comprobamos 100% de identidad entre las clonas que obtuvimos y las secuencias reportadas en la literatura para este gen.

Construcción de los genes quiméricos de *atp6* (A6Quim) y de *cox3* (Cox3-HA).

Para el diseño de las proteínas quiméricas, partimos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ATP6 (AAU13269) y COX3 (YP_003024032) humanas y las

MATERIALES Y MÉTODOS

secuencias de sus contrapartes en *Chlamydomonas*, ATP6 (XP_001689492) y COX3 (XP_001692182), obtenidas de la base de datos de NCBI.

Alineamos las secuencias de aminoácidos utilizando el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Larkin *et al.* 2007) para identificar a los aminoácidos conservados, y definimos los aminoácidos que forman cada uno de los cruces transmembranales mediante el programa Toppred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>) (Claros y Von Heijne 1994) utilizando la escala de hidrofobicidad de GES.

Posteriormente comparamos (en términos de hidrofobicidad) los cruces transmembranales obtenidos para las proteínas humanas con los cruces de sus proteínas homólogas en *Chlamydomonas*, y sustituimos aminoácidos hidrofóbicos de la proteína humana por aminoácidos menos hidrofóbicos que se encuentran en la misma posición en la proteína del alga. No sustituimos aminoácidos que sabemos son importantes para la función de la proteína o que se conoce son importantes para su interacción con otras subunidades (Funes *et al.* 2002; Varanasi *et al.* 2006). Para cada cambio de aminoácido, realizamos el análisis correspondiente en el programa Toppred, hasta que obtuvimos, con el mínimo de cambios posibles, proteínas quiméricas con una hidrofobicidad media menor a la de la proteína humana. Añadimos a cada una de las proteínas quiméricas resultantes la MTS correspondiente de sus contrapartes de *Chlamydomonas*.

Para la proteína ATP6 quimérica (A6Quim), adicionamos en el extremo amino terminal la presecuencia de 106 residuos de aminoácidos más 13 aminoácidos correspondientes a la proteína ATP6 madura de *Chlamydomonas*. Realizamos además tres sustituciones: I76F, I77C, y F178T, en el tercer cruce transmembranal.

En el caso de la proteína quimérica COX3 (COX3-HA), adicionamos al extremo amino terminal de la proteína humana los 110 aminoácidos de la MTS seguidos de 28 aminoácidos correspondientes a la proteína madura COX3 de *C. reinhardtii*. Para disminuir la hidrofobicidad de la proteína realizamos las siguientes sustituciones: L22W, A24T, L25Y, L26N y M33Q en el primer cruce transmembranal, L138A, G141Y, V142Y y I144Y en el cuarto cruce transmembranal, y finalmente L206M, F214Y y I217A en el sexto cruce transmembranal.

Finalmente, utilizamos el código genético universal y el uso de codones humano, para obtener la secuencia de nucleótidos correspondiente a partir de las secuencia de aminoácidos de las proteínas quiméricas. Depositamos la secuencia de los genes

MATERIALES Y MÉTODOS

quiméricos en el GenBank con los números de acceso HM462471 para *A6Quim* y HM462472 para *Cox3-HA*.

Añadimos sitios de restricción a los genes quiméricos (para su posterior manipulación) y los enviamos a sintetizar químicamente (GeneScript). Posteriormente clonamos ambos genes quiméricos en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen).

Con el objetivo de poder detectar las proteínas quiméricas mediante el uso de anticuerpos, Añadimos un epítipo de hemaglutinina (HA) a cada una de las proteínas por medio de PCR. Los cebadores que utilizamos se enlistan a continuación:

Cebadores para el gen *Cox3* quimérico:

COX3HA Sentido:

5'-AAGCTTGCTAGCATGAGAAGCCAGCTGCTGAG-3'

COX3HA Antisentido:

5'-CCTGAATTCTCAGGCGTAATCAGGCACGTCGTAGGGATAGGATCCCCACCCAGT
AGATGCTC-3'

Cebadores para el gen *atp6* Quimérico:

A6Quim-HA Sentido:

5'-AAGCTTGCTAGCATGGCCCTGCAGCAGGCCGCG-3'

A6Quim-HA Antisentido

5'-CCTGAATTCTCAGGCGTAATCAGGCACGTCGTAGGGATAGGATCCGGTGTTGTCTG
TGCAGGTAC-3'

Cebadores para el gen *atp6* de *Chlamydomonas reinhardtii*:

A6Cr-HA Sentido

5'-AAGCTTGCTAGCTAGATTGGATTAACCATGGCG-3'

A6Cr-HA Antisentido:

5'-CCTGAATTCTCAGGCGTAATCAGGCACGTCGTAGGGATAGGATCCCAGCGCCTTCT
TGACCACCTT-3'

Clonamos los tres genes a los que se les añadió el epítipo HA en el vector pGEM y comprobamos que la secuencia de nucleótidos fuera correcta mediante secuenciación. Posteriormente clonamos los tres genes en el vector pcDNA utilizando los sitios de restricción *NheI* y *EcoRI*.

Clonación de los genes *MTSA6-GFP* y *GFP*.

Para la obtención del gen que codifica para la proteína GFP que es dirigida a la mitocondria *in vivo*, clonamos la secuencia de nucleótidos que codifica para la MTS de la subunidad ATP6 de *C. reinhardtii* en el vector pEGFP-N1 (Clontech) (en fase con la secuencia que codifica para la EGFP) utilizando los sitios de restricción *EcoRI* y *Sall*, para obtener el gen *MTSA6-GFP*. Posteriormente, subclonamos la secuencia del gen *MTSA6-GFP* en el vector de expresión pcDNA3.1 mediante los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*. Para tener un control de la expresión de GFP sin presecuencia, cortamos la secuencia de nucleótidos del gen EGFP a partir del vector pEGFP-N1 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* y la clonamos en el vector pcDNA3.1 (EGFP sin MTS).

Cultivos celulares.

En el presente trabajo utilizamos 4 líneas celulares: las células control 143B (células de osteosarcoma), las CHO (células de ovario de hámster chino) y híbridos homoplásmicos con mutaciones en los genes *atp6* (T8993G) y *cox3* (9480del15) mitocondriales. Todas ellas se cultivaron en condiciones de esterilidad, adheridas en monocapa a cajas para cultivo de diferentes diámetros, y se mantuvieron en una incubadora para células eucariontes, con ambiente húmedo, a 37°C y en una atmósfera con el 5% de CO₂.

Los híbridos homoplásmicos con la mutación en el gen *atp6* mitocondrial nos fueron proporcionadas por la Dra. Rosalva Carozzo (Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy) (Carozzo *et al.* 2004). Las células homoplásmicas mutantes en el gen *cox3* fueron descritos previamente (Hoffbuhr *et al.* 2000).

Las células 143B y los híbridos mutantes se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que contiene 4.5 g/L de D-glucosa, L-glutamina y 110 mg/L de piruvato de sodio (Gibco). El medio además se suplementó al 5% con suero fetal bovino (FSB, Gibco) como se ha descrito previamente (García *et al.* 2000; Hoffbuhr *et al.* 2000) y se adicionaron 100 unidades/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 2 µg/mL de anfotericina B para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos en el medio de cultivo. Los híbridos mutantes tienen los mismos requerimientos

MATERIALES Y MÉTODOS

para crecer que las células *rho0*, por lo que el medio de cultivo de las líneas mutantes se suplementó además con 50 µg/mL de uridina.

Las células de CHO (CHO) se cultivaron en la mezcla de medios de cultivo DMEM/F12, 1:1 (GIBCO), suplementado con 10% de FBS en presencia de los antibióticos ya mencionados.

Las células se despegaron de las cajas de cultivo dos veces a la semana cuando alcanzaron confluencia, para resembrar y mantener la línea celular. Para despegarlas se incubaron con 9 mL de tripsina (350 U de tripsina/mL en un amortiguador que contiene 13.7 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 70 µM Na₂PO₄, 25 mM Tris y 0.1 mM EDTA) por 4 minutos a temperatura ambiente. Después las células se transfirieron a un tubo de centrifuga estéril de 50 mL, se añadió 1 mL de suero de bovino (para inactivar la tripsina) y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto. Para resembrar las células, las células colectadas se resuspendieron en 10 mL de medio DMEM suplementado, y se tomó una alícuota con 3.5×10^6 células para cada caja de 10 cm.

Para conservar las células en congelación, las células tripsinizadas se resuspendieron en medio para congelación (DMEM con 20% de FBS y 10% de Glicerol) a una concentración de 2×10^6 células/mL. Se hicieron alícuotas en viales de 1.5 mL y se colocaron dentro de una caja de unicel a -70°C, para que el congelamiento sea gradual. Después de al menos 24 horas a -70°C, las células se transfirieron a nitrógeno líquido, en donde se mantienen viables por varios años.

Para descongelar las células, se tomó un vial de las células que se encontraban en nitrógeno líquido, y se colocaron en un baño de 37°C para descongelarlas rápidamente. Las células se resuspendieron en medio DMEM con FBS al 10% y se centrifugaron 4 minutos a 1500 r.p.m. Posteriormente las células se sembraron en medio DMEM con FBS al 15%, y con los suplementos necesarios para la línea celular, en cajas de cultivo de 10 cm. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por el medio de cultivo regular para cada línea celular.

Transfecciones.

Las células CHO y los cíbridos mutantes en el gen *atp6* se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, el día anterior a la transfección se sembraron alrededor de 3.5×10^5 células

MATERIALES Y MÉTODOS

en cajas de cultivo de 60mm, utilizando el medio de cultivo adecuado y se incubaron en las condiciones ya descritas hasta que las células alcanzaron una confluencia de alrededor del 80%. 5 horas antes de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo suplementado por medio de cultivo sin FBS y sin antibióticos.

La mezcla para la transfección se realizó como sigue: por un lado diluimos 20 μL de lipofectamina 2000 en 500 μL de medio Opti-MEM (Gibco), mientras que en otro tubo diluimos 3 μg de DNA en 500 μL de Opti-MEM e incubamos las diluciones por separado durante 5 minutos. Posteriormente mezclamos la dilución de lipofectamina con la dilución de DNA e incubamos la mezcla durante 20 minutos más para formar los liposomas catiónicos. Finalmente agregamos la mezcla a las células y las incubamos durante 12 horas a 37°C en la incubadora de CO₂. 12 horas después de la transfección, reemplazamos el medio de cultivo de las células transfectadas por medio de cultivo con FBS y con antibióticos. 48 horas después de la transfección, las células se seleccionaron para obtener las clonas que integraron el plásmido de manera estable. Para ello las células se incubaron durante 3 semanas en medio de cultivo suplementado (SFB, uridina y antibióticos) al que además añadimos 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico G418 (análogo de la neomicina, Sigma), con cambio de medio cada 4 días. Las clonas después se cosecharon mediante el uso de anillos de clonación hechos de vidrio y se cultivaron por separado para obtener clonas individuales.

Cuando el objetivo de la transfección era la observación de las proteínas expresadas por inmunotinción, o por medio de la fluorescencia de la proteína GFP, las transfecciones se realizaron en placas multipozo de 25 mm. Para ello sembramos 1.5×10^5 células sobre cubreobjetos esterilizados a la flama y sumergidos en medio de cultivo apropiado. Las células se incubaron hasta alcanzar alrededor del 80% de confluencia. Las proporciones de los reactivos utilizados en la transfección se adaptaron proporcionalmente respecto a la superficie del pozo en el que se realizaron las transfecciones. Tanto el ensayo de inmunotinción como la observación directa de la proteína GFP se realizaron 48 horas después de la transfección.

Las células mutantes en el gen *cox3*, se transfectaron utilizando el reactivo de transfección effectene (Quiagen). Las células se sembraron de la misma manera que para las transfecciones con lipofectamina 2000, pero en este caso, no fue necesario cambiar el medio de cultivo mucho tiempo antes de la transfección y no fue necesario eliminar el FBS, por lo que las células soportan mejor la transfección.

MATERIALES Y MÉTODOS

La transfección de las células mutantes en el gen *cox3* mitocondrial se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, diluimos 2 µg de DNA en 150 µL del amortiguador de transfección, añadimos 16 µL del reactivo condensador de DNA (enhancer), agitamos con vortex e incubamos la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. Añadimos después 25 µL del reactivo effectene, agitamos fuertemente la mezcla e incubamos durante 10 minutos más. Durante este tiempo cambiamos el medio de cultivo de las células por medio de cultivo fresco, y después añadimos la mezcla de effectene-DNA. La selección de las clonas transfectadas establemente y las transfecciones para inmunotinción se realizaron como ya se describió para las transfecciones con lipofectamina.

Microscopía de fluorescencia.

48 horas después de la transfección, las células CHO transfectadas con los genes *EGFP* y *MTSA6-EGFP* se incubaron con medio de cultivo DMEM/F12 con 500 nM de Mitotracker Red (Molecular Probes) durante 15 minutos para la tinción de mitocondrias. Las células se lavaron con PBS tres veces, se añadió una gota del agente protector de fluorescencia (Vectashield) a un portaobjetos, y sobre este se montó el cubreobjetos con las células adheridas. Se sellaron los bordes del portaobjetos utilizando barniz de uñas y se dejó secar por 12 horas. Las células se observaron utilizando el microscopio confocal de la unidad de microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las proteínas quiméricas que poseen el epítoto HA, expresadas en los cíbridos humanos transfectados con los genes *A6Cr-HA*, *A6Quim-HA* y *Cox3-HA*, se observaron por inmunotinción. Las células transfectadas se lavaron con PBS y se incubaron 15 minutos (para las células control) y 40 minutos (para las células mutantes) con medio de cultivo DMEM al que se le adicionó Mitotracker (Molecular Probes) a una concentración de 500 nM. A partir de este punto, todo el procedimiento para las inmunotinciones se realizó en la oscuridad y a temperatura ambiente.

Las células se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos, al término de los cuales se lavaron con PBS 4 veces, y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 2% en PBS durante 2 minutos. Las células permeabilizadas se incubaron con I-block (Applied Biosystems) al 0.2% en PBS durante 15 minutos para disminuir la tinción inespecífica. Para la detección del epítoto HA, las células se

MATERIALES Y MÉTODOS

incubaron con 100 ng del anticuerpo monoclonal anti-HA de alta afinidad (3F10, Roche), diluido en la solución de I-block al 0.2%, durante 4 horas. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS, y se incubaron 2 horas más con la dilución 1:1000 del anticuerpo anti-rata acoplado a fluoresceína (Jackson immunoresearch). Finalmente, las células se lavaron con PBS 3 veces para eliminar el exceso de anticuerpos.

Las células teñidas, adheridas al cubreobjetos, se montaron sobre el portaobjetos con una gota del agente protector de la fluorescencia (Vectashield) y se sellaron las orillas con barniz de uñas. Las tinciones se observaron 12 horas después con ayuda del microscopio de fluorescencia.

Para realizar las dobles inmunotinciones, realizamos primero la tinción del antígeno HA (como ya describimos anteriormente). Posteriormente, añadimos a las células el anticuerpo de ratón anti-COX2 (Mitosciences) diluido 1:100 en I-block al 0.2% y se incubaron durante 4 horas. Al término de la incubación lavamos las células con PBS, y posteriormente adicionamos el anticuerpo anti-ratón acoplado al fluoróforo rojo Texas (Jackson Immunoresearch) diluido 1:1000 en la solución de I-block 0.2%. Incubamos con este anticuerpo durante dos horas. Finalmente lavamos las células tres veces con PBS y montamos las inmunotinciones como ya describimos.

Aislamiento de mitocondrias a partir de células en cultivo.

Las mitocondrias humanas se aislaron mediante centrifugación diferencial, a 4°C como ya se ha descrito (García *et al.* 2000). Las células se congelaron a -70°C al menos durante 12 horas y por un máximo de dos meses, para favorecer su ruptura. Para el aislamiento de mitocondrias partimos de una pastilla de al menos 2×10^8 células, las cuales se descongelaron en hielo, y se resuspendieron a una concentración de 1×10^7 células/mL en amortiguador de homogeneización (0.25 M de sacarosa, 1mM de EGTA, 10 mM de HEPES/NaOH, 2.5 mM de albúmina sérica bovina, pH 7.4) al cual se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (0.5 µg/mL leupeptina, 0.5 µg/mL pepstatina, 1 mM PMSF). Las células se rompieron mecánicamente en un baño de hielo con 20 homogeneizaciones de un vástago conectado a un taladro y controlado por reóstato a 300 revoluciones por minuto. Los homogeneizados se centrifugaron a $1500 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se reservaron, mientras que las pastillas volvieron a homogeneizarse y centrifugarse por 4 o 5 ciclos, para maximizar la ruptura de células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Conforme la población celular se rompe, la pastilla tiene mayor proporción de núcleos y adquiere apariencia gelatinosa y transparente, mientras que el sobrenadante se torna translúcido.

Los sobrenadantes postnucleares combinados se centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante que contiene organelos, se centrifugó por 15 minutos a 10,000 x g. En la pastilla quedaron las mitocondrias que se lavaron con 5 mL de amortiguador de lavado (0.25 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5) al que se adicionaron inhibidores de proteasas (0.5 µg/mL leupeptina, 0.5 µg/mL pepstatina, 1 mM PMSF), y finalmente se resuspendieron en 200-500 µL de amortiguador de lavado. Las mitocondrias resuspendidas se alicuotaron en tubos tipo eppendorff y se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido, de esta manera, las mitocondrias se pueden conservar hasta por 6 meses.

Choque osmótico a mitocondrias.

Las mitocondrias aisladas se resuspendieron en 40 volúmenes de agua con 5mM Na₄EDTA (pH 8.0) e inhibidores de proteasas (0.5 µg/mL leupeptina, 0.5 µg/mL pepstatina, 1mM PMSF), se incubaron en hielo durante 10 minutos, agitando en vortex cada minuto, para favorecer la ruptura de las membranas. Posteriormente, las membranas mitocondriales se recuperaron por centrifugación a 12,000 xg, y se resuspendieron en el medio pertinente al experimento para el que fueran a ocuparse.

Determinación de proteína método de Lowry. (Peterson 1977)

Tanto a la muestra como a los estándares de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 µg de albúmina se aforaron a 100 µL con agua. Después se agregó a cada muestra o estándar 1 mL de la mezcla 50:1 entre la solución A (2% Na₂CO₃ en 0.1 N de NaOH) y la B (1% CuSO₄, 2% tartrato de Na-K en 0.1N de NaOH), y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, para dar lugar a la formación de complejos cobre-proteína. A continuación se agregaron 100 µL de reactivo de Folin (Sigma) diluido 1:1 con agua, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Durante ese tiempo se forman complejos cobre-proteína que tiñen de color azul la reacción. La absorbancia de las muestras se determinó

MATERIALES Y MÉTODOS

a 660 nm, se construyó una curva estándar, y la concentración de las muestras se determinó por interpolación de las lecturas de absorbancia en la curva patrón.

Algunas muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) antes de la determinación de proteína para evitar interferencia de los componentes del medio. Las muestras y la curva patrón se aforaron a 1 mL con H₂O, se agregaron 100 µL de TCA al 72% y se incubaron 15 minutos en hielo. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 10,000 x g por 15 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en 100 µL de H₂O y 1 mL de la mezcla A+B 50:1 (necesario para la resuspensión de la pastilla ácida) y se siguió el protocolo de Lowry descrito arriba.

Ensayo de síntesis de ATP.

La determinación de las velocidades iniciales de síntesis de ATP se realizó en células permeabilizadas (James *et al.* 1999; Ojaimi *et al.* 2002) mediante un ensayo enzimático de síntesis de ATP acoplada a la reducción de NADP⁺ (Trauttscholdl, 1995). Las células se cosecharon antes del ensayo (25 cm² de cultivo en monocapa a una confluencia mayor del 90%), se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 mL de amortiguador que contiene 150 mM de sacarosa, 20 mM de Tris/HCl, pH 7.5 (la suspensión final quedó aproximadamente 1x10⁶ células/mL). Se determinó la concentración de proteína de la suspensión por el método de Lowry y se agregó digitonina gota a gota y con agitación hasta 25 µg/mg de proteína celular, para permeabilizar la membrana plasmática. La cantidad de detergente se determinó experimentalmente siguiendo la exclusión del colorante azul de tripano por microscopía, y se eligió una cantidad que permeabiliza más del 90% de la población celular sin decremento en la capacidad de síntesis de ATP. La digitonina se preparó a 1 mg/mL en DMSO y la concentración de DMSO en el ensayo se mantuvo por debajo del 1%.

La reacción acoplada se inició con la adición de células permeabilizadas (200 µg de proteína) a la mezcla de reacción, que contiene 150 mM de sacarosa, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM succinato, 1 mM ADP, 20 mM fosfato, 5 mM MgCl₂, 10 mM glucosa, 1 mg/mL hexocinasa, 30 U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 0.5 mM NADP⁺, y 100 mM de diadenosina pentafofato (como inhibidor de la adenilato cinasa). Las velocidades iniciales de producción de NADPH (extinción molar, 6.22 x 10³ M⁻¹cm⁻¹) a 37°C se siguieron mediante los cambios de absorbancia a 340 nm en 1 mL de mezcla de reacción y

MATERIALES Y MÉTODOS

corresponden en una relación estequiométrica 1:1 al ATP producido. En paralelo a cada determinación de síntesis de ATP, realizamos un ensayo preincubando las células con oligomicina (10µg/mg de proteína), la cual se incubó con las células por 5 min a 37°C. Este control nos permitió descontar el ATP producido por enzimas diferentes a la ATP sintasa .

Acoplamiento del anticuerpo 12F4AD8 a esferas de agarosa. (Aggeler *et al.* 2002).

Utilizamos esferas de agarosa con proteína G recombinante (Invitrogen) con afinidad por la región Fc de la IgG de diversas especies, incluido el ratón. Las esferas se lavaron tres veces con PBS para eliminar el conservador, y se recuperaron por centrifugación por 30 segundos a 10, 000 xg (En todos los lavados que se mencionan en este protocolo, las esferas se recuperan por centrifugación)

El anticuerpo monoclonal de ratón 12F4AD8, con afinidad por la F₁ de bovino, pero con reactividad cruzada con la F₁ humana, fue donado por el Dr. R.A. Capaldi (Mitosciences). A 500 µL de esferas se agregaron 0.5 a 1 mg del anticuerpo se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave y continua, para unirlo de manera no covalente a la proteína G. (Reservamos 5 µL de esta suspensión, alícuota pre entrecruzamiento, con la finalidad de verificar la eficiencia del entrecruzamiento).

Las esferas con el anticuerpo unido se lavaron dos veces en 10 volúmenes de borato de sodio 0.2M, pH 9.0. A continuación, agregamos 20 mM de dimetilpimelidato en borato de sodio 0.2 M, pH 9.0, e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, para entrecruzar el anticuerpo con la proteína G (reservamos una alícuota de 5µL, alícuota post entrecruzamiento). Lavamos las esferas una vez con 0.2 M de etanolamina pH 8.0, las resuspendimos en 10 volúmenes del mismo medio y las incubamos 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, para detener el entrecruzamiento. Por último, lavamos las esferas 2 veces en PBS y las guardamos a 4°C en PBS con 5 mM de azida de sodio, con lo que se conservan por un par de años y pueden utilizarse varias veces para inmunoprecipitar F₁F₀.

Para verificar la eficiencia del entrecruzamiento las alícuotas pre y post entrecruzamiento se mezclaron con amortiguador de carga para SDS-PAGE, se hirvieron por 2 minutos y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. La banda correspondiente a

la cadena pesada del anticuerpo (55 kDa) debe verse en el carril de la alícuota pre-entrecruzamiento, pero no en la del post-entrecruzamiento.

Inmunoprecipitación.

Se lavaron las esferas de agarosa, estuvieran o no acopladas al anticuerpo, al menos 2 veces con PBS antes de ser utilizadas, para eliminar el conservador en el que se guardan, y las equilibramos en medio ADP (150 mM sacarosa, 20 mM Mes-Tris. 1 mM ADP, pH 6.8, con la mezcla de inhibidores de proteasas antes mencionada).

Resuspendimos membranas mitocondriales obtenidas por choque osmótico a una concentración de 3 mg proteína/mL en medio ADP, y las solubilizamos agregando lentamente un volumen de medio ADP adicionado con 6 mg/mL de n-dodecil- β -D-maltósido (Sigma), con agitación dentro de un baño de hielo. Obtuvimos una preparación a 1.5 mg de proteína/mL y 2 mg de detergente/mg de proteína, la cual incubamos a 4°C por 60 minutos, con agitación, para maximizar la solubilización. Centrifugamos el solubilizado a 100,000 xg, a 4°C por 45 minutos, y el sobrenadante se incubó a temperatura ambiente por una hora con esferas de agarosa sin anticuerpos unidos, a fin de eliminar todas las proteínas que se unen de manera inespecífica a las esferas. Recuperamos el sobrenadante por centrifugación a 10,000 xg por 30 segundos, y lo incubamos con las esferas acopladas al anticuerpo monoclonal 12F4AD8 para unir a la F_1F_0 ATPasa (100 μ L de esferas por cada 4 mg mitocondrias iniciales), durante toda la noche (>12 horas) a 4°C.

Las esferas con la ATPasa unida se lavaron 5 veces en 5 volúmenes de medio ADP con 0.05% de dodecil maltósido, y luego la F_1F_0 se eluyó en dos etapas, resuspendiendo cada vez en $\frac{1}{2}$ volumen de glicina/HCl 100mM, pH 2.0, agitando suavemente en vortex, y recuperando el sobrenadante (en el que se encuentra la ATPasa desnaturalizada) por centrifugación a 10,000 xg. Posteriormente, el pH del eluido se ajustó a 7.5, agregando $\frac{1}{20}$ de volumen de solución 1 M de fosfatos pH 8.0.

Para regenerar las esferas acopladas al anticuerpo, lavamos las esferas con 5 volúmenes de glicina 100mM pH 2.0, dos veces con glicina pH 7.0, y dos veces más con PBS. Las esferas acopladas se guardaron en PBS con azida de sodio 5 mM a 4°C, así almacenadas, pueden ser reutilizadas 2 o 3 veces.

Aislamiento de mitocondrias de rata.

Las mitocondrias de hígado de rata se obtuvieron por centrifugación diferencial, de acuerdo a lo reportado por Cavadini (Cavadini *et al.* 2002). Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C y, para obtener las mitocondrias con un mejor control respiratorio, todos los amortiguadores y el rotor que se utilizaba se encontraban fríos previo a empezar con la extracción.

Las mitocondrias se aislaron a partir del hígado de una rata Wistar hembra de 250 gramos, mantenida en ayuno al menos por 12 horas. Posteriormente la rata se sacrificó por decapitación, se extrajo el hígado lo más rápido posible, se lavó en el amortiguador de extracción (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, HEPES 2 mM, y EGTA, pH 7.4 ajustado con KOH) y después se cortó en trozos con ayuda de unas tijeras. Los trozos se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio pasando el vástago 4 veces y cuidando de no hacer burbujas. El homogeneizado se pasó a través de dos gasas para eliminar el exceso de tejido, y se adicionó amortiguador de extracción para llevar el volumen a 75 mL. El homogenizado se centrifugó a 2000 r.p.m. en el rotor SS34 durante 10 minutos, desechamos el botón que contiene núcleos y restos celulares, y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 8500 r.p.m. en el rotor SS34 por 10 minutos más para obtener las mitocondrias.

Se desechó el sobrenadante, y se limpiaron las paredes de los tubos con una toalla de papel para eliminar el exceso de grasa. Enseguida se resuspendieron las mitocondrias en el amortiguador de extracción utilizando para ello un tubo de ensayo relleno de hielo (el tubo se lavó previamente por el exterior con el amortiguador de extracción), se juntaron las mitocondrias en un solo tubo y se centrifugaron nuevamente a 8500 r.p.m. por 10 minutos.

A continuación resuspendimos las mitocondrias en amortiguador de lavado (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM y HEPES 20 mM), y las centrifugamos a 8500 r.p.m. para recuperar las mitocondrias. Las mitocondrias se resuspendieron en el amortiguador de lavado, utilizando el tubo de ensayo con hielo (enjuagado ahora con el amortiguador de lavado), y se determinó la proteína por medio de la reacción de Biuret.

Determinación de proteínas por la reacción de Biuret.

Para determinar la concentración de proteína mitocondrial, se mezclaron 2 mL del reactivo de Biuret (tartrato de Na-K 6 g/L, CuSO_4 1.4 g/L y NaOH 30g/L), con 350 μL de agua, 125 μL de desoxicolato de sodio al 5% y 25 μL de las mitocondrias aisladas, y se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante ese tiempo, los complejos de coordinación que se forman entre el Cu^{2+} y los electrones no compartidos de los nitrógenos que forman parte del enlace peptídico, los cuales tornan la solución a color violeta. Se preparó de la misma manera una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina y un control sin proteínas que sirve como blanco para las mediciones espectrofotométricas.

Después de la incubación se determinó la absorbancia de cada una de las muestras (la de mitocondrias se realizó por cuadruplicado) a 540 nm, y se determinó la concentración de la muestra por interpolación de la absorbancia en la curva patrón.

Síntesis de proteínas radioactivas *in vitro*.

Para la síntesis de proteínas *in vitro* utilizamos el sistema acoplado de transcripción/traducción de reticulocitos de conejo que requieren del promotor SP6 o T7 (TNT (T7 or SP6) quick coupled transcription/translation system, Promega). Los genes *cox3-HA* y *MTSA6-EGFP* se clonaron en el vector pSP64 poly A (Promega), mientras que el control de importación, la aldehído deshidrogenasa de rata o ALDH, nos fue donado por el Dr. Henry Weiner (Universidad Purdue) clonado en el vector pGEM3Z (Promega) bajo control del promotor T7.

Se purificó DNA plasmídico utilizando el kit de purificación de DNA midi Kit (Quiagen). Se determinó la concentración del DNA aislado por espectrofotometría a 260 nm y se diluyó el DNA a 500 ng/ μL . Posteriormente, media hora antes de iniciar la reacción de síntesis se descongeló la marca radioactiva (metionina S^{35}) a temperatura ambiente, y una vez descongelada se descongelaron los reticulocitos de conejo rápidamente sosteniendo el tubo con la palma de la mano, y posteriormente se mantuvieron en hielo.

La mezcla de reacción se preparó con 40 μL de reticulocitos de conejo, 7 μL de agua libre de RNAasas, 1 μg de DNA y 1 μL de metionina radioactiva. La mezcla de

MATERIALES Y MÉTODOS

reacción se incubó a 30°C por una hora y media, y la reacción de síntesis se detuvo colocando la mezcla de reacción en hielo por al menos 10 minutos.

Importación *in vitro*.

Los ensayos de importación se realizaron en un volumen final de 125 μ L. Para la importación se mezclaron 18.75 μ L de la proteína marcada (15% del volumen de la reacción de importación) y 62.5 μ g de mitocondrias (concentración final de 0.5 mg/mL) con el amortiguador de importación (3 % de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, sacarosa 250 mM, KCl 80 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 2 mM, metionina 5 mM, MOPS-KOH 10mM, pH 7.2 ajustado con KOH). Agregamos a la reacción de importación los siguientes elementos a la concentración final indicada: ATP 2mM, malato/glutamato 10 mM, 12.5 unidades de creatina cinasa y fosfocreatina 10 mM. Realizamos cada reacción de importación por duplicado, y a la segunda reacción le adicionamos la mezcla de inhibidores AVO (antimicina A 0.8 mM, valinomicina 0.1 mM y oligomicina 2 mM) para abatir el gradiente electroquímico e inhibir la importación. La reacción de importación se incubó con agitación durante 30 minutos a 25°C, y posteriormente se detuvo incubando los tubos en hielo durante 10 minutos.

Para determinar si las proteínas habían sido importadas al interior de las mitocondrias, realizamos una prueba de protección a la digestión por proteasas. Las reacciones de importación, con o sin AVO, se dividieron en dos alícuotas cada una, y a una alícuota le adicionamos 300 μ g/mL de proteinasa K, incubamos 10 minutos, y posteriormente agregamos al mismo tubo 200 μ g/mL de subtilisina e incubamos 20 minutos más. La digestión se detuvo por la adición de PMSF recién preparado (concentración final 5 mM) para inhibir las proteasas.

Las reacciones se centrifugaron 5 minutos a 14,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y la pastilla de mitocondrias se lavó con 900 μ L de amortiguador de lavado (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM y MOPS-KOH 10 mM, pH 7.2 ajustado con KOH). Posteriormente agregamos al botón de mitocondrias 30 μ L de amortiguador de carga para geles de acrilamida, incubamos la mezcla 5 minutos a 65°C, y las sometimos a electroforesis en gel, utilizando el sistema de Von Jagow al 14% de acrilamida (Schägger y von Jagow, 1987).

MATERIALES Y MÉTODOS

Posteriormente, se transfirió el gel a una membrana de PVDF utilizando la cámara de transferencia semihúmeda y dos amortiguadores de transferencia (amortiguador de ánodo: Tris 150 mM, Tricina 50 mM, 20% metanol; amortiguador de cátodo: Acido ϵ -amino-n-caproico 300mM, 0.05% SDS). La transferencia se realizó durante 90 min a 1 mA/cm² de la membrana. Posteriormente la membrana se secó y se dejó exponiendo en la pantalla de almacenamiento de fosforescencia (Amersham Biosciences) durante al menos 16 horas y la autorradiografía se obtuvo en el Typhoon 9400 de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología celular, UNAM.

RESULTADOS.

Clonación del gen ATP6 de *C. reinhardtii* y diseño de las proteínas quiméricas.

El gen *atp6* de *C. reinhardtii* fue amplificado de una biblioteca de cDNA en fago lambda utilizando los cebadores apropiados (ver materiales y métodos) para después clonarlo en fase con el promotor en el vector pcDNA3.1 utilizando los sitios de restricción *EcoRI*, presentes en ambos cebadores.

Para la expresión alotópica nos dimos a la tarea de diseñar versiones de las proteínas ATP6 y COX3 humanas que imitaran las características fisicoquímicas (hidrofobicidad media) que presentan sus contrapartes en *Chlamydomonas*. Para esto realizamos un alineamiento entre las proteínas del alga y del humano para identificar los aminoácidos conservados utilizando Clustal W como herramienta bioinformática (Larkin *et al.* 2007). Por otra parte, definimos cada uno de los cruces transmembranales de las proteínas mediante los perfiles de hidrofobicidad obtenidos con el programa TOPPRED (Claros y von Heijne 1994). Analizando los alineamientos y los cruces transmembranales decidimos que aminoácidos eran susceptibles de ser substituidos con la intención de disminuir la hidrofobicidad media de cada cruce transmembranal.

La proteína ATP6 es una proteína integral de membrana con 5 cruces transmembranales. Para construir la proteína quimérica de ATP6 (A6Quim) añadimos a la proteína ATP6 humana los 106 aminoácidos que constituyen la MTS de la ATP6 de *Chlamydomonas* y 13 aminoácidos más de la proteína madura, con la idea de conservar el sitio de reconocimiento para el procesamiento de la proteína y además para poder reducir la hidrofobicidad media del primer cruce transmembranal. También redujimos la hidrofobicidad media del tercer cruce transmembranal mediante la sustitución de los aminoácidos 76-78 (numeración con base en la proteína humana), por los aminoácidos que corresponden en la proteína del alga I76F, I77C y F78T. El cuarto y quinto segmento transmembranal, los que forman la interfase entre la subunidad ATP6 y el anillo de subunidades *c*, no se modificaron para no interferir con la translocación de protones que ocurre durante la síntesis de ATP. Finalmente, hicimos una variante de la proteína ATP6 adicionando un epítipo de hemaglutinina (HA) en el extremo carboxilo terminal para poder

RESULTADOS

utilizarla en ensayos de inmunodetección. En la figura 11 mostramos el diagrama esquemático de la proteína ATP6 quimérica, y comparamos los perfiles de hidrofobicidad de las proteínas ATP6 humana, de *Chlamydomonas* y de la proteína quimérica.

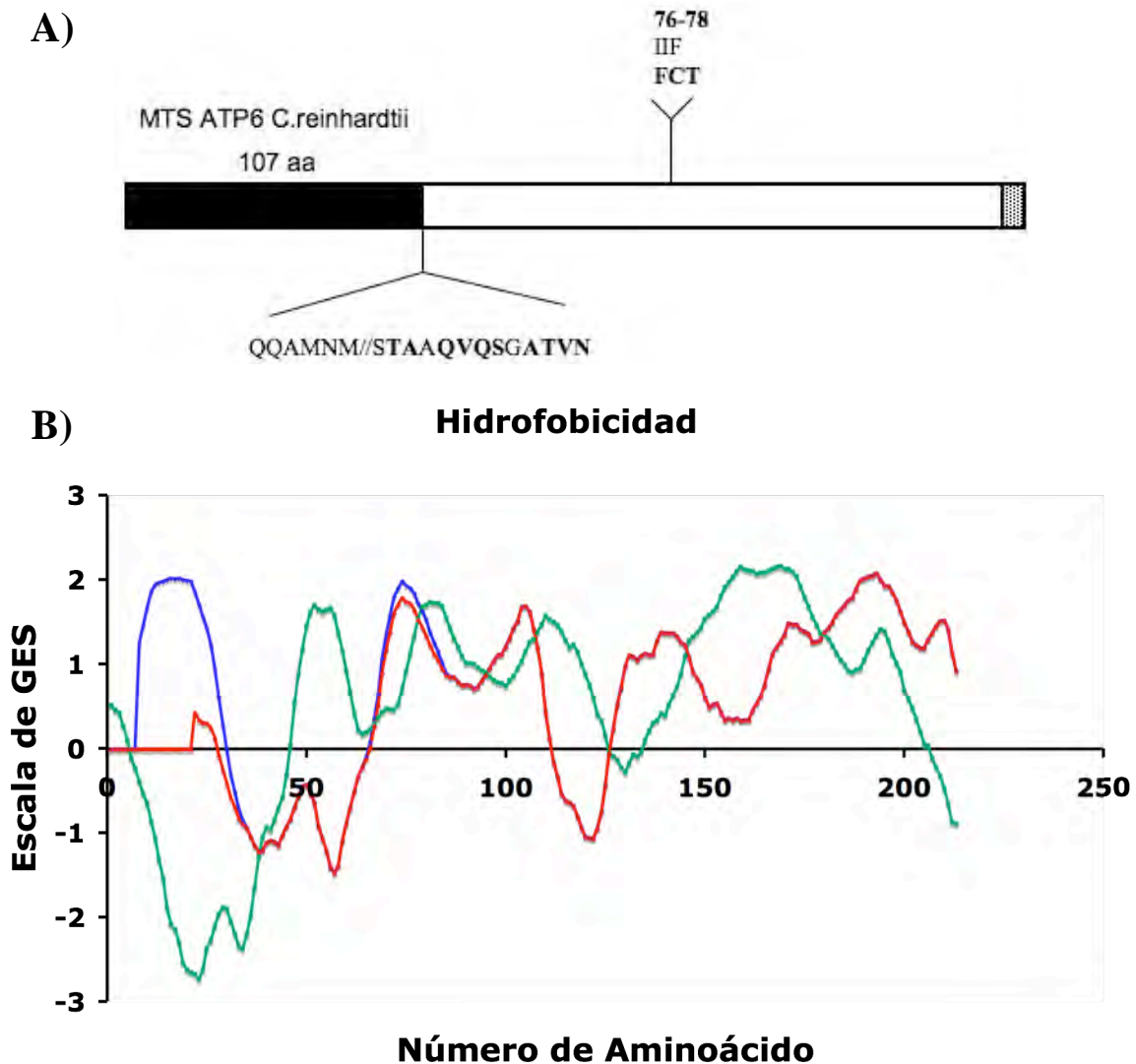


Figura 11. A) Diagrama esquemático de la proteína ATP6 quimérica. El recuadro negro en la región amino terminal representa la MTS de la ATP6 de *C. reinhardtii*, el recuadro blanco representa a la proteína madura y el recuadro gris el epítipo de HA. Las substituciones de aminoácidos se muestran en negritas debajo de los aminoácidos que se encuentran normalmente presentes en la misma posición en la proteína humana. Debajo del diagrama se muestra el sitio de procesamiento de la pre-proteína (marcado con el símbolo //) para dar lugar a la proteína madura. B) Perfil de hidrofobicidad de las proteínas ATP6 humana (azul) de *Chlamydomonas* (verde) y quimérica (roja). Observamos una disminución en la hidrofobicidad de la proteína quimérica con respecto a la que presenta la proteína humana, particularmente en el primer y el tercer cruces transmembranales. Los máximos de hidrofobicidad de las proteínas humana y quimérica están desfasados con respecto a los máximos de la proteína del alga debido a la diferencia en la longitud de sus respectivas secuencias de aminoácidos.

RESULTADOS

Mostramos también la secuencia de la proteína A6Quim comparada mediante alineamiento múltiple con la proteína ATP6 humana. En rojo mostramos las sustituciones que le introdujimos a la proteína, mientras que la leucina 156 (afectada por la mutación T8993G) está subrayada y la región marcada en azul es la secuencia del epítipo de hemaglutinina.

```

HsAT6      MNENLFASFIAPITILGLPATVLIILFPPLLIPSTSKYLINNRLITTQOWLIKLTSKQMMTM 60
A6Quim     -----STAAQVQSG--ATVN-----PLLIPTSKYLINNRLITTQOWLIKLTSKQMMTM 46
           * * . * *** *****
HsAT6      HNTKGRWLSLMLVSLIIFIATTNLLGLLPHSFTPTTQLSMNLAMAIPWAGAVIMGFRSK 120
A6Quim     HNTKGRWLSLMLVSLFCTIATTNLLGLLPHSFTPTTQLSMNLAMAIPWAGAVIMGFRSK 106
           *****: *****
HsAT6      IKNALAHFLPQGTPTPLIPMLVIIETISLLIQPMALAVRLTANITAGHLLMHLIGSATLA 180
A6Quim     IKNALAHFLPQGTPTPLIPMLVIIETISLLIQPMALAVRLTANITAGHLLMHLIGSATLA 166
           ***********
HsAT6      MSTINLPSTLIIFTILILLTILEIAVALIQAYVFTLLVSLYLHDNT----- 226
A6Quim     MSTINLPSTLIIFTILILLTILEIAVALIQAYVFTLLVSLYLHDNTGSPYDVPDYA 223
           *****

```

La proteína COX3 es una proteína integral de membrana con 7 cruces transmembranales que es fundamental para el ensamblaje del complejo IV mitocondrial. Para construir la proteína COX3 quimérica, adicionamos los 110 aminoácidos que constituyen la MTS de la proteína COX3 de *Chlamydomonas* y 28 aminoácidos más de la proteína madura. Modificamos la hidrofobicidad media de la proteína madura en el primer, tercer y sexto cruces transmembranales sin cambiar los aminoácidos conservados que sabemos son importantes para el ensamblaje del complejo IV (Varanasi *et al.* 2006). El alineamiento comparativo entre la proteína COX3 humana y la COX3-Quim es el siguiente:

```

HsCOX3     -----MTHQS--HAYHMVKPSPWPLTGALSALLMTSGLAMWFHFSMTLLM 44
COX3Quim   GSHAAGHQTAKEFYMEHIGKRHPFHVLPSPWPLTGAWSTYNMTSGLAQWFHFSMTLLM 60
           * * . *.:*.: ***** *: *****
HsCOX3     LGLLTNTLTMYQWRDVTRESTYQGHHTPPVQKGLRYGMILFITSEVFFFAGFFWAFYHS 104
COX3Quim   LGLLTNTLTMYQWRDVTRESTYQGHHTPPVQKGLRYGMILFITSEVFFFAGFFWAFYHS 120
           *****
HsCOX3     SLAPTPQLGGHWPPTGITPLNPLEVPLLNTSVLLASGVSIITWAHHSMLMENNRRNQMIQALL 164
COX3Quim   SLAPTPQLGGHWPPTGITPLNPLEVPLLNTSVLAASYYSITWAHHSMLMENNRRNQMIQALL 180
           ***** ** * *****
HsCOX3     ITILLGLYFTLLQASEYFESPFTISDGIYGSTFFVATGFHGLHVIIGSTFLTICFIRQLM 224
COX3Quim   ITILLGLYFTLLQASEYFESPFTISDGIYGSTFFMTTGFHGMHVIIGSTYLTACFIRQLM 240
           *****:*****:*****:*****
HsCOX3     FHFTSKHHFGFEAAAWYWHFVDVWVWFLYVSIYWVG----- 260
COX3Quim   FHFTSKHHFGFEAAAWYWHFVDVWVWFLYVSIYWVGSYPYDVPDYA 286
           *****

```

En el primer cruce transmembranal realizamos las siguientes sustituciones: L22W, A24T, L25Y, L26N, y M33Q, en el cuarto cruce transmembranal cambiamos los

RESULTADOS

aminoácidos L138A, G141Y, V142Y y I144Y. Finalmente cambiamos los residuos V199M, A200T, L206M, F214Y y I217A en el sexto cruce transmembranal. Añadimos también en la proteína quimérica el epítipo HA para la detección por anticuerpos. En la figura 12 mostramos el diagrama esquemático de la proteína COX3 quimérica, así como el perfil de hidrofobicidad de las proteínas COX3 humana, de *Chlamydomonas* y de la COX3 quimérica.

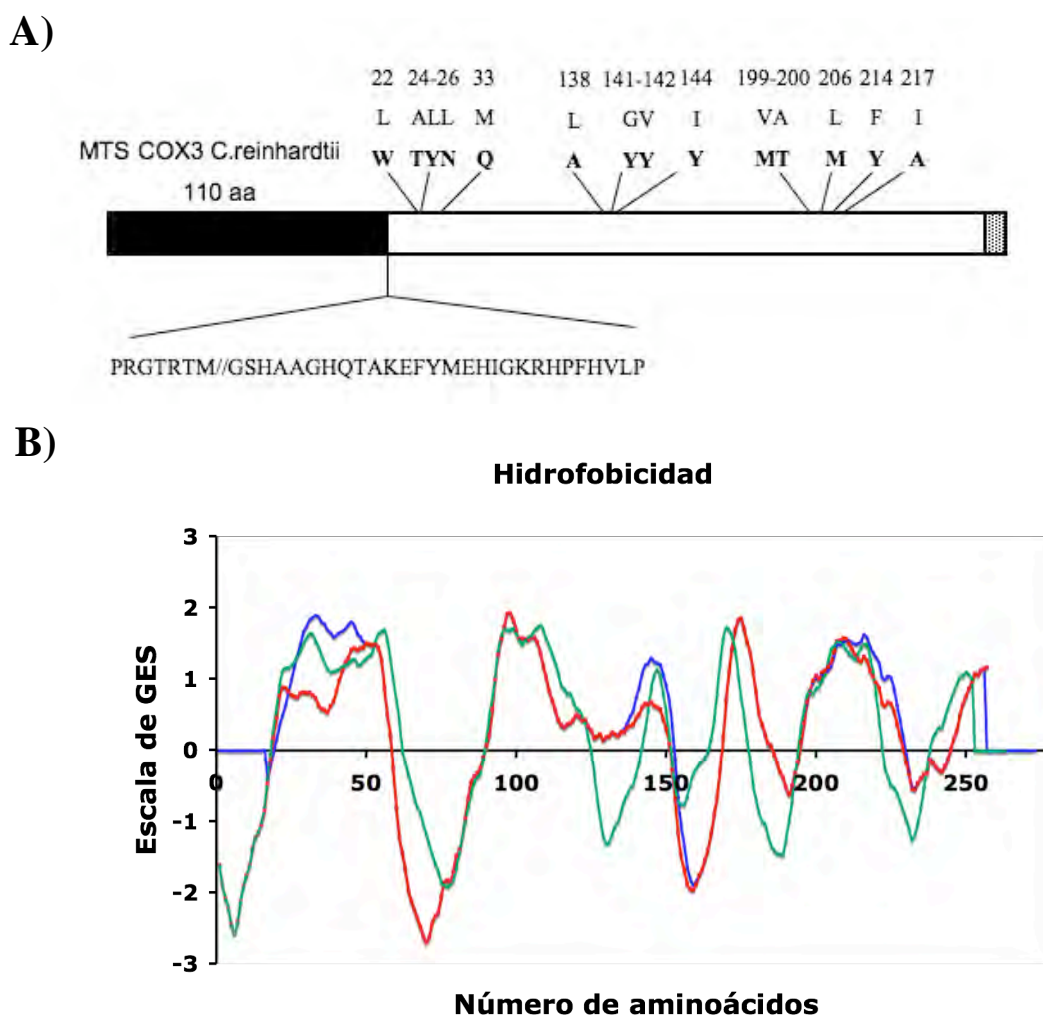


Figura 12. A) Diagrama esquemático de la proteína COX3 quimérica. El recuadro negro en la región amino terminal representa la MTS de la COX3 de *C. reinhardtii*, el recuadro blanco representa a la proteína madura y el recuadro gris el epítipo de HA. Las sustituciones de aminoácidos se muestran en negritas debajo de los aminoácidos que se encuentran normalmente presentes en la misma posición en la proteína humana. Debajo del diagrama se muestra el sitio de procesamiento de la pre-proteína (marcado con el símbolo //) para dar lugar a la proteína madura. B) Perfil de hidrofobicidad de las proteínas COX3 humana (azul) de *Chlamydomonas* (verde) y quimérica (roja). Observamos una disminución en la hidrofobicidad de la proteína quimérica con respecto a la que presenta la proteína humana, particularmente en el primer, cuarto y sexto cruces transmembranales.

¿Reconoce el sistema de importación mitocondrial de mamífero las secuencias MTS del alga?

La primera pregunta que debimos responder fue si la maquinaria de importación de mamíferos podría reconocer las presecuencias de direccionamiento a mitocondria de un organismo filogenéticamente lejano, como *C. reinhardtii*. Para contestar esta pregunta seguimos dos enfoques experimentales. Por un lado aprovechamos que *C. reinhardtii* es un organismo cuyo DNA ha sido secuenciado en su totalidad para buscar *in silico* los elementos que integran la maquinaria de importación mitocondrial, y por otro lado *in vivo*, mediante la transfección en células de mamífero de una proteína reportera (GFP) con la MTS del alga.

Buscamos en la base de datos de los EST's de *Chlamydomonas* mediante la herramienta del BLAST usando como plantados las secuencias de cada una de las subunidades que conforman la maquinaria de importación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es la mejor caracterizada, y la de *Arabidopsis thaliana* que es un organismo filogenéticamente más cercano a *Chlamydomonas*. Básicamente, buscamos los componentes de los 4 principales complejos involucrados en la translocación de proteínas: La Translocasa de la Membrana Externa (TOM), los dos complejos Translocadores de la Membrana Interna (TIM22 y TIM23) y los complejos encargados de la inserción de barriles beta en la membrana externa conocidos como complejo TOB/SAM. La figura 13 muestra los componentes de la maquinaria de importación identificados en *C. reinhardtii* y su disposición teórica en los diferentes compartimentos mitocondriales.

Identificamos homólogos para la mayor parte los elementos que conforman la maquinaria de importación de levaduras, particularmente están presentes los que forman el poro de importación en las membrana externa del complejo TOM (Tom40, Tom7, Tom6 y Tom5) y las subunidades mínimas que requiere el complejo TOB/SAM para la inserción de los barriles beta (TOB55 y TOB38). Identificamos también a las proteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro que requieren las proteínas solubles residentes del espacio intermembranal (Mia40 y Erv1) y a chaperonas que evitan la agregación de proteínas hidrofóbicas en el espacio intermembranal (Tim8, Tim9, Tim10 y Tim13), mientras son dirigidas a los complejos translocadores de la membrana interna.

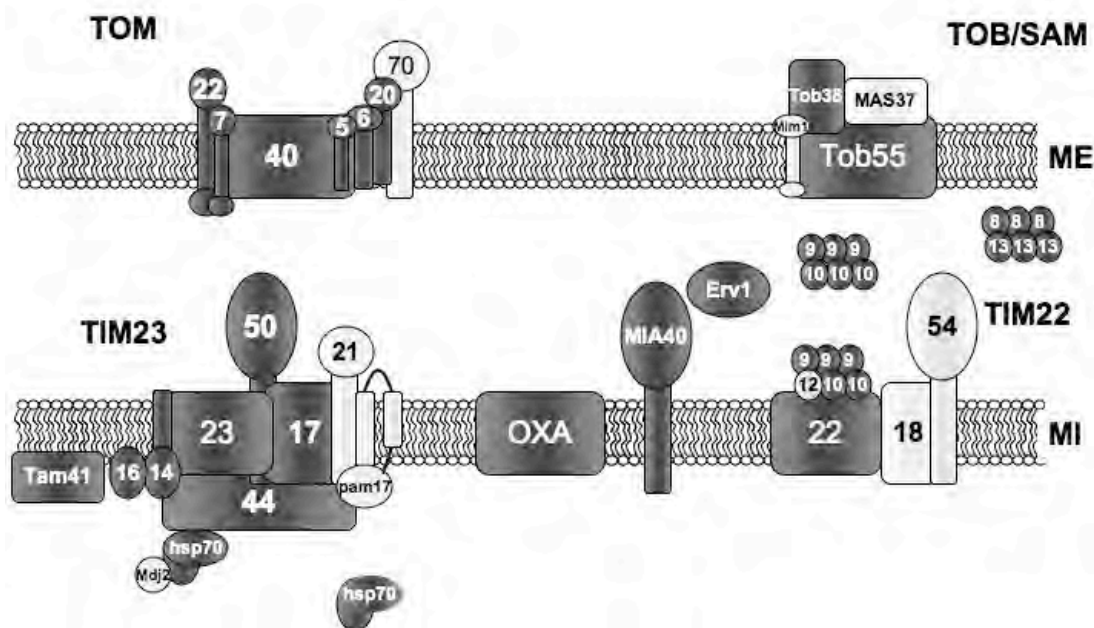


Figura 13. La maquinaria de importación de levaduras y los homólogos identificados en *Chlamydomonas*. Los componentes sombreados son los componentes de levadura que tienen homólogos en plantas y en algas verdes. Los componentes en blanco son proteínas presentes en la maquinaria de importación de levadura cuyos homólogos no están presentes o no fueron identificados en plantas y algas verdes. ME, Membrana Externa Mitocondrial; MI, Membrana Interna Mitocondrial. Modificado de Figueroa-Martínez *et al.* 2008.

Respecto a los elementos que forman los complejos translocadores de la membrana interna, del complejo TIM23 identificamos a los elementos que forman el poro de importación (Tim23, Tim17, Tim50, pero no a Tim21, que también forma parte del poro, y tiene una gran región hidrofílica) y al llamado motor de importación (Tim44, Tim16, Tim14 y mtHsp70). En el caso de TIM22 solo encontramos tres isoformas de la subunidad Tim 22, pero no a las subunidades Tim18 y Tim54. La presencia de al menos tres isoformas de Tim 22 podría estar relacionado con la ausencia de los demás componentes.

Es notable que algunos de los componentes de la maquinaria de importación que tienen grandes regiones hidrofílicas expuestas hacia el lado citosólico (Tom70 en el caso de TOM y Mim1 y Mas37 en el caso de TOB/SAM) o expuestas hacia el espacio intermembranal (Tim21 en el caso de TIM23 y en el caso de TIM22 tenemos a Tim18 y Tim54) parecen estar ausentes en plantas y en las algas verdes.

Dado que los componentes principales de la maquinaria de importación están presentes en *Chlamydomonas*, pensamos que la translocación de proteínas a la

RESULTADOS

mitocondria del alga debe ser similar a la que se ha descrito en otros organismos. Decidimos entonces verificar si la maquinaria de importación de proteínas en mamíferos podría reconocer las presecuencias de las proteínas de *Chlamydomonas*. Para esto se construyó una proteína quimérica con la secuencia MTS de la preproteína que codifica para la ATP6 de *Chlamydomonas* y se fusionó a la proteína EGFP (MTSA6-EGFP) y se clonó en el vector pcDNA3.1. Con esta construcción transfectamos células CHO y 48 horas después las células fueron analizadas mediante microscopía confocal. Los resultados se muestran en la figura 14.

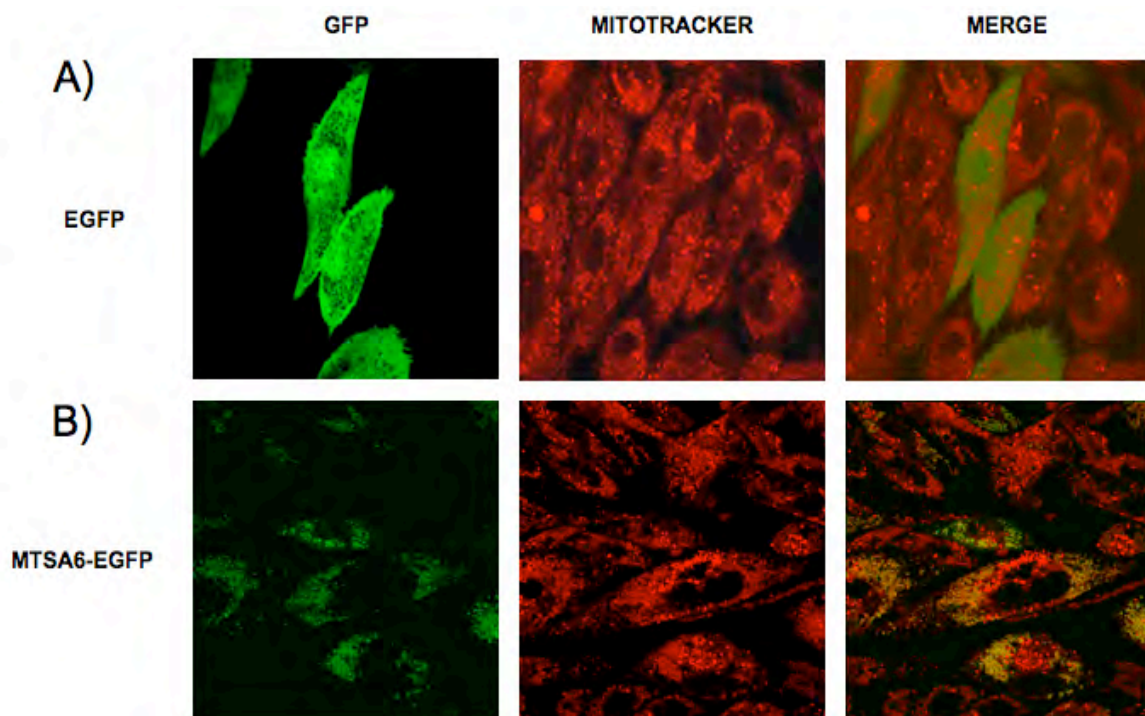


Figura 14. La MTS de la proteína ATP6 es capaz de dirigir la proteína EGFP a mitocondrias de mamífero. Microscopía de fluorescencia de células CHO transfectadas con EGFP (en el panel superior) y la EGFP quimérica que tiene fusionada en el amino terminal la presecuencia de la proteína ATP6 de *C. reinhardtii* (panel inferior). La fluorescencia de la MTSA6-EGFP colocaliza con la del Mitotracker, indicando que la MTS de *Chlamydomonas* dirige la proteína de fusión a la mitocondria. En contraste, la EGFP sin presecuencia se distribuye por todo el citosol.

La colocalización de la fluorescencia verde de la GFP y la señal en rojo dada por el Mitotracker sugiere que la proteína verde fluorescente se encuentra asociada a las mitocondrias. El Mitotracker se considera un marcador fluorescente específico de mitocondrias, que se acumula en el interior del organelo de manera dependiente del gradiente electroquímico. Como experimento control, se transfectaron células CHO con la construcción pcDNA3.1-EGFP (la EGFP sin MTS); en este caso, la fluorescencia de la

RESULTADOS

GFP no mostró el patrón punteado típico de las mitocondrias, lo que muestra que en ausencia de una secuencia de direccionamiento, la proteína EGFP expresada se distribuye de manera homogénea en el citosol (figura 14). Estos experimentos sugieren que la secuencia MTS del alga puede direccionar una proteína no mitocondrial a la mitocondria y de esta manera la secuencia MTS podría potencialmente dirigir las proteínas quiméricas ATP6 y COX3 a las mitocondrias del humano.

Ensayos de transfección con proteína ATP6 del alga (A6Cr-HA) y la proteína quimérica de ATP6 (A6Quim-HA).

Estudiamos también la posible incorporación de las proteínas ATP6, expresadas alotópicamente, a las mitocondrias de células en cultivo. Para ello transfectamos cíbridos homoplásmicos con la mutación mitocondrial T8993G con las construcciones A6Cr-HA y A6Quim-HA. Las células se incubaron durante 48 horas y posteriormente se incubaron con Mitotracker para marcar las mitocondrias. Al término de la incubación las células se fijaron y se permeabilizaron para realizar la inmunodetección de la proteína exógena utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA como primer anticuerpo seguido de un anticuerpo anti-rata acoplado a fluoresceína como segundo anticuerpo.

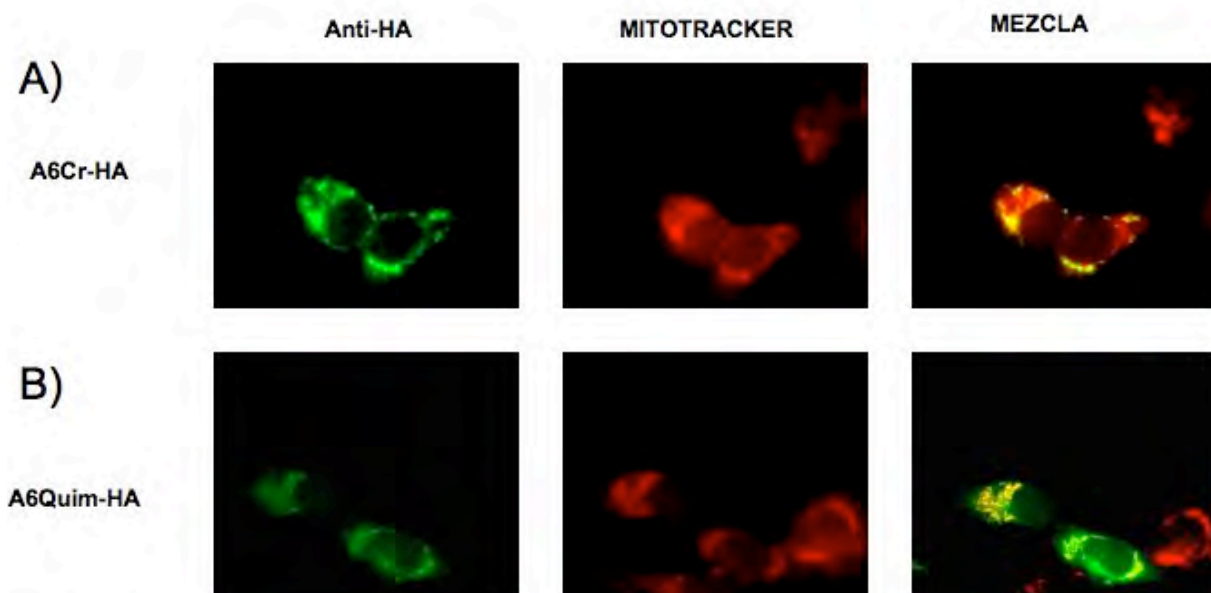
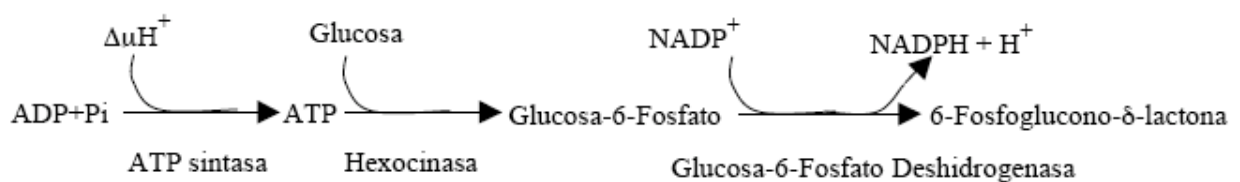


Figura 15. Cíbridos homoplásmicos para la mutación en el gen *atp6* mitocondrial, expresan la proteína ATP6 de *Chlamydomonas reinhardtii* (Panel A) o la proteína quimérica de ATP6 (Panel B). La microscopía de fluorescencia muestra una aparente acumulación de la proteína expresada en el compartimento mitocondrial, pues colocaliza con la señal del Mitotracker.

RESULTADOS

Los ensayos de microscopía de fluorescencia muestran que tanto la proteína ATP6 de *C. reinhardtii* (Fig. 15A) como la proteína quimérica ATP6 (Fig. 15B), se localizan aparentemente en la mitocondria, ya que se observa un patrón puntual de fluorescencia, así como la colocalización de la señal de la fluoresceína con la señal roja del Mitotracker.

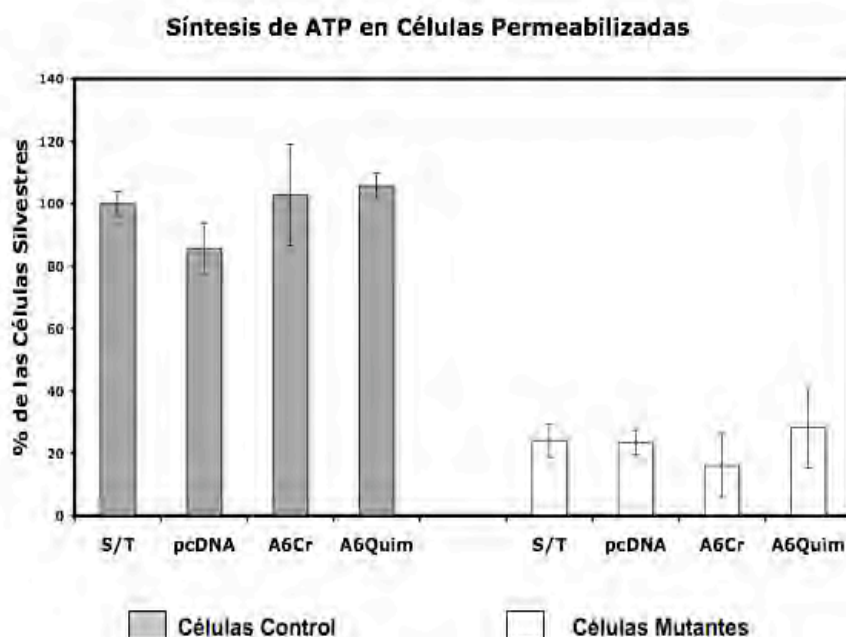
Posteriormente se analizaron las velocidades iniciales de síntesis de ATP en células transfectadas establemente con cada una de las construcciones y permeabilizadas con 25 μg de digitonina/mg de proteína, como lo describen James y colaboradores (James *et al.* 1999). La determinación del ATP se realizó mediante un método enzimático acoplado a la reducción de NADP^+ (Cortés-Hernández *et al.* 2007) basado en las siguientes reacciones:



Con dicha técnica, podemos seguir espectrofotométricamente la formación de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ por cada molécula de ATP que es sintetizada por la ATP sintasa.

Los resultados se muestran en la gráfica 1, como porcentaje de la velocidad inicial de síntesis de ATP determinada para las células silvestres 143B, que tiene un valor de 23.44 nmol de ATP/min mg de proteína. No observamos incremento en la velocidad de síntesis de ATP en las células mutantes en ATP6 transfectadas con nuestras versiones nucleares del gen *atp6*, ni con el *atp6* de *Chlamydomonas* ni con el *atp6* quimérico. Las velocidades de síntesis de ATP determinadas para las células control transfectadas con ambas construcciones o con el vector vacío tampoco presentaron variaciones.

Aunque los datos anteriores no sugerían una recuperación funcional, quisimos obtener evidencia bioquímica de la presencia de las proteínas ATP6 expresadas alotópicamente, pues formalmente existía la posibilidad de que la proteína ATP6 se integrara al complejo sin restaurar su funcionalidad. Con este fin, se purificó el Complejo V por inmunoprecipitación, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-F1 acoplado a esferas de agarosa (Aggeler *et al.* 2002). Posteriormente separamos la ATP sintasa en sus diferentes subunidades mediante un gel de poliacrilamida-SDS en gradiente del 4-12% (Figura16).



Gráfica 1. Velocidades iniciales de síntesis de ATP en células permeabilizadas con digitonina. Se presentan los resultados para las células control y las mutantes en el gen *atp6* mitocondrial, transfectadas con los genes *A6Cr*, *A6Quim*, o con el vector pcDNA3.1 vacío, permeabilizadas con digitonina. S/T, células sin transfectar.

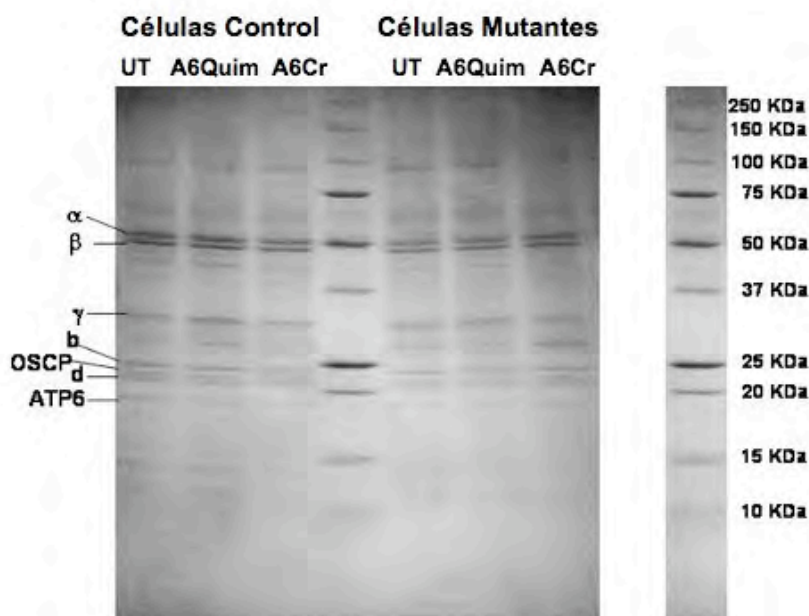


Figura 16. Gel de SDS-PAGE de la F_0F_1 ATP sintasa purificada por inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal 12F4AD8 (Anti- F_1) a partir de células control y de los híbridos mutantes en el gen *atp6* mitocondrial transfectados con los genes *atp6* de *Chlamydomonas* y quimérico (*A6Cr* y *A6Chim* respectivamente). Las subunidades fueron identificadas de acuerdo a Aggeler *et al* (2002). Las bandas marcadas como *b*, OSCP, *d* y ATP6 fueron identificadas además por espectrometría de masas. No se identificaron fragmentos de las proteínas expresadas alotópicamente.

RESULTADOS

No observamos diferencias entre el patrón polipeptídico del complejo V aislado de las células control con respecto al de las células transfectadas. Las bandas con un peso molecular aparente de entre 18 y 25 kDa (subunidades *b*, *d*, OSCP y ATP6) se recuperaron del gel y se sometieron a análisis por espectrometría de masas. Las secuencias de aminoácidos identificadas por secuenciación se muestran marcadas en negritas en las secuencias completas de la proteína a la que pertenecen:

Subunidad *b* ATP sintasa humana (CAA42782).

MLSRVVL SAAATAAPSLKNA AFLGPGVLQATRTFHTGQPHLVPVPPLPEYGGKVRYGLIP
EEFFQFLYPKTGVTGPYVLGTGLVLYALSKEIYVISAETFTALSVLGVMVYGIKKY**GPFVAD**
FADKLNEQKLAQLEEAKQASIQHIQNAIDTEKSQQALVQKRHYLFDVQRNNIAMALEVT
YRERLYRVYKEVKNRLDYHISVQNMRRKEQEHMINWVEKHVVQSISTQQEKETIAKCIA
DLKLLAKKAQAQPVM

Subunidad *d* isoforma *a* de la ATP sintasa humana (NP_006347.1).

MAGRKLALKT**IDWVAFAEI**IIPQNQKAIASSLK**SWNETLTSRLAALPENPPAIDWAYYYKANV**
AK**AGLVDDFEK**KFNALK**VPVPEDKYTAQVDAEEKEDVKSCAEWVSLSKARIVEYEKEME**
KM**KNLIPFDQMTI**EDLNEAFPETKLDK**KKYPYWPHQPIENL**

Subunidad OSCP de la ATP sintasa humana (NP_001688.1).

MAAPAVSGLSRQVRCFSTSVVRPFAK**LVRPPVQVYGI**EGRYATALYSAASK**QNKLEQVE**
KELLRVAQILKEPKVAASVLPYVKRSIKVKSLNDITAKERFSPLTTNLINLLAENGRSNT
QGVVSAFSTMMMSVHR**GEVPCTVTS**ASPLEEATLSELKTVLK**SFLSQGQVLKLEAKTDPSI**
LGGMIVRIGEKEYVDMSVKTKIQKLGRAMREIV

Subunidad ATP6 ATP sintasa humana (AAO66779).

MNENLFASFIAPTILGLPATVLIILFPPLLIPTSKYLINNRL**LITTQQWLIKLT**SK**QMMTMHNTK**
GRTWSLMLVSLIIFIATTNLLGLLPHSFTPTTQLSMNLAMAIPWAGAVIMGFRSKIKNALAH
FLPQGTPTPLIPMLVIIETISLLIQPMALAVRLTANITAGHLLMHLIGSATLAMSTINLPSTLIIFT
ILILLTILEIAVALIQAYVFTLLVSLYLHDNT

RESULTADOS

Se identificaron varios fragmentos correspondientes a las subunidades *b* (9 Fragmentos), OSCP (8 fragmentos) y *d* (10 fragmentos) en la ATP sintasa inmunoprecipitada ya sea a partir de células transfectadas o no transfectadas, en contraste, sólo logramos la identificación de 2 fragmentos de la subunidad ATP6 humana: el péptido QMMTMHNTK que se encontró en las células silvestres 143B transfectadas con el gen *A6Cr* del alga, y el péptido LITTQQWLIK, identificado en las células control 143B transfectadas con el vector vacío y en los híbridos mutantes en *atp6* transfectados con el gen quimérico (*A6Quim*). No se encontraron fragmentos peptídicos que permitieran la identificación de las proteínas expresadas alotópicamente. Se sabe que las proteínas altamente hidrofóbicas tripsinizadas y sometidas a espectrometría de masas no son fáciles de identificar y que el rendimiento de los fragmentos obtenidos es muy bajo (Mitra y Goshe 2009). Esto podría explicar el bajo número de polipéptidos recuperados de las proteínas ATP6. De cualquier modo, las proteínas *A6Cr* y *A6Quim* son menos hidrofóbicas que la proteína ATP6 humana (que pudimos detectar por espectrometría de masas), por lo que el hecho de no identificar ningún fragmento de las proteínas transfectadas puede tomarse como evidencia de que las proteínas exógenas simplemente no se integraron al complejo de la ATP sintasa. Este resultado, aunado al hecho de que tampoco se observa efecto de la transfección sobre la síntesis de ATP, nos indica que aún cuando la presecuencia de la ATP6 de *Chlamydomonas* puede dirigir las proteínas a las mitocondrias, las proteínas maduras parecen no integrarse al complejo de la ATPasa y por tanto, tampoco son capaces de restaurar la síntesis de ATP. No obstante, estos resultados negativos están en concordancia con reportes previos realizados por Bokori-Brown y Holt, quienes obtuvieron evidencia que las proteínas ATP6 alotópicas no se integran al complejo V y parecen formar agregados que se asocian de alguna manera a la mitocondria (Bokori-Brown y Holt 2006).

Ensayos de transfección de la proteína COX3 quimérica.

Realizamos ensayos de transfección en híbridos homoplásmicos con la ablación de 15 pares de bases en el gen *cox3* mitocondrial (Células 112.50) (Hoffbuhr *et al.* 2000). Las células fueron transfectadas con el gen quimérico *cox3HA* integrado en el vector pcDNA3.1; 48 horas después de la transfección, incubamos los híbridos transfectados con Mitotracker durante 40 minutos para marcar específicamente las mitocondrias (fue

RESULTADOS

necesario aumentar el tiempo de incubación con Mitotracker por que la tinción es dependiente del gradiente electroquímico, el cual está disminuido en estas células por la deficiencia funcional de la COX). Después realizamos una inmunotinción utilizando el anticuerpo monoclonal anti-HA como anticuerpo primario, y un anticuerpo anti-rata acoplado a fluoresceína como anticuerpo secundario. La figura 17 muestra la colocalización de la proteína quimérica COX3HA con Mitotracker, lo que sugiere que la proteína se dirigió hasta a la mitocondria.

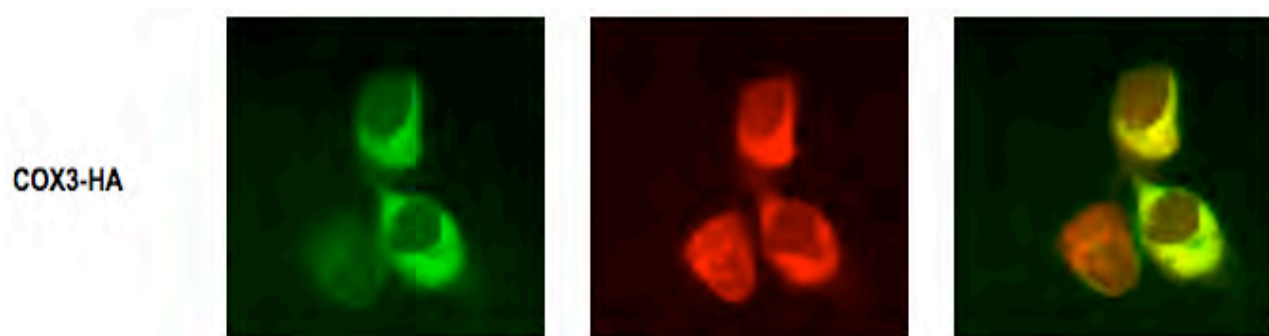


Figura 17. Colocalización de la proteína COX3-HA con Mitotracker en cíbridos homoplásmicos mutantes en el gen *cox3* mitocondrial

Se ha reportado que la subunidad COX2 es inestable en cíbridos homoplásmicos con la ablación de 15 pb en el gen *cox3* mitocondrial (Hoffbuhr *et al.* 2000). Este fenómeno ha sido atribuido a un incremento en la degradación de la proteína COX2 cuando la subunidad COX3 no es ensamblada adecuadamente en el complejo IV. Por lo tanto, decidimos confirmar la localización mitocondrial de la proteína quimérica COX3HA por una doble inmunotinción: primero teñimos la proteína quimérica utilizando el anticuerpo Anti-HA y el anticuerpo anti-rata acoplado a fluoresceína y después la proteína COX2 endógena usando un anticuerpo anti-COX2 y un anticuerpo anti-ratón acoplado al colorante Rojo Texas. El patrón punteado que muestra colocalización de la proteína exógena COX3HA con la proteína endógena COX2 sugiere que la proteína quimérica se encuentra en la mitocondria (Figuras 18 y 19).

Observamos de manera consistente que en estas inmunotinciones dobles la fluorescencia correspondiente a la proteína COX2 parecía ser más intensa en las células transfectadas y que expresaban la proteína COX3 quimérica en comparación con la que se observaba en las células no transfectadas. Esto podría interpretarse como evidencia

RESULTADOS

de una posible interacción entre la proteína COX3HA (sintetizada en el núcleo) y la proteína COX2 (sintetizada en la matriz mitocondrial). Sin embargo, cuando invertimos el orden de la tinción (primero inmunolocalizamos COX2 y luego COX3), la correlación entre expresión de la proteína quimérica y el aparente incremento en COX2 se perdió. Probablemente este falso incremento en COX2 se debió a una reacción cruzada del anticuerpo anti-ratón (que se adiciona al final de la inmunotinción) con los anticuerpos utilizados previamente para la tinción del epítipo HA. Esta reacción inespecífica no existe al invertir el orden de la tinción, por lo que no se observa ningún incremento en la fluorescencia de COX2 en células transfectadas con respecto a la que hay en células no transfectadas.

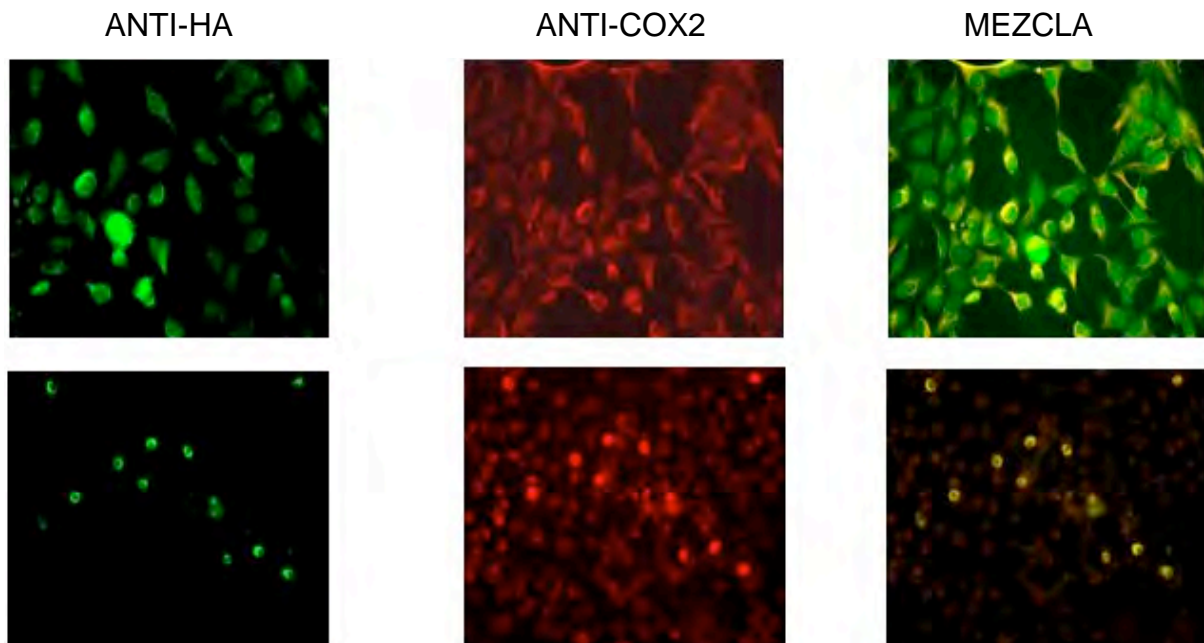


Figura 18. Colocalización de la proteína COX3-HA expresada alotópicamente con la proteína COX2, expresada desde el genoma mitocondrial, en cíbridos homoplásmicos mutantes en el gen *cox3* mitocondrial. La tinción de COX2 parece ser más intensa en las células transfectadas con el gen *Cox3-HA* quimérico (panel inferior).

Realizamos experimentos en los que pretendimos hacer una selección funcional de células mutantes en el gen *cox3* mitocondrial, transfectadas con el gen *cox3HA*. Esto lo hicimos de dos maneras, por un lado realizamos la transfección de las células mutantes, y 24 horas después de la transfección, cambiamos el medio de cultivo por DMEM sin uridina y sin piruvato. También sometimos a esta selección a cíbridos transfectados con el

RESULTADOS

gen *cox3HA* en el vector pcDNA y seleccionados tres semanas por medio del antibiótico G418 para obtener las clonas que habían incorporado en su genoma nuclear de manera estable el vector. Después de las tres semanas, las clonas sobrevivientes se sembraron en medio de cultivo sin uridina y sin piruvato. En ambos casos las células son capaces de sobrevivir por al menos tres semanas, pero son incapaces de multiplicarse, fenotipo muy similar al de los híbridos mutantes sin transfectar y al de las células rho0. Esto nos lleva a concluir que la proteína COX3HA no se ensambla en el complejo IV y por tanto no restaura la actividad respiratoria.

Importación *In vitro*.

Dado que habíamos demostrado por medio de inmunofluorescencia que la proteína ATP6 de *Chlamydomonas* y las proteínas ATP6 y COX3 quiméricas estaban asociadas a las mitocondrias, pero no observamos la incorporación de las subunidades A6Cr y A6Quim en el complejo de la ATP sintasa, ni tampoco que las proteínas expresadas alotópicamente fueran capaces de rescatar las deficiencias en la fosforilación oxidativa de las células transfectadas, pensamos que la importación de estas proteínas hidrofóbicas no se llevó a cabo. Decidimos realizar experimentos de importación *in vitro* para determinar si las proteínas quiméricas se importaban al interior de mitocondrias de mamífero.

Los ensayos de importación *in vitro* se realizaron con mitocondrias intactas de hígado de rata, utilizando proteínas sintetizadas *in vitro* y marcadas con S³⁵. Después de la incubación de las proteínas radioactivas con las mitocondrias acopladas, los precursores que son importados al interior de las mitocondrias son, como resultado de la importación, resistentes a la acción de proteasas añadidas externamente. Utilizamos a las proteínas COX3 quimérica y la proteína de fusión MTSA6-EGFP, ya que ambas proteínas parecían estar asociadas *in vivo* a las mitocondrias de células transfectadas con los genes *cox3-HA* y *MTSA6-EGFP* (Figuras 14, 17 y 18). Incluimos en nuestros experimentos los controles apropiados, para el control negativo realizamos ensayos de importación en presencia de desacoplantes e inhibidores respiratorios (antimicina, valinomicina y oligomicina, o mezcla AVO) en donde el gradiente electroquímico es abolido y por tanto se inhibe la importación. Como control positivo utilizamos el precursor de la ALDH de rata (aldehído deshidrogenasa mitocondrial), pues sabemos que esta proteína se importa *in*

RESULTADOS

in vitro en mitocondrias aislada de rata y es procesada en la matriz mitocondrial. Resultados representativos de los experimentos de importación se observan en la figura 19.

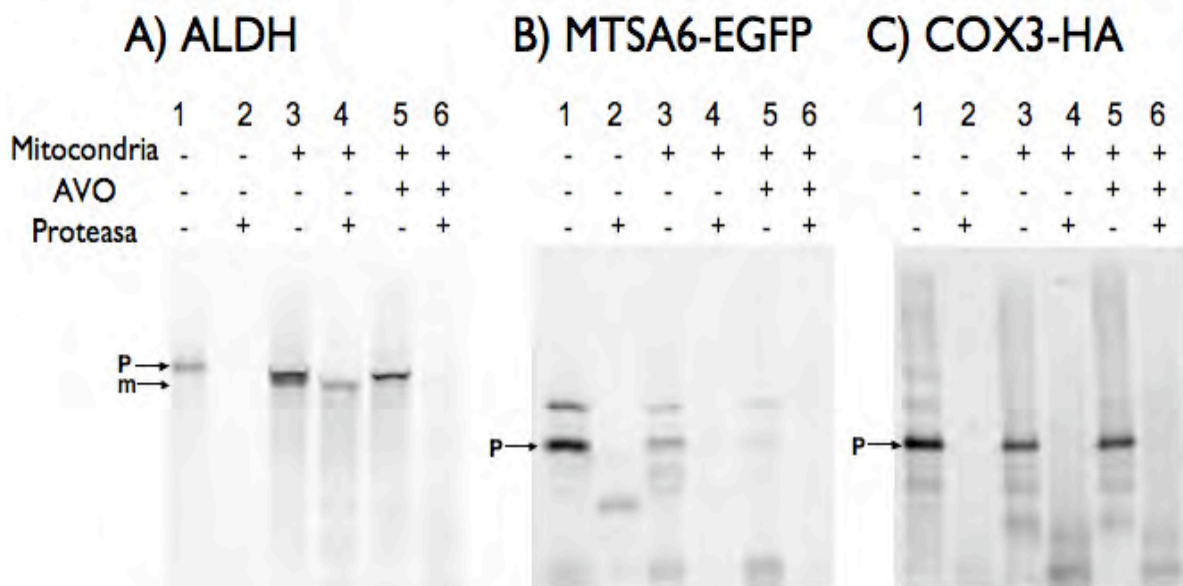


Figura 19. Importación *in vitro* de las proteínas COX3-HA y MTSA6-GFP en mitocondrias aisladas de hígado de rata. No se observa importación de las proteínas quiméricas en mitocondrias aisladas de hígado de rata, pues no se encontró resistencia al tratamiento con proteasas después de la reacción de importación. Utilizamos como control positivo de la importación al precursor de la aldehído deshidrogenasa de rata (ALDH), la cual es procesada a su forma madura y presenta resistencia a proteasas. La importación del control se inhibe en presencia de una mezcla de antimicina, valinomicina y oligomicina (AVO). La proteína con presecuencia (proteína precursora) está marcada como **p**, y la proteína madura como **m**.

La proteína ALDH es importada y procesada correctamente, pues se observan las bandas polipeptídicas correspondientes a la preproteína y a la proteína madura cuando el precursor radioactivo se incuba con mitocondrias intactas de rata (Figura 19-A, carril 3). Además, la banda correspondiente a la proteína madura es resistente a proteasas adicionadas después de la reacción de importación, lo que indica que la proteína no está accesible a la proteasa (Figura 19-A carril 4). La importación es totalmente dependiente del gradiente electroquímico, pues se inhibe con AVO (Figura 19-A, carriles 5 y 6). En el caso de las proteínas quiméricas COX3-HA y MTSA6-GFP no observamos protección a la digestión con proteasas en ningún caso (Figuras 19 B y C, carriles 4 y 6 de cada panel).

RESULTADOS

Este último resultado implica que las proteínas COX3HA y MTSA6-GFP no son importadas en mitocondrias de mamífero *in vitro* en las condiciones exploradas.

Aunque resulta imposible extrapolar los resultados de importación *in vitro* con las observaciones obtenidas *in vivo*, el conjunto de resultados sugiere que las proteínas quiméricas expresadas alotópicamente se dirigen a la mitocondria, pero no se internalizan en el organelo, y por lo tanto, no se incorporan funcionalmente en su complejo correspondiente.

DISCUSIÓN.

Se han propuesto varias alternativas para el tratamiento de enfermedades causadas por mutaciones en el DNA mitocondrial, y entre estas alternativas se encuentra la expresión alotópica. Esta estrategia resulta atractiva debido a que, en caso de ser exitosa, podría usarse para el tratamiento de enfermedades homoplásmicas o heteroplásmicas, y sobre todo por que potencialmente, la proteína expresada alotópicamente podría llegar a todas las mitocondrias en la célula (Doyle y Chan 2008). Para poder lograr la expresión alotópica de genes mitocondriales, éstos deben ser modificados de varias maneras para poder ser expresados desde el núcleo. Las modificaciones obvias son homologar el código genético con el código genético universal y añadir un péptido señal que sea capaz de dirigir a las proteínas resultantes a la mitocondria.

Como ya se indicó, en la literatura se han reportado numerosos intentos de expresión alotópica recodificando los genes mitocondriales y utilizando MTS de diferentes proteínas y longitudes bien caracterizadas: ATP9 de *Neurospora crassa* (Gearing y Nagley 1986) (Nagley *et al.* 1988; Law *et al.* 1990), COX2 de soya (Daley *et al.* 2002), COX VIII de humano (Manfredi *et al.* 2002; Oca-Cossio *et al.* 2003), la isoforma P1 de la subunidad c de la ATP sintasa humana (Manfredi *et al.* 2002; Oca-Cossio *et al.* 2003), nicotinamida nucleótido transhidrogenasa humana (Oca-Cossio *et al.* 2003) SOD2, COX10 humanas (Bonnet *et al.* 2007), ATP6 de *Chlamydomonas* (Ojaimi *et al.* 2002; Bokori-Brown y Holt 2006) y Oxa1 de levadura (Supekova *et al.* 2010), sin embargo los resultados que se han reportado no son concluyentes. Por un lado hay grupos que reportan que las proteínas expresadas alotópicamente son dirigidas a la mitocondria, importadas, ensambladas en el complejo que les corresponde y capaces de corregir el defecto funcional generado por mutaciones en el DNA mitocondrial (Gearing y Nagley 1986; Manfredi *et al.* 2002; Ojaimi *et al.* 2002; Bonnet *et al.* 2007), mientras que otros grupos, utilizando construcciones similares y las mismas líneas celulares, encuentran que las proteínas con más de dos cruces transmembranales no son importadas a la mitocondria y por tanto no hay recuperación de la síntesis de ATP (Oca-Cossio *et al.* 2003; Bokori-Brown y Holt 2006).

La alta hidrofobicidad de las proteínas, particularmente en los primeros 100 aminoácidos, parece ser una de las mayores barreras para la expresión alotópica exitosa de proteínas membranales (Oca-Cossio *et al.* 2003). Esto sugiere que la reducción en la hidrofobicidad media de algunas proteínas podría facilitar su importación al interior de las

DISCUSIÓN

mitocondrias (Claros *et al.* 1995; Daley *et al.* 2002; González-Halphen *et al.* 2004). Por ejemplo, se ha demostrado que al cambiar aminoácidos hidrofóbicos por residuos menos hidrofóbicos en la proteína COX2 (particularmente en el primer cruce transmembranal) se puede lograr la importación *in vitro* de la proteína en mitocondrias aisladas de soya (Daley *et al.* 2002), o la importación *in vivo* de COX2 en levadura (Supekova *et al.* 2010).

En nuestro trabajo, estudiamos la expresión alotópica de dos proteínas pertenecientes a diferentes complejos de la fosforilación oxidativa, ATP6 (componente de la ATP sintasa) que tiene 5 cruces transmembranales y COX3 (subunidad de la citocromo *c* oxidasa) con 7 cruces transmembranales. Estos polipéptidos son codificados en el DNA mitocondrial en la gran mayoría de los organismos eucariontes, pero están codificados en el genoma nuclear en el alga verde *C. reinhardtii* y en algunas otras algas relacionadas (Funes *et al.* 2002; Pérez-Martínez *et al.* 2002; Cardol *et al.* 2006).

Nuestro trabajo se diferencia de trabajos previos en que intentamos aprovechar el conocimiento de cómo *C. reinhardtii* y otras algas cercanas han logrado de manera natural transferir los genes de proteínas muy hidrofóbicas al núcleo y después lograr la incorporación de las subunidades correspondientes en sus respectivos complejos respiratorios. En primer lugar, no sólo recodificamos los genes mitocondriales para que utilizaran el código genético nuclear, sino que realizamos cambios de aminoácidos específicos por residuos de aminoácidos menos hidrofóbicos que usa la propia *Chlamydomonas* en las mismas regiones de la proteína. Así logramos perfiles de hidrofobicidad similares a los que presentan las proteínas maduras del alga (Figuras 11 y 12), pero sin modificar las regiones de las proteínas que son importantes para la función de la proteína o para su interacción con otras subunidades (Funes *et al.* 2002; Varanasi *et al.* 2006). Creímos que esta reducción en la hidrofobicidad media de las proteínas haría nuestras proteínas quiméricas más “importables”, ya que se ha demostrado que en el caso de COX2 de levadura y de soya basta que se sustituyan unos pocos aminoácidos hidrofóbicos para permitir la importación de estas proteínas a la mitocondria, ya sea *in vitro* (Daley *et al.* 2002) o *in vivo* (Supekova *et al.* 2010).

Añadimos también a nuestras proteínas quiméricas las presecuencias de ATP6 y COX3 de *Chlamydomonas* (de 106 y 110 residuos de aminoácidos respectivamente), por que pensamos que la longitud y estructura de estas proteínas podría ser importante para la importación y ensamblaje de estas proteínas hidrofóbicas. Se ha demostrado que las presecuencias largas obtenidas por la duplicación en tándem de una presecuencia más pequeña hace más eficiente la importación de proteínas (Galanis *et al.* 1991), y también

se mostró que en el caso de COX2 de soya, la cual presenta una presecuencia de 136 aminoácidos, la MTS no puede ser substituida por otras presecuencias. Dicha MTS de 130 aminoácidos parece ser una señal tripartita necesaria para la correcta inserción de la proteína en la membrana interna mitocondrial (Daley *et al.* 2002). Nosotros hemos sugerido además, que la presecuencia podría actuar como una chaperona intramolecular, cubriendo las partes mas hidrofóbicas de las proteínas por medio de la interacción de la región no polar de la MTS, dejando la parte polar expuesta al solvente y evitando con ello la agregación de la proteína en el citosol (Figuroa-Martínez *et al.* 2008).

El problema de utilizar las presecuencias de *Chlamydomonas*, es que existe el riesgo de que éstas no sean reconocidas por la maquinaria de importación de células de mamífero. Por esta razón y con la idea de avanzar más en nuestro entendimiento de cómo *Chlamydomonas* logra importar proteínas mitocondriales tan hidrofóbicas, nos dimos a la tarea de reconstruir la maquinaria de importación de proteínas de *Chlamydomonas in silico* (Figura 13).

Todos los principales complejos de translocación de proteínas parecen estar presentes en *Chlamydomonas*, sin embargo, no logramos identificar componentes de la maquinaria de importación homólogos a las proteínas de levadura que presentan grandes regiones hidrofílicas expuestas hacia el citosol o hacia el espacio intermembranal y que se ha sugerido que podrían ser importantes para el reconocimiento de las proteínas precursoras. Dado que al parecer estos elementos no están conservados entre las plantas, levaduras y mamíferos, hemos propuesto que estos receptores podrían haber surgido en etapas tardías de la evolución y que podrían reflejar la singularidad de cada sistema (Figuroa-Martínez *et al.* 2008).

En el caso particular de *Chlamydomonas*, los homólogos a las proteínas receptoras podrían participar en el reconocimiento de las largas presecuencias presentes en las preproteínas con destino mitocondrial características de las proteínas hidrofóbicas como ATP6 y COX3. Sin embargo, se requiere un enfoque experimental diferente al que nosotros utilizamos para poder identificar el resto de la maquinaria de importación de proteínas, enfocándose particularmente en los elementos que podrían ser los substitutos de las proteínas Tom70, Mim1, Mas37, Tim54, Tim21 y Tim18 (Figuroa-Martínez *et al.* 2008). De cualquier forma, el análisis del genoma de *Chlamydomonas* nos permitió determinar que el alga posee los elementos mínimos de importación de proteínas y por lo tanto el proceso de translocación debe ser similar al que se ha descrito en otros

organismos, aún cuando no tenga todos los elementos clásicos que funcionan como receptores.

Aunado al estudio *in silico*, realizamos pruebas *in vivo* para determinar si las presecuencias de ATP6 y COX3 de *Chlamydomonas* podrían ser reconocidas por las mitocondrias de mamífero. En nuestros experimentos, todas las proteínas que ensayamos (las proteínas quiméricas de COX3 y ATP6, la proteína ATP6 de *Chlamydomonas* y la proteína de fusión de la GFP con la presecuencia de la proteína ATP6 del alga) son direccionadas a la mitocondria, como se puede observar en los experimentos de microscopía en donde las proteínas exógenas colocalizan con el colorante específico de mitocondrias Mitotracker o con COX2, una proteína sintetizada dentro de la mitocondria. Lo anterior implica que la maquinaria de importación de las mitocondrias de humano es capaz de reconocer la MTS del alga, un organismo muy alejado filogenéticamente, aún cuando es probable que algunos de los elementos de reconocimiento de las presecuencias (como el caso de Tom70) no son compartidos en ambos organismos.

Podemos asumir entonces que la estructura secundaria de alfa hélice anfipática de las proteínas del alga, reportada y analizada en trabajos previos (González-Halphen *et al.* 2004), es suficiente para el reconocimiento de las proteínas en ambos organismos. Al hacer el análisis de las proteínas mitocondriales COX3 y ATP6 de *Chlamydomonas* con programas que predicen péptidos señal (MITOPRED, PTARGET), siempre se identificó en el extremo amino terminal una MTS no mayor de 40 aminoácidos. De esto podemos inferir tres puntos: primero que esa es la parte de la proteína que es reconocida por los receptores de las mitocondrias de mamífero, en la que se sabe que Tom70 (ausente en *Chlamydomonas*) está implicada. Segundo, que probablemente exista un receptor en *Chlamydomonas* que tiene la función de Tom70, y que aunque no compartan secuencia de aminoácidos, reconocen la misma clase de estructuras secundarias. Por último, sí sólo la primera región de la proteína es suficiente para ser reconocida por la translocasa de la membrana externa, el resto de la presecuencia debe tener función en la maduración e inserción de las proteínas en la membrana interna mitocondrial como se ha propuesto para COX2 de soya (Daley *et al.* 2002) o puede ser útil para evitar la agregación de las proteínas en el citosol (Figueroa-Martínez *et al.* 2008).

Debemos señalar que el dato de la colocalización de las proteínas alotópicamente expresadas con la mitocondria no debe ser tomado como señal inequívoca de que las proteínas están dentro de la mitocondria, pues hay que recordar que la microscopía de

fluorescencia no tiene la resolución suficiente para poder asegurarlo. Esto se comprueba por el hecho de que aún cuando las proteínas exógenas parecen estar en la mitocondria, las proteínas quiméricas COX3 y ATP6 no fueron capaces de suprimir el daño en la fosforilación oxidativa causadas por mutaciones en el genoma mitocondrial. Las células homoplásmicas mutantes en el gen *atp6* (T8993G), transfectadas con los genes *atp6* del alga o quimérico no mostraron ningún incremento en la síntesis de ATP, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Más aún, no fuimos capaces de identificar a las proteínas transfectadas por espectrometría de masas en las bandas aisladas a partir de la inmunoprecipitación de la ATP sintasa, en el caso de las variantes de ATP6, lo que sugiere que ni la proteína ATP6 del alga ni la ATP quimérica son incorporados al complejo V. En el caso de las células con ablación en el gen *cox3* mitocondrial transfectadas con el gen quimérico *cox3-HA*, tampoco obtuvimos recuperación de la actividad, pues no fueron capaces de crecer en medio de cultivo sin uridina y sin piruvato, lo cual requiere apenas entre el 1-2 % de DNAm silvestre para poder crecer en esas condiciones (Hoffbuhr *et al.* 2000).

Nuestros resultados difieren de lo reportado en la literatura, donde se afirma que la expresión alotópica de la proteína ATP6 restaura totalmente la actividad de la ATP sintasa (Manfredi *et al.* 2002; Bonnet *et al.* 2007). Se reportó también que la proteína ATP6 del alga *Chlamydomonas* fue identificada por inmunoréplicas tipo western blot como parte de un complejo de alto peso molecular, probablemente en asociación con la ATP sintasa (Ojaimi *et al.* 2002). Sin embargo unos pocos años después, Bokori-Brown y Holt (utilizando las mismas células mutantes y las mismas construcciones con los genes exógenos) mostraron que la proteína ATP6 de *Chlamydomonas* expresada alotópicamente si forma parte de un complejo de alto peso molecular, pero no en la ATP sintasa sino mas bien en agregados proteicos independientes. Además, en concordancia con nuestros resultados, Bokori-Brown y Holt no detectaron ningún incremento en la síntesis de ATP de las células transfectadas con diferentes variantes de la proteína ATP6 (Bokori-Brown y Holt 2006).

Un punto más que probamos en el presente trabajo, es la de verificar si las proteínas quiméricas podían ser importadas *in vitro* en mitocondrias de mamífero. En nuestros experimentos, no logramos la importación *in vitro* de la proteína COX3HA ni de la proteína de fusión de la GFP utilizando la presecuencia de ATP6 de *Chlamydomonas* en mitocondrias aisladas de rata, mientras que nuestro control positivo de ALDH fue

importado y procesado eficientemente de manera dependiente del gradiente electroquímico.

Nuestros resultados de importación *in vitro* son consistentes con los que obtuvieron Bokori-Brown y Holt, quienes mostraron que *in vivo* la proteína ATP6 expresada alotópicamente está asociada a la mitocondria, pero no está dentro de ella, pues es sensible a concentraciones crecientes de proteasas. Argumentan que las proteínas hidrofóbicas no son translocadas a través de las dos membranas mitocondriales y que se inmovilizan en la maquinaria de importación, o bien formando agregados en la periferia de la mitocondria (Bokori-Brown y Holt 2006).

Zullo reportó que la proteína ATP6 humana con la MTS de la ornitil transcarbamilasa humana puede ser importada *in vitro* en mitocondrias de levadura, y que la proteína importada es procesada y resistente a la degradación por proteasas (Zullo *et al.* 2005), resultado contrario al que nosotros obtuvimos. Sin embargo en el trabajo mencionado no se demostró que los resultados de importación *in vitro* sean dependientes del gradiente electroquímico. Sin ese control se puede argumentar que la importación podría ser un falso positivo, dado que al adicionar proteasas al final de la reacción de importación, la MTS hidrofílica es degradada (lo que podría confundirse con procesamiento de la presecuencia) mientras que las regiones hidrofóbicas de la proteína no son accesibles a las proteasas (lo que podría ser interpretada como resistencia a la proteasa por estar protegida por las membranas mitocondriales). Al final sólo se observa en la autorradiografía una banda de menor peso molecular que la proteína precursora, lo cual creemos que se interpretó erróneamente como la proteína madura importada.

En nuestro trabajo utilizamos dos sistemas diferentes: células homoplásmicas para la mutación T8993G en el gen *atp6* (Carrozzo *et al.* 2004) y células homoplásmicas para una ablación en el gen *cox3* mitocondrial (Hoffbuhr *et al.* 2000). En el primer caso, se trata de una mutación puntual y como consecuencia la proteína ATP6 es sintetizada con una sustitución de aminoácido, pero aún así se integra en el complejo V (Cortés-Hernández *et al.* 2007). En el segundo caso, la mutación trae como consecuencia que la proteína COX3 mutante sea degradada y que no haya ensamblaje del complejo IV (Hoffbuhr *et al.* 2000). Estos sistemas abordan dos escenarios distintos: en el primero la proteína expresada alotópicamente compete con la proteína mutante sintetizada en el organelo para insertarse en la holoenzima, mientras que en el segundo, la proteína alotópica tiene muy poca o ninguna competencia con la proteína sintetizada en la mitocondria por los sitios de unión en la holoenzima.

DISCUSIÓN

Como ejemplo de que tan importante es la competencia por el sitio de ensamblaje en los complejos de la fosforilación oxidativa, y como esto puede limitar la expresión alotópica, tenemos el caso de la proteína ATP8, la cual es importada en mitocondrias aisladas de levadura y ensamblada en el complejo V sólo cuando el gen *atp8* mitocondrial es inactivado totalmente y no en mitocondrias silvestres que son capaces de sintetizar la subunidad ATP8 dentro del organelo (Farrell *et al.* 1988; Law *et al.* 1990). Esto hace difícil de entender los reportes de expresión alotópica exitosa en los que se obtiene una completa recuperación en la síntesis de ATP cuando se expresan las subunidades ATP6 o NAD4 en células con mutaciones puntuales (Bonnet *et al.* 2007; Bonnet *et al.* 2008), ya que implica que la proteína citosólica desplaza al 100% a la subunidad mitocondrial en cada uno de los complejos presentes en las células transfectadas, situación que consideramos muy poco factible *in vivo*.

CONCLUSIONES.

En conclusión, la posibilidad de tratamiento de enfermedades mitocondriales por medio de la expresión alotópica parece aún lejana. Hasta ahora solo hay tres reportes en los que se ha mostrado evidencia bioquímica y evidencia funcional de la incorporación de proteínas expresadas alotópicamente en los complejos de la fosforilación oxidativa, ATP8 en levaduras (Law *et al.* 1990), ND7 en tabaco (Daley *et al.* 2002), y más recientemente COX2 en levaduras (Supekova *et al.* 2010). Hay algunas características que creemos son claves para la expresión alotópica exitosa en estos trabajos: las proteínas son hidrofóbicas, pero no presentan más de dos cruces transmembranales, los genes mitocondriales que codifican para estas proteínas han sido transferidos exitosamente al genoma nuclear en organismos relacionados, y por último, la expresión alotópica se llevó a cabo en organismos mutantes en los que la copia mitocondrial había sido eliminada completamente, lo cual evita competencia entre la subunidad sintetizada en el citosol con la subunidad sintetizada en la mitocondria.

Es importante señalar que aún cuando en nuestros modelos los genes *atp6* y *cox3* no han sido completamente eliminados del DNA mitocondrial, trabajamos bajo dos panoramas: en el caso del gen *atp6* la mutación es puntual y aún cuando la síntesis de ATP se ve afectada, la proteína aún se integra a la ATPasa (Cortés-Hernández *et al.* 2007) por lo que en este caso tendríamos competencia con la subunidad endógena. En el caso del gen *cox3*, la ablación conduce a una falla en el ensamblaje de la citocromo c oxidasa, por lo que tenemos un sistema parecido al que tendríamos si el gen *cox3* estuviera interrumpido. En ninguno de los dos casos logramos que las proteínas quiméricas se integraran en sus respectivos complejos. Probablemente el problema es a nivel de la importación de las proteínas, pues como vimos, COX3 no es importada *in vitro*.

Finalmente, hay que decir que aún pensamos que *C. reinhardtii* es útil como modelo de la migración natural de genes de la mitocondria al núcleo, y que es altamente probable que existan otros elementos en la maquinaria de importación de esta alga que estén involucrados en la eficiente importación y ensamblaje de proteínas hidrofóbicas en las mitocondrias de *Chlamydomonas* que aún es necesario identificar y caracterizar, antes de lograr imitar el proceso para el tratamiento de células humanas con mutaciones en el DNA mitocondrial.

CONCLUSIONES

La expresión de proteínas mitocondriales hidrofóbicas desde el citosol y su eventual inserción en la mitocondria, sigue siendo un objetivo interesante por perseguir y su eventual logro sentará las bases para el desarrollo de una terapia génica para síndromes mitocondriales en el humano.

PERSPECTIVAS.

A partir del trabajo de doctorado realizado y de las conclusiones a las que hemos llegado respecto a la expresión alotópica de genes mitocondriales para la corrección de mutaciones en el genoma mitocondrial, se pueden plantear varias líneas para continuar la investigación en trabajos posteriores:

En primer lugar, dado que sólo hay evidencia de expresión alotópica exitosa en modelos en donde la proteína exógena no tiene competencia por los sitios de unión o de ensamblaje con las proteínas sintetizadas dentro del organelo, podemos intentar la expresión alotópica de genes mitocondriales como *cox2* y *cox3* en levadura, en donde se cuentan con mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* en los que dichos genes mitocondriales han sido interrumpidos o completamente eliminados por medio de balística. El modelo en levadura tiene la ventaja de que es más sencillo el tamizaje de las clonas transformadas para encontrar clonas en las que la proteína alotópica compense la ablación del gen mitocondrial, al poder sembrar las clonas en medios de cultivo con sustratos fermentativos u oxidativos.

También de nuestro trabajo se deriva el hecho de que algunas de las proteínas con grandes regiones hidrofílicas, que forman parte de la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria y que podrían estar implicadas en el reconocimiento de las presecuencias están ausentes en *Chlamydomonas*. Aparentemente, estas proteínas no están conservadas entre plantas, mamíferos y hongos. Hemos propuesto que quizá estas proteínas son especie-específicas y que podrían ser la clave para la importación de proteínas hidrofóbicas en *Chlamydomonas*. Tenemos además experimentos preliminares en los que al parecer, algunas proteínas mitocondriales de levadura y de mamífero no se importan o no son procesadas *in vitro* en mitocondrias de algas y viceversa. Por lo tanto, podemos plantear la realización experimentos de importación *in vitro* para demostrar si las MTS son específicas para cada especie. En nuestro laboratorio hemos ya estandarizado los experimentos de importación *in vitro* en mitocondrias aisladas de rata, de levadura y del alga *Pollytomella* y contamos con controles de proteínas que se importan *in vitro* en cada una de esas especies. Estas herramientas podrían ayudarnos a determinar la especificidad de las presecuencias y la selectividad de las maquinarias de importación de proteínas en las mitocondrias de cada uno de nuestros modelos de estudio.

PERSPECTIVAS

Siguiendo con la línea de las MTS, consideramos importante explotar nuestro modelo *in vitro* de los cíbridos homoplásmicos con la ablación en el gen *cox3* mitocondrial. Proponemos entonces, seguir trabajando con la proteína COX3 quimérica que construimos en este trabajo, y utilizar MTS's de varias proteínas mitocondriales humanas, particularmente aquellas que se han reportado en otros trabajos de expresión alotópica, entre ellas la isoforma P1 de la subunidad *c* de la ATP sintasa, la MTS de la subunidad COX IV, la MTS de OXA1 entre otras. Creemos que cualquiera que sea el resultado de estos experimentos, darían una pauta de cómo superar las barreras que impiden la expresión alotópica de proteínas hidrofóbicas en células humanas.

REFERENCIAS.

Adams, K. L., H. C. Ong, et al. (2001). "Mitochondrial gene transfer in pieces: fission of the ribosomal protein gene rpl2 and partial or complete gene transfer to the nucleus." Mol Biol Evol 18(12): 2289-97.

Adams, K. L., K. Song, et al. (1999). "Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial cox2 genes in legumes." Proc Natl Acad Sci U S A 96(24): 13863-8.

Aggeler, R., J. Coons, et al. (2002). "A functionally active human F1F0 ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies." J Biol Chem 277(37): 33906-12.

Bittner-Eddy, P., A. F. Monroy, et al. (1994). "Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*." J Mol Biol 235(3): 881-97.

Blanchard, J. L. and G. W. Schmidt (1996). "Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns." Mol Biol Evol 13(3): 537-48.

Bohnert, M., N. Pfanner, et al. (2007). "A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins." FEBS Lett 581(15): 2802-10.

Bokori-Brown, M. and I. J. Holt (2006). "Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase." Rejuvenation Res 9(4): 455-69.

Bonnet, C., S. Augustin, et al. (2008). "The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes." Biochim Biophys Acta 1783(10): 1707-17.

Bonnet, C., V. Kaltimbacher, et al. (2007). "Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or v subunits." Rejuvenation Res 10(2): 127-44.

Brennicke, A., L. Grohmann, et al. (1993). "The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants." FEBS Lett 325(1-2): 140-5.

Capaldi, R. A. (1990). "Structure and function of cytochrome c oxidase." Annu Rev Biochem 59: 569-96.

Cardol, P., M. Lapaille, et al. (2006). "ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme." Eukaryot Cell 5(9): 1460-7.

Carrozzo, R., T. Rizza, et al. (2004). "Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis." J Neurochem 90(2): 490-501.

REFERENCIAS

- Cavadini, P., O. Gakh, et al. (2002). "Protein import and processing reconstituted with isolated rat liver mitochondria and recombinant mitochondrial processing peptidase." Methods 26(4): 298-306.
- Cavalier-Smith, T. (2002). "The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa." Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 2): 297-354.
- Claros, M. G., J. Perea, et al. (1995). "Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b." Eur J Biochem 228(3): 762-71.
- Claros, M. G. and G. von Heijne (1994). "TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions." Comput Appl Biosci 10(6): 685-6.
- Cortés-Hernández, P., M. E. Vázquez-Memije, et al. (2007). "ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1F0-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization." J Biol Chem 282(2): 1051-8.
- Daley, D. O., K. L. Adams, et al. (2002). "Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2." Plant J 30(1): 11-21.
- Daley, D. O., R. Clifton, et al. (2002). "Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A 99(16): 10510-5.
- DiMauro, S. and A. L. Andreu (2000). "Mutations in mtDNA: are we scraping the bottom of the barrel?" Brain Pathol 10(3): 431-41.
- DiMauro, S., M. Hirano, et al. (2006). "Approaches to the treatment of mitochondrial diseases." Muscle Nerve 34(3): 265-83.
- Doyle, S. R. and C. K. Chan (2008). "Mitochondrial gene therapy: an evaluation of strategies for the treatment of mitochondrial DNA disorders." Hum Gene Ther 19(12): 1335-48.
- Farrell, L. B., D. P. Gearing, et al. (1988). "Reprogrammed expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex of *Saccharomyces cerevisiae*. Expression in vitro from a chemically synthesized gene and import into isolated mitochondria." Eur J Biochem 173(1): 131-7.
- Feagin, J. E. (2000). "Mitochondrial genome diversity in parasites." Int J Parasitol 30(4): 371-90.
- Figueroa-Martínez, F., S. Funes, et al. (2008). "Reconstructing the mitochondrial protein import machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*." Genetics 179(1): 149-55.
- Funes, S., E. Davidson, et al. (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(8): 6051-8.

REFERENCIAS

- Galanis, M., R. J. Devenish, et al. (1991). "Duplication of leader sequence for protein targeting to mitochondria leads to increased import efficiency." FEBS Lett 282(2): 425-30.
- García, J. J., cols (2002). Recent research developments in human mitochondrial myopathies. Kerala, India, TRivandrum.
- García, J. J., I. Ogilvie, et al. (2000). "Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtdna." J Biol Chem 275(15): 11075-81.
- Gearing, D. P. and P. Nagley (1986). "Yeast mitochondrial ATPase subunit 8, normally a mitochondrial gene product, expressed in vitro and imported back into the organelle." EMBO J 5(13): 3651-5.
- González-Halphen, D., S. Funes, et al. (2004). "Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system." Ann N Y Acad Sci 1019: 232-9.
- Gray, M. W., G. Burger, et al. (1999). "Mitochondrial evolution." Science 283(5407): 1476-81.
- Gresser, M. J., J. A. Myers, et al. (1982). "Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model." J Biol Chem 257(20): 12030-8.
- Hoffbuhr, K. C., E. Davidson, et al. (2000). "A pathogenic 15-base pair deletion in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit III results in the absence of functional cytochrome c oxidase." J Biol Chem 275(18): 13994-4003.
- Holt, I. J., A. E. Harding, et al. (1990). "A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy." Am J Hum Genet 46(3): 428-33.
- James, A. M., P. W. Sheard, et al. (1999). "Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations." Eur J Biochem 259(1-2): 462-9.
- Kaltimbacher, V., C. Bonnet, et al. (2006). "mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein." RNA 12(7): 1408-17.
- Kayalar, C., J. Rosing, et al. (1977). "An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions." J Biol Chem 252(8): 2486-91.
- Keightley, J. A., K. C. Hoffbuhr, et al. (1996). "A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria." Nat Genet 12(4): 410-6.

REFERENCIAS

- King, M. P. and G. Attardi (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." Science 246(4929): 500-3.
- Kyriakouli, D. S., P. Boesch, et al. (2008). "Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease." Gene Ther 15(14): 1017-23.
- Lang, B. F., G. Burger, et al. (1997). "An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature." Nature 387(6632): 493-7.
- Lang, B. F., M. W. Gray, et al. (1999). "Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes." Annu Rev Genet 33: 351-97.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics 23(21): 2947-8.
- Law, R. H., R. J. Devenish, et al. (1990). "Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria." Eur J Biochem 188(2): 421-9.
- Manfredi, G., J. Fu, et al. (2002). "Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus." Nat Genet 30(4): 394-9.
- Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cell. New Heaven, Ct, Yale University Press.
- Martin, W. and M. Muller (1998). "The hydrogen hypothesis for the first eukaryote." Nature 392(6671): 37-41.
- Maul, J. E., J. W. Lilly, et al. (2002). "The Chlamydomonas reinhardtii plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats." Plant Cell 14(11): 2659-79.
- McBride, H. M., M. Neuspiel, et al. (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse." Curr Biol 16(14): R551-60.
- Merchant, S. S., S. E. Prochnik, et al. (2007). "The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions." Science 318(5848): 245-50.
- Mitra, S. K. and M. B. Goshe (2009). "Cysteinylation-tagging of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Methods Mol Biol 528: 311-26.
- Moreira, D. and P. Lopez-Garcia (1998). "Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis." J Mol Evol 47(5): 517-30.
- Nagley, P., L. B. Farrell, et al. (1988). "Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle." Proc Natl Acad Sci U S A 85(7): 2091-5.
- Nagley, P. a. D. R. (1989). "Leading organellar proteins along new pathways: the relocation of mitochondrial and chloroplast genes to the nucleus." Trends Biochem Sci 14(1): 31-35.

REFERENCIAS

- Oca-Cossio, J., L. Kenyon, et al. (2003). "Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells." Genetics 165(2): 707-20.
- Ojaimi, J., J. Pan, et al. (2002). "An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit." Mol Biol Cell 13(11): 3836-44.
- Pérez-Martínez, X., A. Antaramian, et al. (2001) "Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonas algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes" J Biol Chem 276 (14): 11302-9.
- Pérez-Martínez, X., S. Funes, et al. (2002). "Structure of nuclear-localized cox3 genes in Chlamydomonas reinhardtii and in its colorless close relative Polytomella sp." Curr Genet 40(6): 399-404.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem 83(2): 346-56.
- Pineau, B., C. Mathieu, et al. (2005). "Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the Nicotiana sylvestris CMS II mutant lacking nad7." J Biol Chem 280(28): 25994-6001.
- Saier, M. H., Jr. (1994). "Protein uptake into E. coli during Bdellovibrio infection. A process of reverse secretion?" FEBS Lett 337(1): 14-7.
- Schägger H., G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem 166 (2): 368-79.
- Solano Abelardo, P. A., López Pérez Manuel J, Montoya Julio (2001). "Enfermedades Genéticas del ADN Mitocondrial Humano." Salud Pública de México 43(2): 151-161.
- Stern, D. B. and K. J. Newton (1985). "Mitochondrial gene expression in Cucurbitaceae: conserved and variable features." Curr Genet 9(5): 395-404.
- Supekova, L., F. Supek, et al. "A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotopic expression." Proc Natl Acad Sci U S A 107(11): 5047-52.
- Tatuch, Y., J. Christodoulou, et al. (1992). "Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high." Am J Hum Genet 50(4): 852-8.
- Trautscholdl. L. W., S. G. (1995). UV method with hexokinase and glucosa-6-phosphate dehydrogenase. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, Verlagsgesellschaft: 346-357.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, et al. (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science 272(5265): 1136-44.

REFERENCIAS

- Tuppen, H. A., E. L. Blakely, et al. "Mitochondrial DNA mutations and human disease." Biochim Biophys Acta 1797(2): 113-28.
- Vahrenholz, C., G. Riemen, et al. (1993). "Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication." Curr Genet 24(3): 241-7.
- Varanasi, L., D. Mills, et al. (2006). "Altering conserved lipid binding sites in cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* perturbs the interaction between subunits I and III and promotes suicide inactivation of the enzyme." Biochemistry 45(50): 14896-907.
- Vesteg, M. and J. Krajcovic (2008). "Origin of eukaryotic cells as a symbiosis of parasitic alpha-proteobacteria in the periplasm of two-membrane-bounded sexual pre-karyotes." Commun Integr Biol 1(1): 104-13.
- von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, et al (2009). "Essentials for ATP synthesis by F1-Fo ATP synthases" Annu Rev Biochem 78: 649-672,
- Wallace, D. C., W. Fan, et al. (2010). "Mitochondrial energetics and therapeutics." Annu Rev Pathol 5: 297-348.
- Wickner, W. and R. Schekman (2005). "Protein translocation across biological membranes." Science 310(5753): 1452-6.
- Yasuda, R., H. Noji, et al. (1998). "F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps." Cell 93(7): 1117-24.
- Yoon, Y. G. and M. D. Koob (2003). "Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in *Escherichia coli* and transfer into transcriptionally active mitochondria." Nucleic Acids Res 31(5): 1407-15.
- Zullo, S. J., W. T. Parks, et al. (2005). "Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (oli(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded oli(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy." Rejuvenation Res 8(1): 18-28.

ANEXO. ARTÍCULOS PUBLICADOS.

Durante el presente trabajo de Doctorado se publicaron los siguientes trabajos:

Artículos de primer autor:

What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric *Cox3* and *Atp6* genes. **Francisco Figueroa-Martínez**, Miriam Vázquez-Acevedo, Paulina Cortés-Hernández, José de Jesús García-Trejo, Edgar Davidson, Michael P. King and Diego González-Halphen. *Mitochondrion* 2010.

Reconstructing the Mitochondrial Protein Import Machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Francisco Figueroa-Martínez**, Soledad Funes, Lars-Gunnar Franzén and Diego González Halphen. *Genetics* 179: 1-7 (May 2008).

Colaboración en otros artículos:

Subunit-subunits Interactions and Overall Topology of the Dimeric Mitochondrial ATP Synthase of *Polytomella sp.* Araceli. Cano-Estrada, Miriam Vázquez-Acevedo, Alexa Villavicencio-Queijeiro, **Francisco Figueroa-Martínez**, Héctor Miranda-Astudillo, Yraima Cordeiro, Julio A. Mignaco, Debora Foguel, Pierre Cardol, Marie Lapaille, Claire Remacle, Stephan Wilkens, and Diego González-Halphen. *Biochim Biophys Acta* 2010 Aug. 1797 (8):1439-48.

El capítulo de libro:

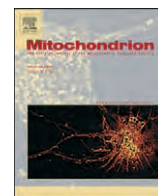
Oxidative Phosphorylation: Building Blocks and related components. Pierre Cardol, **Francisco Figueroa-Martínez**, Claire Remacle, Lars-Gunnar Franzén and Diego González Halphen. *Chlamydomonas Sourcebook*, Capítulo 13 volumen 2 Elsevier. 2008.

Incluidos en las siguientes páginas.



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito

What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric *Cox3* and *Atp6* genes

Francisco Figueroa-Martínez^a, Miriam Vázquez-Acevedo^a, Paulina Cortés-Hernández^{b,1}, José J. García-Trejo^b, Edgar Davidson^c, Michael P. King^c, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^c Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2010

Received in revised form 17 August 2010

Accepted 10 September 2010

Available online xxxx

Keywords:

Allotopic expression

Human mitochondrial genes

Chimerical proteins

Chlamydomonas reinhardtii

ABSTRACT

Allotopic expression is potentially a gene therapy for mtDNA-related diseases. Some OXPHOS proteins like ATP6 (subunit *a* of complex V) and COX3 (subunit III of complex IV) that are typically mtDNA-encoded, are naturally nucleus-encoded in the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The mitochondrial proteins whose genes have been relocated to the nucleus exhibit long mitochondrial targeting sequences ranging from 100 to 140 residues and a diminished overall mean hydrophobicity when compared with their mtDNA-encoded counterparts. We explored the allotopic expression of the human gene products COX3 and ATP6 that were re-designed for mitochondrial import by emulating the structural properties of the corresponding algal proteins. *In vivo* and *in vitro* data in homoplasmic human mutant cells carrying either a T8993G mutation in the mitochondrial *atp6* gene or a 15 bp deletion in the mtDNA-encoded *cox3* gene suggest that these human mitochondrial proteins re-designed for nuclear expression are targeted to the mitochondria, but fail to functionally integrate into their corresponding OXPHOS complexes.

© 2010 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Introduction

Allotopic expression refers to the expression from the nucleus of a gene that normally resides in the DNA of an organelle (Nagley and Devenish, 1989; de Grey, 2000). Allotopic expression is potentially a gene therapy for diseases related to mitochondrial DNA (mtDNA) (Zullo, 2001; González-Halphen et al., 2004; DiMauro et al., 2006; Kyriakouli et al., 2008). By placing a wild-type copy of an affected mtDNA-encoded gene in the nucleus, targeting of the corresponding protein to the mitochondrion could allow functional replacement of a defective protein. Pioneering work on allotopic expression involved the expression of yeast mitochondrial *bl4* maturase from the nucleus to restore respiratory competence to a yeast mutant with oxidative phosphorylation (OXPHOS) impairment due to a defective mtDNA-encoded mitochondrial *bl4* maturase (Banroques et al., 1986).

Allotopic expression has been applied to other OXPHOS components. A yeast strain carrying mutations in the *atp8* gene (encoding subunit A6L of mitochondrial ATP synthase) was functionally complemented with a recoded *atp8* gene expressed from the nucleus (Gearing and Nagley, 1986; Nagley et al., 1988). Addition of a sequence encoding a mitochondrial targeting sequence (MTS) to the re-designed gene

directed the membrane protein to mitochondria and allowed its functional integration into ATP synthase. The allotopic expression of the *atp8* gene in yeast mutants restored OXPHOS to levels similar to those of the parental wild-type strain (Roucou et al., 1999). The human mitochondrial *atp8* gene was also expressed allotopically in human cells although its incorporation into mitochondrial ATP synthase was not examined (Oca-Cossio et al., 2003). Another successful allotopic expression of a membrane-bound protein was the targeting of the NAD7 (subunit 7 of the NADH dehydrogenase complex) that restored complex I biosynthesis to *Nicotiana glauca* mitochondria lacking a functional *nad7* gene (Pineau et al., 2005). This was unambiguously demonstrated by the absence of mitochondrial complex I in the mutant lacking the endogenous mitochondrial *nad7* gene, and the recovery of complex I biogenesis in the allotopically-complemented strain, as judged by Blue-Native Electrophoresis (BNE) (Pineau et al., 2005). COX2 (subunit 2 of cytochrome *c* oxidase), was allotopically expressed in yeast, after introducing a single amino acid substitution that diminished the mean hydrophobicity of the first transmembrane stretch (TMS) (Supekova et al., 2010).

The A6L, NAD7, and COX2 proteins are membrane-bound proteins with one or two TMSs. Allotopic expression in human cells has been reported for mitochondrial genes encoding membrane-bound OXPHOS proteins with three or more TMSs. These include the human *atp6* gene, encoding subunit *a* of ATP synthase (5 TMSs) (Manfredi et al., 2002; Zullo et al., 2005; Bonnet et al., 2007), the human *nad1* gene, encoding subunit NAD1 of complex I (8 TMSs) (Bonnet et al., 2008), the human

* Corresponding author.

E-mail address: dhalphen@ifc.unam.mx (D. González-Halphen).

¹ Present address: Department of Molecular and Cellular Biology, University of California Davis, Davis CA 95616, USA.

nad4 gene, encoding subunit NAD4 of complex I (15 TMSs) (Bonnet et al., 2007, 2008; Guy et al., 2002; Ellouze et al., 2008), the bovine *cox1* gene, encoding subunit 1 of cytochrome c oxidase (12 TMSs) (Tsukihara et al., 2003; Shimokata et al., 2007), and the *atp6* gene, encoding subunit *a* of ATP synthase (5 TMSs) of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (hereafter referred to as *Chlamydomonas*) (Ojaimi et al., 2002). Although these studies suggest that optimized allotopic expression could be an effective treatment for mitochondrial disorders resulting from mutations in mitochondrial OXPHOS genes (Ellouze et al., 2008), it remains to be demonstrated directly and unambiguously that allotopically expressed proteins with three or more TMSs have functionally integrated into OXPHOS complexes (Kyriakouli et al., 2008).

There are difficulties in achieving the functional integration of highly hydrophobic, allotopically expressed subunits into their corresponding OXPHOS complex. The protein products of the allotopically expressed human *cob* gene (encoding cytochrome *b* of complex III, with 6 TMSs) and the *nad4* gene remained in the periphery of mitochondria or aggregated in fiber-like structures (Oca-Cossio et al., 2003). The *Chlamydomonas atp6* gene product, optimized for its import into mitochondria of human cell lines, failed to integrate properly into a mature, functional ATP synthase (Bokori-Brown and Holt, 2006). Therefore, it has been suggested that claims of allotopic expression of OXPHOS components should be accompanied by unequivocal evidence that imported proteins are integrated into fully assembled complexes (Kyriakouli et al., 2008). To date, unambiguous evidence for the functional allotopic expression of mitochondrial genes has been provided only for the protein products of the genes, *atp8*, *cox2*, and *nad7* (Law et al., 1990; Pineau et al., 2005; Supekova et al., 2010). The corresponding gene products are membrane-bound proteins with only one or two TMSs.

We and others have shown that the OXPHOS proteins ATP6, COX2, COX3, NAD3, and NAD4L, that are typically mtDNA-encoded, are naturally nucleus-encoded in chlorophycean algae, including *Chlamydomonas* (Pérez-Martínez et al., 2002; Funes et al., 2002; Cardol et al., 2006). These mitochondrial genes that migrated to the nucleus have acquired introns, promoters, 5' and 3' UTRs, and nucleotide sequences encoding atypically long MTS ranging from 100 to 140 residues (Pérez-Martínez et al., 2002; González-Halphen et al., 2004;). In Chlorophycean algae, these proteins are translated in cytoplasmic ribosomes, post-translationally or co-translationally imported into mitochondria, integrated into the inner mitochondrial membrane, and functionally assembled into their corresponding complex. The mitochondrial proteins whose genes have been relocated to the nucleus also exhibit a diminished mean hydrophobicity when compared with their mtDNA-encoded counterparts (Funes et al., 2002; Cardol et al., 2006). This has been proposed to be a key feature to enable import of these membrane-bound proteins into mitochondria (Claros et al., 1995; Daley et al., 2002a; González-Halphen et al., 2004).

We explored the allotopic expression and mitochondrial import of two human mitochondrial gene products, COX3 and ATP6, that were re-designed for mitochondrial import by emulating the properties of the corresponding algal proteins. The re-designed chimeric precursors carried algal MTS, and the region that corresponds to the human mature COX3 and ATP6 proteins were designed to have diminished hydrophobicity.

2. Materials and methods

2.1. Gene constructs

The *Chlamydomonas atp6* cDNA (A6Cr) was amplified from a *Chlamydomonas* cDNA library using the forward primer 5'-cggatcctaataatagattgattaacctggcg-3', and the reverse primer 5'-cggaaattc-gagctcgtcttacagcgcttcttga-3' and was cloned in the pcDNA V5/HIS TOPO vector (Invitrogen). ATP6 and COX3 proteins were re-designed

from the mitochondria-encoded human ATP6 and COX3 proteins (AAU13269 and YP_003024032 respectively). The corresponding *Chlamydomonas* ATP6 and COX3 were XP_001689492 and XP_001692182. To diminish the mean hydrophobicity in TMSs, individual residues in human proteins were changed to the corresponding algal ones, but only in regions believed not to be involved in critical functions or in the interfaces with other subunits (Funes et al., 2002; Varanasi et al., 2006). For the chimeric re-designed ATP6 (A6Chim) we added the 106 residues of the MTS followed by 13 amino acids of the mature ATP6 of *Chlamydomonas*. We also made three substitutions, I76F, I77C, and F178T, in the third TMS (the sequence of A6Chim was deposited in GenBank with the accession number HM462471). For chimeric re-designed COX3 (COX3-HA) we added the 110 residues of the MTS followed by 28 amino acids from the mature *Chlamydomonas* COX3, and the following substitutions: L22W, A24T, L25Y, L26N, and M33Q in the first TMS, L138A, G141Y, V142Y, and I144Y in the fourth TMS and V199M, A200T, L206M, F214Y, and I217A in the sixth TMS (the sequence of the chimerical COX3 gene was deposited in GenBank with the accession number HM462472). The resulting cDNAs were designed using human nuclear codon usage, and restriction sites were added to facilitate subsequent cloning. A hemagglutinine (HA) tag was encoded at the carboxyl-terminus of each protein to allow immunodetection of expressed proteins (A6Cr-HA, A6Chim-HA, and COX3-HA). The genes were chemically synthesized (GeneScript) and cloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen).

Sequences were aligned using Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Larkin et al., 2007), and TMSs were predicted with the TOPPED software <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=topped> (Claros and Von Heijne, 1994) using the GES scale.

Vectors encoding mitochondrially-targeted green fluorescent proteins were obtained by cloning the MTS from *Chlamydomonas* ATP6 subunit in pEGFP-N1 vector (Clontech) using EcoRI and SalI restriction sites, and then subcloned in pcDNA3.1 vector using EcoRI and NotI restriction sites to give the *MTS6-EGFP* construct. The cDNA of the EGFP protein without MTS was also cloned in pcDNA3.1 vector using EcoRI and NotI restriction sites.

2.2. Cell culture

Wild-type control cells (cell line 143B) and cells homoplasmic for the T8993G mutation in the mitochondrial *atp6* gene (ATP6 mutant cells) were kindly provided by Dr. Rosalba Carrozzo (Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy). Homoplasmic COX3 mutant cells (cell line CSP112.50), with a 15 bp deletion in mtDNA-encoded *cox3* gene, were described previously (Hoffbuhr et al., 2000). Cell culture was carried out in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 4.5 mg glucose/mL and 110 µg pyruvate/mL (DMEM), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) as described (Hoffbuhr et al., 2000; García et al., 2000), in the presence of 100 units/mL penicillin G, 100 µg of streptomycin sulfate/mL and 2.0 µg of amphotericin B/mL (Invitrogen). COX3 mutant cells were supplemented with 50 µg uridine/mL.

Chinese Ovary Hamster (CHO) cells were cultured in a mixture of DMEM medium and F12 medium (50/50) supplemented with 10% FBS in the presence of the above mentioned antibiotics.

2.3. Cell transfections

CHO cells and ATP6 mutant cells were transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. COX3 mutant cells were transfected with Effectene reagent (Qiagen). Transfected cells were evaluated for trans-gene expression 24–48 h after transfection by indirect immunofluorescence or by confocal microscopy of EGFP. To obtain stable transfected cells,

48 h after transfection cells were incubated with 300 µg G418/mL. After three weeks single colonies were isolated with glass cloning cylinders, and cells were subsequently cultured in DMEM supplemented with uridine, or in DMEM without uridine and without pyruvate to assay for functional complementation of COX3 mutant cells.

2.4. Fluorescence microscopy

CHO cells were transfected with pcDNA3.1 expressing EGFP or the fusion protein MTSA6-EGFP. 48 h after transfection, EGFP and mitochondria were visualized within living cells by confocal microscopy after 15 min incubation with 500 nM mitochondrial dye Mitotracker red CM-H2XRos (Molecular Probes). Cells were washed with PBS and coverslips were mounted in Vectashield antifade agent.

Cells were transfected transiently with the genes: *atp6* from *Chlamydomonas* (A6Cr-HA) and the chimeric re-designed *atp6* (A6Chim-HA) for the T8993G cells or with the chimeric *cox3* gene (*cox3-HA*) for the COX3 mutant cells. 48 h after transfection, cells were incubated with Mitotracker red CM-H2XRos for 40 min when required, or washed and directly fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) for 10 min at room temperature in the dark and subsequently permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 2 min. Cells were incubated with I-block (0.2% in PBS, Applied Biosystems) for 15 min to decrease non-specific immunostaining. The HA tag was detected by incubation in the dark with 100 ng of rat monoclonal anti-HA high-affinity antibody/mL (3F10, Roche) for 4 h at room temperature, followed by washes and incubation with fluorescein (FITC) conjugated anti-rat antibody (Jackson Immunoresearch). Cells were washed with PBS and coverslips were mounted in Vectashield antifade agent and visualized by Fluorescence Microscopy.

2.5. ATP synthesis rate measurements

Spectrophotometric measurements of ATP synthesis rates coupled to NADP⁺ reduction were carried out at 340 nm with 30 µg of cells permeabilized with 20 µg digitonin/mg of protein, as described (James et al., 1999).

2.6. Immunocapture of mitochondrial ATP synthase

Mitochondria were isolated from the stably transfected cells by differential centrifugation, and mitochondrial membranes were prepared by osmotic shock as previously described (García et al., 2000). F₁F₀-ATP synthase immunoprecipitation was carried out from 3 mg submitochondrial particles and solubilized with n-dodecyl-β-D-maltoside (Sigma) in a ratio of 1.5 mg per mg of mitochondrial protein. The ATP synthase was immunocaptured using the monoclonal antibody 12F4AD8AF8 (Aggeler et al., 2002) coupled to agarose beads. ATP synthase was then resolved by 4–12% polyacrylamide SDS-PAGE. The bands of interest were excised from the gel and sent for protein sequence identification by LC-MS/MS to the Yale Cancer Center Mass Spectrometry Resource & W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (New Haven, CT, USA). After tryptic digestion, samples were analyzed in a tandem mass spectrometer. The automated Mascot algorithm was used to search all LC-MS/MS results against the NCBI database.

2.7. In vitro protein import into mitochondria

The genes *cox3-HA* and *MTSA6-EGFP* were cloned into the pSP64polyA vector (Promega), for *in vitro* synthesis. The rat ALDH gene with a T7 promoter in the pGEM3Z vector was kindly provided by Dr. Henry Weiner (Purdue University). Rat mitochondria were isolated as described by Cavadini et al. (2002), and oxymetric measurements were carried out to verify that mitochondria were intact and exhibited respiratory control (with typical values between

4.0 and 6.0). Radiolabeled proteins were synthesized using the TNT (T7 or SP6) quick coupled transcription/translation system (Promega) in the presence of L-³⁵S methionine (Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions. Labeled protein was incubated with 62 µg isolated rat mitochondria in a total volume of 125 µL in import buffer (3% BSA-fatty acid free, 250 mM sucrose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 5 mM methionine, and 10 mM MOPS-KOH pH 7.2) supplemented with 2 mM ATP, 10 mM malate-glutamate, 12.5 U creatine phosphokinase, and 10 mM phosphocreatine, for 30 min at 25 °C. A 60 µL aliquot was removed and treated with proteinase K (300 µg/mL) 30 min on ice, to digest the non-imported proteins. Phenylmethylsulfonyl fluoride was added (5 mM final concentration) to stop the proteinase K digestion. In a duplicate reaction, 1 µL AVO per 100 µL of import reaction was added to one reaction (AVO: 8 mM antimycin A, 0.1 mM valinomycin and 2 mM oligomycin), to abolish the electrochemical gradient and prevent protein import. Mitochondria were re-isolated by centrifugation, washed and solubilized in sample buffer and resolved by SDS-PAGE (Schägger, 1994). Proteins were transferred to PVDF membrane and visualized using a Storm phosphor-Imager system (GE Healthcare).

3. Results

3.1. Design of chimeric proteins

For expression from the nucleus, we designed versions of the normally mtDNA-encoded human ATP6 and COX3 proteins that would exhibit physicochemical features similar to those of the corresponding *Chlamydomonas* proteins. Specific amino acids in the human proteins were changed to decrease the mean hydrophobicity to levels approaching those of the *Chlamydomonas* ATP6 and COX3 (Fig. 1). In the case of ATP6, a membrane protein with five TMSs, we added the algal MTS plus 13 amino acids of the mature *Chlamydomonas* ATP6 to conserve the processing site and reduce the mean hydrophobicity of the first TMS. Also, the mean hydrophobicity in the third TMS was reduced by substitution of three residues, giving rise to A6Chim (see Materials and methods). The fourth and fifth transmembranal stretches, that form the interface between ATP6 subunit and c subunits ring in ATP synthase, were not modified because it is believed that they are directly implicated in proton translocation across the inner membrane during ATP synthesis (Funes et al., 2002). We also made a variant of the chimeric ATP6 by adding the HA epitope in the carboxy-terminus for antibody detection (A6Chim-HA).

COX3 is a protein with seven TMSs, which plays a structural role in complex IV. For the chimeric human COX3 we added the MTS from *Chlamydomonas* COX3 plus the first 28 amino acids of the mature algal COX3. We also diminished the mean hydrophobicity in the first, fourth and sixth TMSs, without changing conserved amino acids that have been reported to be important for the assembly of Complex IV (Varanasi et al., 2006) (see Materials and methods). We also added a HA epitope in the carboxy-termini for antibody detection (COX3-HA).

The hydrophobicity plots for *Chlamydomonas*, human and the re-designed, chimeric ATP6 and COX3 proteins reveal that the mean hydrophobicity in the second TMS in chimeric ATP6 and in the TMSs 1, 4 and 6 in the case of Chimeric COX3 were diminished, while the peak corresponding to the predicted first TMS in the chimeric ATP6 protein was lost (Fig. 1).

3.2. The algal MTS is recognized by the mammalian mitochondrial import system

To determine if the mammalian mitochondrial import machinery is capable of recognizing the algal MTS, we constructed a chimeric protein that contained the *Chlamydomonas* ATP6 MTS fused to EGFP (MTSA6-EGFP). CHO cells were transfected with the corresponding

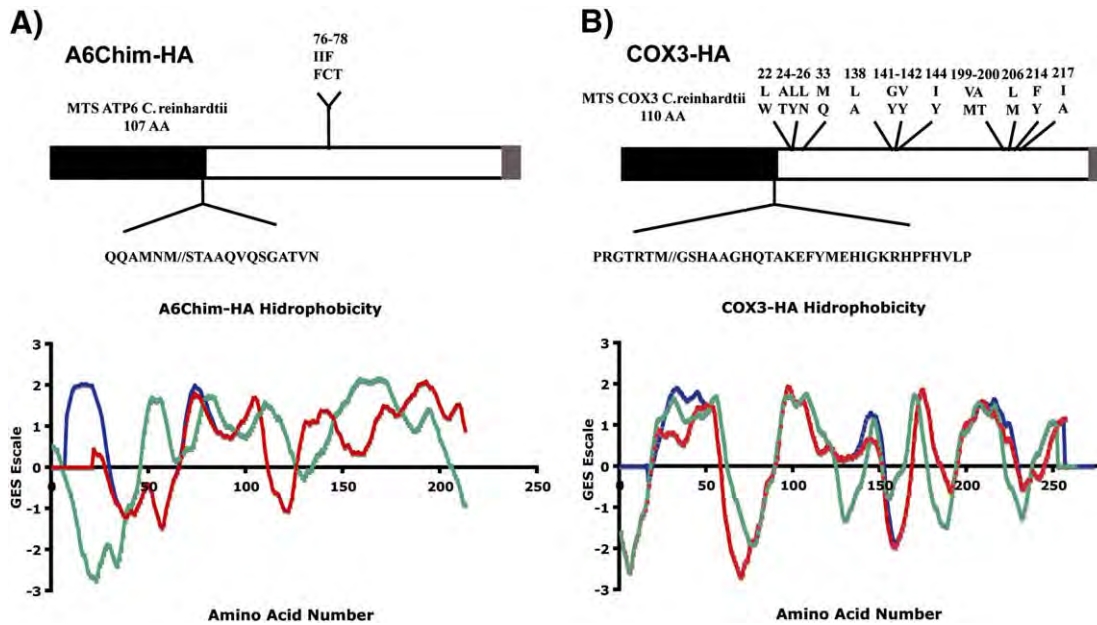


Fig. 1. Schematic representation of chimeric ATP6-HA (A) and COX3-HA (B) proteins, and their corresponding hydrophobicity plots. A. Black boxes at the N-terminus represent mitochondrial targeting sequences (MTS) from the *Chlamydomonas* ATP6 or COX3 proteins, gray boxes depict the C-terminus HA tag; white boxes correspond to the human proteins. The amino acid substitutions are shown in bold below the amino acids normally present at those positions in humans. Below the boxes is shown the site where the algal pre-proteins are proteolytically processed to produce the mature proteins (// indicates the processing site). In the hydrophobicity plots (in GES scale), the blue lines represent human proteins, green lines represent *Chlamydomonas* proteins and red lines are the chimeric proteins. A diminished mean hydrophobicity is observed for both chimeric proteins with respect to the corresponding human proteins. Peaks do not superimpose exactly due to different sequence lengths.

construct in vector pcDNA3.1, and after 48 h cells were analyzed by confocal microscopy. The green fluorescence of EGFP co-localized with the red fluorescence from Mitotracker Red (Fig. 2), indicating that the EGFP is localized in the mitochondria. In CHO cells transfected with EGFP lacking the MTS, fluorescence was distributed throughout the cell cytoplasm but lacked the typical punctuate mitochondrial pattern (Fig. 2). These experiments suggest that the algal MTS can direct a non-mitochondrial protein to human mitochondria, and thus,

that the algal MTS could potentially direct the ATP6 and COX3 proteins to human mitochondria.

3.3. Expression of the algal ATP6 and chimeric ATP6 proteins

ATP6 mutant cells were transfected with constructs encoding *Chlamydomonas* ATP6 (A6Cr-HA) or Chimeric ATP6 (A6Chim-HA).

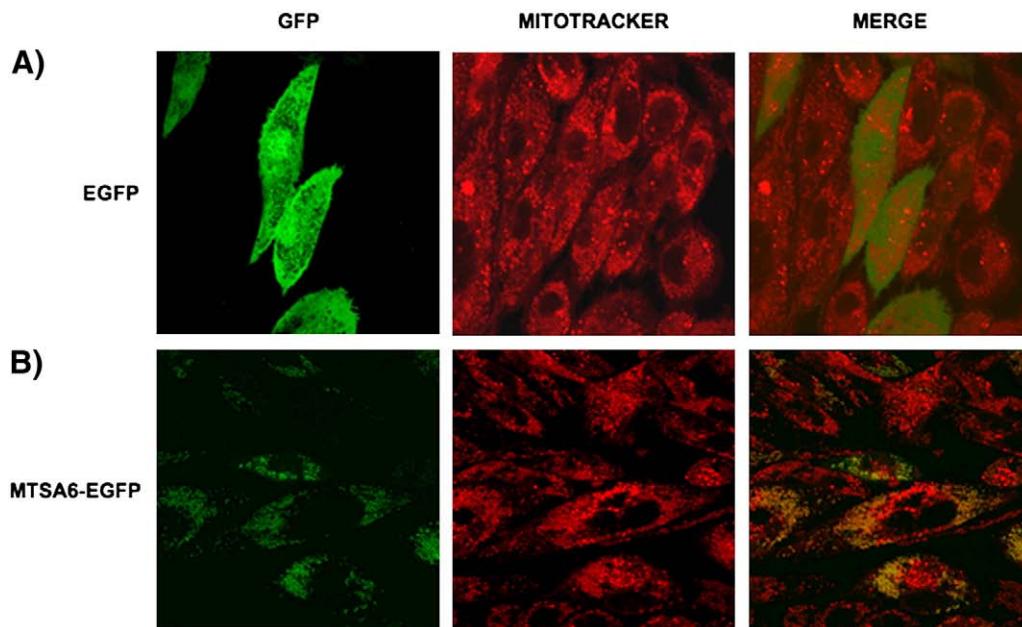


Fig. 2. The *Chlamydomonas* ATP6 MTS targets EGFP to mitochondria. Fluorescence microscopy of CHO cells transfected with EGFP (green fluorescence, panel A) and a chimeric EGFP that incorporates the *Chlamydomonas* ATP6 MTS (MTSA6-EGFP, green fluorescence, panel B). MTS6-EGFP co-localizes with Mitotracker indicating that the *Chlamydomonas* MTS directs the fusion protein to mitochondria. Notably, the distribution of the fusion proteins is not homogeneous, and numerous red patches that may correspond to mitochondria without incorporated GFP are observed. EGFP without an MTS is distributed throughout the cell.

Forty-eight hours after transfection cells were stained with Mitotracker red and then fixed and immunostained with an anti-HA antibody. Fluorescence microscopy showed that both proteins, ATP6 from *Chlamydomonas* (Fig. 3A) and chimeric ATP6 are localized at mitochondria, as suggested by the observed punctuate pattern of fluorescence and by the colocalization of fluorescein and Mitotracker signals (Fig. 3B).

To obtain stable expression of the allotopically expressed proteins, the A6Cr and A6Chim constructs (without an encoded HA tag) were transfected into 143B control cells and ATP6 mutant cells. Mock transfections with the empty vector pcDNA3.1 were also carried out. Cells were selected with 300 µg/mL of G418 for 14 days.

To obtain evidence for the presence of allotopically expressed ATP6 subunits in mitochondria from stably transfected cells, complex V was isolated by immunocapture in a single step procedure using an anti-F1 monoclonal antibody coupled to agarose beads (Aggeler et al., 2002), and its polypeptide constituents were resolved by SDS-PAGE (Fig. 4A). There were no differences in the polypeptide pattern of ATP synthase isolated from control or transfected cells. The resolved bands in the molecular mass range between 18 and 25 kDa were recovered from the polyacrylamide gel after SDS-PAGE and subjected to MS/MS analysis. Sequenced tryptic fragments of subunit *b* (13–20 fragments), subunit OSCP (9–12 fragments), and subunit *d* (14–20 fragments) were identified. However, only two fragments from the human ATP6 subunit were identified: peptide QMMTMHNTK was only found in 143B wild-type cells transfected with the algal gene *A6Cr* and peptide LITTQQWLIK was identified in mock-transfected cells and in *atp6* mutant cells transfected with chimeric ATP6 (*A6Chim*) or with the empty vector. No peptide fragments corresponding to the algal or chimeric ATP6 proteins were detected. Highly hydrophobic proteins are known to yield few tryptic fragments when subjected to MS/MS analysis (Mitra and Goshe, 2009); this may explain the poor recovery of tryptic fragments from the ATP6 proteins.

The ATP synthesis capabilities of transfected cells were determined by measuring the rates of ATP synthesis in digitonin-permeabilized cells (James et al., 1999). There was no increase in the rates of ATP synthesis in the ATP6 mutant cells transfected with either the *A6Cr* or the *A6Chim* constructs. Rates of ATP synthesis in wild-type cells also were not affected by transfection of both constructs or by transfection with empty vector (Fig. 4B).

Taken together, our data suggest that although the allotopically expressed ATP6 proteins sort to mitochondria in mutant and wild-type cells, there is no evidence that they assemble in the ATP synthase, since there is no rescue of ATP synthase activity or biochemical evidence for the assembly of the expressed protein into complex V. These results agree with a previous report that allotopically expressed ATP6 proteins fail to integrate into ATP synthase and may form aggregates inside or outside the mitochondria (Bokori-Brown and Holt, 2006).

3.4. Expression of the COX3 protein

The chimeric *COX3-HA* construct was expressed in cells harboring a 15 base pair deletion in the mitochondrial *cox3* gene (Hoffbuhr et al., 2000). The COX3 mutant cells have no respiratory activity and the mutant COX3 protein is rapidly degraded (Hoffbuhr et al., 2000). The cells were transfected with *COX3-HA* and 48 h later, were incubated with Mitotracker red, and immunostained with an anti-HA antibody. The chimeric COX3-HA protein co-localized with Mitotracker, suggesting targeting of the chimeric protein to mitochondria (Fig. 3C).

In some experiments, after transfection with *COX3-HA*, cells were replated in medium lacking uridine and pyruvate. The COX3 mutant cells require medium supplementation with uridine and pyruvic acid for growth because they have no respiratory chain activity (Hoffbuhr et al., 2000). Transfected cells survived for several weeks in medium without uridine and pyruvic acid, but cell density did not increase.

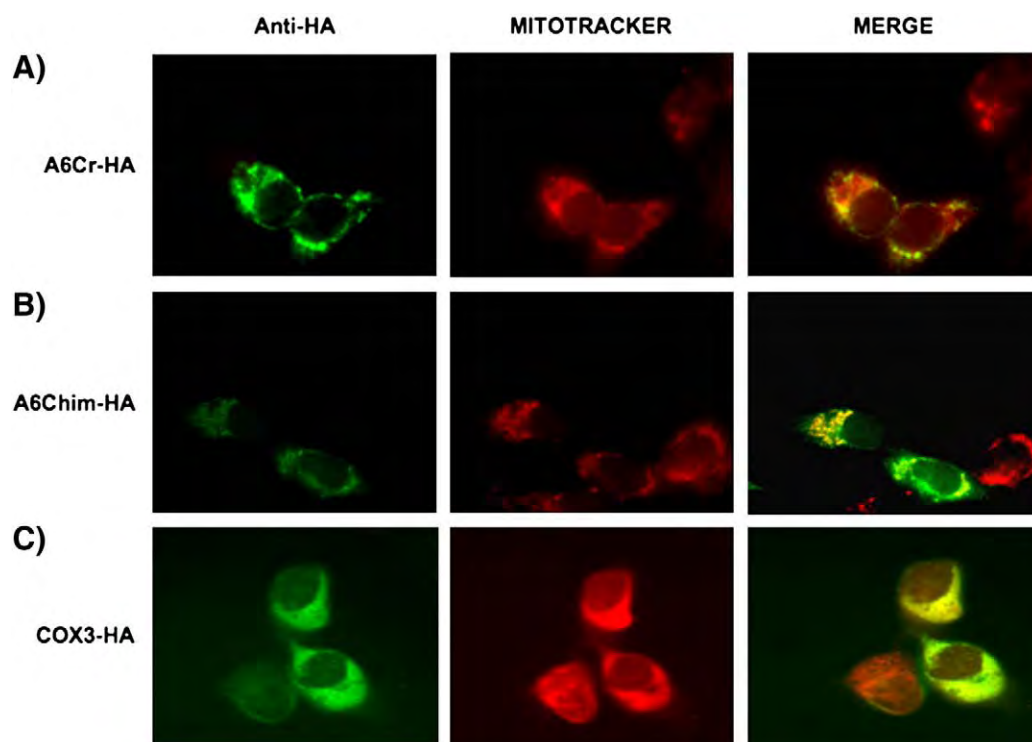


Fig. 3. The *Chlamydomonas* ATP6 MTS targets human ATP6 and COX3 to mitochondria. ATP6 mutant cells were transfected with *Chlamydomonas* ATP6 (*A6Cr-HA*, panel A) or Chimeric ATP6 (*A6Chim-HA*, panel B). COX3 mutant cells were transfected with chimeric COX3-HA protein (Panel C). Expressed proteins were detected with a specific anti-HA antibody and a secondary antibody coupled to fluorescein (green fluorescence). The ATP6 and COX3 proteins detected through immunofluorescence co-localize with Mitotracker (red fluorescence).

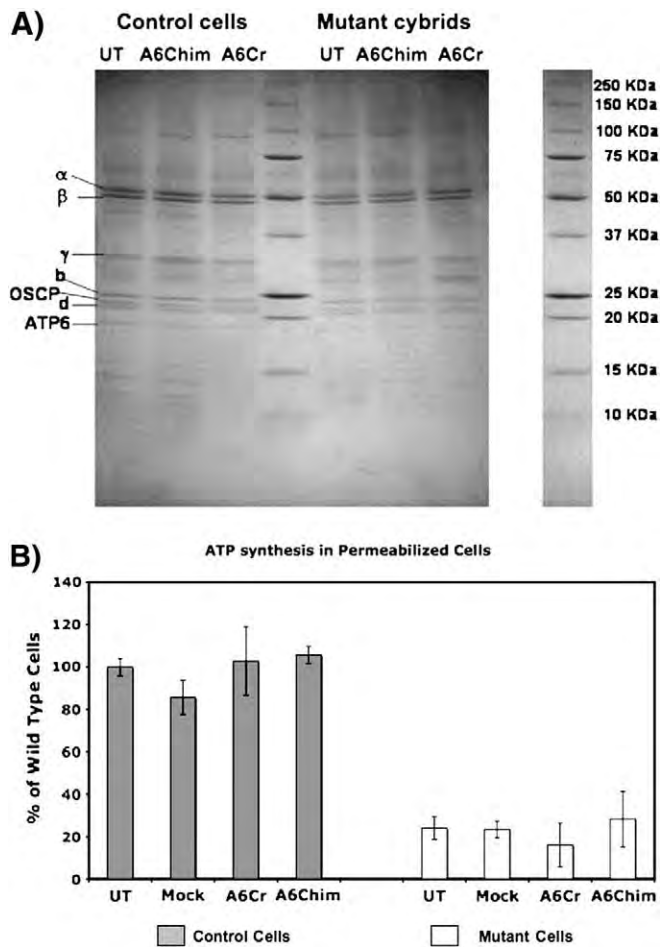


Fig. 4. Chimeric ATP6 is not incorporated into mitochondrial ATP synthase. A) SDS-PAGE of ATP synthase immunocaptured from control cells and ATP6 mutant cells transfected with the algal (*A6Cr*) and chimeric *atp6* (*A6Chim*) genes. ATPase subunits were identified according to Aggeler et al. (2002). Bands marked as gamma, b, OSCP, d and ATP6 were also identified by mass spectrometry. The allotopically expressed proteins were not detected by MS analyses of the immunocaptured ATP synthase complex. B) Rates of ATP synthesis in permeabilized control cells and the homoplasmic mutant cells transfected with the *A6Cr*, *A6Chim* genes or with the empty pcDNA 3.1 vector. Values are given as percentages of the ATP synthesis measured in wild-type cells (23.4 nmol ATP/min mg of protein).

Within three weeks all cells died. We conclude that the COX3-HA protein did not assemble with the COX complex nor did it restore respiratory activity.

3.5. *In vitro* import

We also investigated the *in vitro* import of the ³⁵S-labeled chimeric COX3-HA protein and the fusion protein MTS_{A6}-EGFP into mammalian mitochondria. Control reactions were carried out with the rat ALDH precursor, a well-characterized mitochondrial protein that is targeted to and processed in the mitochondrial matrix. The ALDH precursor was imported into the mitochondria and was proteolytically processed to its mature form (Fig. 1 Supplementary Material On-line). Control import reactions conducted in the presence of uncouplers and OXPHOS inhibitors (Hammen et al., 1996) resulted in ALDH being sensitive to protease digestion. The chimeric proteins COX3-HA and MTS_{A6}-EGFP were incubated with rat liver mitochondria but were not protected from the externally-added protease, and thus, were not imported into mammalian mitochondria *in vitro*.

4. Discussion

Allotopic expression may be an option to overcome by gene therapy metabolic diseases caused by mutations in the mitochondrial genome. MtDNA-encoded protein genes must be modified in several ways to be expressed appropriately from the nucleus. First, they must be modified according to the universal genetic code and to the nuclear codon usage. Second, they must acquire a sequence encoding an MTS so that the corresponding protein is directed to its correct subcellular location. Previous attempts at allotopic expression in human cells have recoded mitochondrial genes and incorporated regions encoding MTS from well-characterized mitochondrial proteins: ATP9 from *Neurospora crassa* (Gearing and Nagley, 1986; Nagley et al., 1988; Law et al., 1990), COX2 from soybean (Daley et al., 2002a), human COX VIII (Manfredi et al., 2002; Oca-Cossio et al., 2003), bovine COX IV (Tsukihara et al., 2003; Shimokata et al., 2007), the human P1 isoform of subunit c of ATP synthase (Manfredi et al., 2002; Oca-Cossio et al., 2003), human Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Oca-Cossio et al., 2003); human SOD2 and COX10 (Bonnet et al., 2007), ATP6 from *Chlamydomonas* (Ojaimi et al., 2002; Bokori-Brown and Holt, 2006), and yeast OXA1 (Supekova et al., 2010). These modifications have been sufficient for successful targeting, import, and restoration of OXPHOS activity by the allotopically expressed proteins (Nagley et al., 1988; Manfredi et al., 2002; Ojaimi et al., 2002; Tsukihara et al., 2003; Bonnet et al., 2007). Nevertheless, in other hands, constructs and mutant cell lines similar to those used in some of those reports did not lead to incorporation of the allotopically expressed proteins that contain more than two TMSs or to an increase in ATP synthesis (Oca-Cossio et al., 2003; Bokori-Brown and Holt, 2006). High mean hydrophobicity, especially in the first 100 amino acids, is one of the largest barriers for successful allotopic expression of membrane proteins (Oca-Cossio et al., 2003). This suggests that reduction of mean hydrophobicity may facilitate the import of some proteins (Claros et al., 1995; Daley et al., 2002a; González-Halphen et al., 2004). For example, it has been shown that the alteration of hydrophobic amino acids to less hydrophobic residues in the COX2 protein is sufficient to allow *in vitro* import of the protein into isolated mitochondria from soybean (Daley et al., 2002a) or *in vivo* import in yeast (Supekova et al., 2010).

In this work, we studied the allotopic expression of two subunits of different OXPHOS complexes, ATP6 with five TMSs and COX3 with seven TMSs. These polypeptides are mtDNA-encoded in the vast majority of eukaryotes, but are nucleus-encoded in *Chlamydomonas* and other closely related chlorophycean algae (Pérez-Martínez et al., 2002; Funes et al., 2002; Cardol et al., 2006). To increase the likelihood for import, we reduced the mean hydrophobicity of the TMSs that are believed not to be involved in critical protein function or in protein-protein interactions. Several non-conserved amino acids in the human ATP6 and COX3 proteins were modified to emulate those of their nucleus-encoded counterparts in *Chlamydomonas* (Pérez-Martínez et al., 2002; Funes et al., 2002). These changes resulted in ATP6 and COX3 subunits with a “*Chlamydomonas*-like” hydrophobicity profile (Fig. 1). These changes were predicted to transform ATP6 and COX3 into “import-competent” proteins. The corresponding MTS from ATP6 and COX3 from *Chlamydomonas* (107 aa for ATP6 and 110 aa for COX3) were added to create chimeric proteins with the rationale that the long MTS has evolved to promote the correct import and processing of hydrophobic proteins. This was shown for the nucleus-encoded COX2 precursor from soybean that exhibits a long MTS of 136 residues that is necessary for import and maturation of the COX2 subunit into isolated soybean mitochondria (Daley et al., 2002b).

Both algal and chimeric ATP6, as well as chimeric COX3 and the MTS_{A6}-EGFP fusion protein, were localized at the mitochondria of human cells, in spite of the phylogenetic distance between mammals and algae (Figs. 2 and 3). However the techniques used lack sufficient resolution to allow us to ascertain if the chimeric proteins are imported

into the organelle, localized only in the intermembrane space, or are merely bound to the cytoplasmic side of the mitochondrial outer membrane, as has been suggested before (Oca-Cossio et al., 2003). This result is consistent with reports from Ojaimi et al. (2002), who used the algal ATP6, and Bokori-Brown and Holt (2006) who used the human ATP6 containing the *Chlamydomonas* ATP6 MTS and showed that the MTS from the algal ATP6 is more efficient directing the human ATP6 to mitochondria than other MTS. Most likely, the TOM import complex of the mitochondrial outer membrane recognizes the algal MTS by its secondary structure (predicted to be an amphipathic alpha helix), and not by a conserved primary sequence motif. We previously found in *Chlamydomonas* many mitochondrial proteins that are predicted to be involved in protein import and are homologous to their counterparts in yeast and in *Arabidopsis* based on data mining of the algal genome (Figueroa-Martínez et al., 2008). It is therefore most likely that protein import into *Chlamydomonas* mitochondria is similar to the canonical pathway described in others organisms, including humans.

The chimeric ATP6 and COX3 constructs were not able to suppress the OXPHOS impairment caused by mutations in the mitochondrial genome. The homoplasmic *atp6* mutant cells (T8993G), transfected with algal or chimeric *atp6* genes did not show increased rates of ATP synthesis, in comparison with the mock-transfected cells. In addition, analysis by mass spectrometry of ATP synthase immunocaptured from transfected cells, and resolved by SDS-PAGE, did not show any evidence for the chimeric or algal ATP6 polypeptides being present in the complex, suggesting that the exogenous proteins are not incorporated into ATP synthase. Similarly, the cells with deletions in the mitochondrial *cox3* gene, transfected with the chimeric *cox3-HA* gene, were not able to grow in the absence of pyruvic acid and uridine, which requires only as low as 1–2% of wild-type mtDNA to exhibit cell growth (Hoffbuhr et al., 2000). There are several other possible explanations for why our constructs did not rescued mtDNA mutations. These include over-expression or under-expression effects, lack of mRNA targeting to mitochondria-attached cytosolic ribosomes, or lack of proper recognition of the algal MTS by the mammalian import machinery.

Our results are at variance with previous reports that an allotopically expressed ATP6 protein readily restores ATPase activity (Bonnet et al., 2007; Ojaimi et al., 2002). Ojaimi et al. (2002) reported that allotopically expressed ATP6 protein from *Chlamydomonas* was identified by Western blotting after BN-PAGE as part of a high molecular weight species, probably in association with ATP synthase. However, Bokori-Brown and Holt (2006), using a similar construct and the same mutant cells, showed that *Chlamydomonas* ATP6 seems to be part of a high molecular weight complex, distinct from ATP synthase, that may represent protein aggregates. Also, and in accordance with our own results, Bokori-Brown and Holt (2006) were not able to detect any increase in ATP synthesis with different constructs of the ATP6 subunit.

Two different systems were used in this work: cells homoplasmic for the T8993G mutation in *atp6*, and cells harboring a 15 base pair deletion in the mitochondrial *cox3* gene (Hoffbuhr et al., 2000). In the first case, an endogenous protein is synthesized with an amino acid substitution; in the second, the mutant COX3 is rapidly degraded, preventing assembly of the COX complex. These systems explore different scenarios, one in which the allotopically expressed protein competes with a mutant protein synthesized in the organelle, and a second one in which there is little or no competition with a mitochondria-synthesized counterpart. Even when the endogenous mutated proteins are not functioning optimally, they are still synthesized inside the organelle, and in the case of ATP6 or COX1, the endogenous proteins are still integrated into ATP synthase or cytochrome *c* oxidase, respectively (Cortés-Hernández et al., 2007; Tsukihara et al., 2003). ATP8 expressed and imported *in vitro* in isolated yeast mitochondria are integrated into complex V only when

the mitochondrial *atp8* gene is deleted and not in mitochondria isolated from wild-type yeast that are capable of synthesizing the ATP8 subunit inside the organelle (Farrell et al., 1988; Law et al., 1990). This illustrates how the competition between the nucleus-encoded and the mtDNA-encoded proteins for the integration in their corresponding complex may also limit allotopic expression. Complete recovery in ATP synthesis after allotopic expression, as reported for ATP6 and ND4 subunits (Bonnet et al., 2007, 2008), is hard to rationalize, since it implies that all ATP synthase or NADH dehydrogenase complexes must have integrated an allotopically expressed subunit, entirely replacing the endogenous, mutant ATP6 and ND4 subunits in their respective OXPHOS complex.

The chimeric protein COX3-HA and the fusion protein MTSA6-EGFP were not imported into isolated rat mitochondria *in vitro*, although the positive control, ALDH, was efficiently imported. Bokori-Brown and Holt (2006) showed that ATP6 expressed *in vivo* is attached to the mitochondria, but not internalized, since it is sensitive to proteinase K. In contrast, although it's difficult to couple *in vivo* with *in vitro* approaches, Zullo et al. (2005) reported that CHO's ATP6 protein can be imported *in vitro* into isolated yeast mitochondria, nevertheless, no evidence was provided that import was energy-dependent or that their protein was not naturally protease-resistant.

The allotopic expression of the bovine COX I subunit in HeLa cells has been reported. The bovine COX I subunit, carrying the MTS of COX IV, seems to integrate into cytochrome *c* oxidase along with the other subunits of human origin, as judged by native electrophoresis, Western blots, and functional characterization of the enzymatic activity in mitoplasts (Tsukihara et al., 2003; Shimokata et al., 2007). Nevertheless, as pointed out by the authors themselves, the putative bovine-human hybrid enzyme remains to be isolated and subjected to biochemical and structural characterization (Shimokata et al., 2007).

In conclusion, the possibility for treatment of mitochondrial diseases by allotopic expression still seems to be far away. There are only three reports that have shown unequivocally functional and biochemical evidence of incorporation of allotopically expressed proteins into their respective OXPHOS complexes, ATP8 and COX2 in yeast (Law et al., 1990; Supekova et al., 2010) and ND7 in tobacco (Pineau et al., 2005). There are some features that we think were crucial for the successful allotopic expression of these three proteins: both are membrane proteins with only one or two TMSs, they are products of genes that have been re-localized to the nuclear genome in other species, and the allotopic expression was carried out in a mutant organism with the original mitochondrial gene deleted, avoiding competition between nucleus-encoded and mitochondria-encoded proteins. The functional allotopic expression of hydrophobic proteins with more than two TMSs is still controversial, and requires more extensive work. The natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in algae such as *Chlamydomonas* may represent a model for the successful allotopic expression of human mtDNA-encoded proteins. It is highly probable that there exist other elements involved in the efficient import and assembly of hydrophobic proteins in *Chlamydomonas* mitochondria that need to be identified and characterized, before attempting to emulate in human cells their targeting, insertion and assembly routes.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.mito.2010.09.003.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the critical comments and encouragement received from Drs. Marietta Tuena (IFC, UNAM) and Javier Plascencia (Facultad de Química, UNAM), the expert help in confocal techniques from Araceli Patrón and Gabriel Orozco Hoyuela (Unidad de Microscopía Electrónica, IFC, UNAM), and the technical assistance of Hyejeong Park (TJU). This research was supported by

grants 56619 and V43814-M from CONACyT (Mexico) and IN217108 from DGAPA, UNAM (Mexico). F.F.-M. received a fellowship from CONACyT (191084) to fulfill the Ph.D. requirements from the Graduate Program of Biochemistry, UNAM, and a travel support from PROMIE, CEP, UNAM.

References

- Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S.W., Ghosh, S.S., García, J.J., Capaldi, R.A., Marusich, M.F., 2002. A functionally active human F1F0 ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies. *J. Biol. Chem.* 277, 33906–33912.
- Banroques, J., Delahodde, A., Jacq, C., 1986. A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell* 46, 837–844.
- Bokori-Brown, M., Holt, I.J., 2006. Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase. *Rejuvenation Res.* 9, 455–469.
- Bonnet, C., Kaltimbacher, V., Ellouze, S., Augustin, S., Bénit, P., Forster, V., Rustin, P., Sahel, J.A., Corral-Debrinski, M., 2007. Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or V subunits. *Rejuvenation Res.* 10, 127–144.
- Bonnet, C., Augustin, S., Ellouze, S., Bénit, P., Bouaita, A., Rustin, P., Sahel, J.A., Corral-Debrinski, M., 2008. The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1707–1717.
- Cardol, P., Lapaille, M., Minet, P., Franck, F.A., Poptot, J.L., Jacq, C., 2006. ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme. *Eukaryot. Cell* 5, 1460–1467.
- Cavadini, P., Gakh, O., Isaya, G., 2002. Protein import and processing reconstituted with isolated rat liver mitochondria and recombinant mitochondrial processing peptidase. *Methods* 26, 298–306.
- Claros, M.G., von Heijne, G., 1994. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 685–686.
- Claros, M.G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F.A., Poptot, J.L., Jacq, C., 1995. Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur. J. Biochem.* 228, 762–771.
- Cortés-Hernández, P., Vázquez-Memije, M.E., García, J.J., 2007. ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1F0-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization. *J. Biol. Chem.* 282, 1051–1058.
- Daley, D.O., Clifton, R., Whelan, J., 2002a. Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 10510–10515.
- Daley, D.O., Adams, K.L., Clifton, R., Qualmann, S., Millar, A.H., Palmer, J.D., Pratje, E., Whelan, J., 2002b. Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J.* 30, 11–21.
- de Grey, A.D., 2000. Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use of inteins. *Trends Biotechnol.* 18, 394–399.
- DiMauro, S., Hirano, M., Schon, E.A., 2006. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 34, 265–283.
- Ellouze, S., Augustin, S., Bouaita, A., Bonnet, C., Simonutti, M., Forster, V., Picard, S., Sahel, J.A., Corral-Debrinski, M., 2008. Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 373–387.
- Farrell, L.B., Gearing, D.P., Nagley, P., 1988. Reprogrammed expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex of *Saccharomyces cerevisiae*. Expression *in vitro* from a chemically synthesized gene and import into isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 173, 131–137.
- Figueroa-Martínez, F., Funes, S., Franzén, L.-G., González-Halphen, D., 2008. Reconstructing the mitochondrial protein import machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179, 149–155.
- Funes, S., Davidson, E., Claros, M.G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P., 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.
- García, J.J., Ogilvie, I., Robinson, B.H., Capaldi, R.A., 2000. Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtDNA. *J. Biol. Chem.* 275, 11075–11081.
- Gearing, D.P., Nagley, P., 1986. Yeast mitochondrial ATPase subunit 8, normally a mitochondrial gene product, expressed *in vitro* and imported back into the organelle. *Embo J.* 5, 3651–3655.
- González-Halphen, D., Funes, S., Pérez-Martínez, X., Reyes-Prieto, A., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P., 2004. Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system. *Ann. NY Acad. Sci.* 1019, 232–239.
- Guy, J., Qi, X., Pallotti, F., Schon, E.A., Manfredi, G., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hauswirth, W.W., Lewin, A.S., 2002. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ann. Neurol.* 52, 534–542.
- Hammen, P.K., Waltner, M., Hahnemann, B., Heard, T.S., Weiner, H., 1996. The role of positive charges and structural segments in the presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase in import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 21041–21048.
- Hoffbuhr, K.C., Davidson, E., Filiano, B.A., Davidson, M., Kennaway, N.G., King, M.P., 2000. A pathogenic 15-base pair deletion in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit III results in the absence of functional cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 13994–14003.
- James, A.M., Sheard, P.W., Wei, Y.H., Murphy, M.P., 1999. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur. J. Biochem.* 259, 462–469.
- Kyriakouli, D.S., Boesch, P., Taylor, R.W., Lightowers, R.N., 2008. Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther.* 15, 1017–1023.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Law, R.H., Devenish, R.J., Nagley, P., 1990. Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 188, 421–429.
- Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J.E., Kwong, J.Q., Guy, J., Schon, E.A., 2002. Rescue of a deficiency in ATP synthase by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat. Genet.* 30, 394–399.
- Mitra, S.K., Goshe, M.B., 2009. Cysteinylation-tagging of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Meth. Mol. Biol.* 528, 311–326.
- Nagley, P., Devenish, R.J., 1989. Leading organellar proteins along new pathways: the relocation of mitochondrial and chloroplast genes to the nucleus. *Tibs* 14, 31–35.
- Nagley, P., Farrell, L.B., Gearing, D.P., Nero, D., Meltzer, S., Devenish, R.J., 1988. Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2091–2095.
- Oca-Cossio, J., Kenyon, L., Hao, H., Moraes, C.T., 2003. Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics* 165, 707–720.
- Ojaimi, J., Pan, J., Santra, S., Snell, W.J., Schon, E.A., 2002. An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit. *Mol. Biol. Cell* 13, 3836–3844.
- Pérez-Martínez, X., Funes, S., Tolkunova, E., Davidson, E., King, M.P., González-Halphen, D., 2002. Structure of nuclear-localized cox3 genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Curr. Genet.* 40, 399–404.
- Pineau, B., Mathieu, C., Gérard-Hirne, C., De Paepe, R., Chérit, P., 2005. Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking nad7. *J. Biol. Chem.* 280, 25994–26001.
- Roucou, X., Artika, I.M., Devenish, R.J., Nagley, P., 1999. Bioenergetic and structural consequences of allotopic expression of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. The hydrophobic character of residues 23 and 24 is essential for maximal activity and structural stability of the enzyme complex. *Eur. J. Biochem.* 261, 444–451.
- Schägger, H., 1994. Denaturing electrophoretic techniques. In: von Jagow, G., Schägger, H. (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*. Academic Press, San Diego, pp. 59–79.
- Shimokata, K., Katayama, Y., Murayama, H., Suematsu, M., Tsukihara, T., Muramoto, K., Aoyama, H., Yoshikawa, S., Shimada, H., 2007. The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 4200–4205.
- Supekova, L., Supek, F., Greer, J.E., Schultz, P.G., 2010. A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotopic expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 5047–5052.
- Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H., Muramoto, K., Aoyama, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yao, M., Ishimura, Y., Yoshikawa, S., 2003. The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 15304–15309.
- Varanasi, L., Mills, D., Murphree, A., Gray, J., Purser, C., Baker, R., Hosler, J., 2006. Altering conserved lipid binding sites in cytochrome c oxidase of *Rhodospirillum rubrum* perturbs the interaction between subunits I and III and promotes suicide inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 45, 14896–14907.
- Zullo, S.J., 2001. Gene therapy of mitochondrial DNA mutations: a brief, biased history of allotopic expression in mammalian cells. *Semin. Neurol.* 21, 327–335.
- Zullo, S.J., Parks, W.T., Chloupkova, M., Wei, B., Weiner, H., Fenton, W.A., Eisenstadt, J.M., Merrill, C.R., 2005. Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (oli(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded oli(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy. *Rejuvenation Res.* 8, 18–28.

Reconstructing the Mitochondrial Protein Import Machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*

Francisco Figueroa-Martínez,* Soledad Funes,[†] Lars-Gunnar Franzén[‡] and Diego González-Halphen*¹

*Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico, [†]Institut für Physiologische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, D-81377 Munich, Germany and [‡]School of Business and Engineering, Naturrum, University of Halmstad, SE-301 18 Halmstad, Sweden

Manuscript received February 11, 2008
Accepted for publication March 21, 2008

ABSTRACT

In *Chlamydomonas reinhardtii* several nucleus-encoded proteins that participate in the mitochondrial oxidative phosphorylation are targeted to the organelle by unusually long mitochondrial targeting sequences. Here, we explored the components of the mitochondrial import machinery of the green alga. We mined the algal genome, searching for yeast and plant homologs, and reconstructed the mitochondrial import machinery. All the main translocation components were identified in *Chlamydomonas* as well as in *Arabidopsis thaliana* and in the recently sequenced moss *Physcomitrella patens*. Some of these components appear to be duplicated, as is the case of Tim22. In contrast, several yeast components that have relatively large hydrophilic regions exposed to the cytosol or to the intermembrane space seem to be absent in land plants and green algae. If present at all, these components of plants and algae may differ significantly from their yeast counterparts. We propose that long mitochondrial targeting sequences in some *Chlamydomonas* mitochondrial protein precursors are involved in preventing the aggregation of the hydrophobic proteins they carry.

THE endosymbiotic process that originated mitochondria (POOLE and PENNY 2007) was followed by a massive migration of genes to the nucleus. This gave rise to the highly reduced mitochondrial genomes that exist today (GRAY *et al.* 1999). In many eukaryotes, mitochondrial DNA contains a limited set of genes encoding components of oxidative phosphorylation (OXPHOS): seven genes encoding NADH dehydrogenase subunits (*nad1-6* and *nad4L*), three genes encoding cytochrome *c* oxidase subunits (*cox1-3*), two genes encoding ATP synthase polypeptides (*atp6* and *atp8*), and the gene encoding the cytochrome *b* from the *bc₁* complex (*cob*) (WALLACE 2007). In contrast, the mitochondrial genomes of chlorophycean algae like *Chlamydomonas reinhardtii* lack the genes *nad3*, *nad4L*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, and *atp8* (VAHRENHOLZ *et al.* 1993; DENOVAN-WRIGHT *et al.* 1998; FAN and LEE 2002). Many of these genes have migrated to the nucleus and their protein products are imported into the mitochondrion (PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* 2000, 2001; FUNES *et al.* 2002; CARDOL *et al.* 2006). In addition, the *cox2* gene was fragmented into the independent genes *cox2a* and *cox2b* (PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* 2001). The nucleus-encoded genes *nad3*, *nad4L*, *cox2a*, *cox2b*, *cox3*, and *atp6* adapted for expres-

sion by modifying their codon usage; they also acquired promoters, polyadenylation signals, introns, and mitochondrial targeting sequences (MTSs) (GONZÁLEZ-HALPHEN *et al.* 2004). MTSs are generally small, cleavable N-terminal presequences of 20–40 residues, capable of forming amphiphilic α -helices that are recognized by the import apparatus (REHLING *et al.* 2004; NEUPERT and HERRMANN 2007). *Chlamydomonas* MTSs vary in size; the short ones direct the proteins to the mitochondrial matrix, such as the α - and β -subunits of the F₀F₁-ATP synthase (45 and 26 amino acids, respectively; FRANZÉN and FALK 1992; NURANI and FRANZÉN 1996). The MTSs of intermediate length direct proteins to the inner mitochondrial membrane, such as the Rieske iron–sulfur protein (54 amino acids; ATTEIA and FRANZÉN 1996) and cytochrome *c*₁ (70 amino acids; ATTEIA *et al.* 2003). Long MTSs help import of proteins with two or more transmembrane stretches, such as Atp6 (107 amino acids; FUNES *et al.* 2002), Cox3 (110 residues; PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* 2000), Cox2A (130 amino acids; PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* 2001), Nad3 (160 residues; CARDOL *et al.* 2006), and Nad4L (133 amino acids; CARDOL *et al.* 2006). Although experimental evidence is lacking, they seem to have a bipartite nature that may allow both targeting to the mitochondrial matrix and subsequent insertion into the inner mitochondrial membrane.

Parallel to the migration of mitochondrial genes to the nucleus, mechanisms for the import of cytosol-synthesized proteins into the organelle evolved (HERRMANN

¹Corresponding author: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, Mexico. E-mail: dhalphen@ifc.unam.mx

2003). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, has been the system of choice to study the mitochondrial import machinery (HERRMANN and NEUPERT 2003). The four main translocators are the translocase of the outer membrane (TOM) complex, the translocase of the inner membrane (TIM)22 and TIM23 complexes, and the topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel proteins/sorting and assembly machinery (TOB/SAM) complex.

The entry point for all mitochondria-destined proteins is the TOM complex, which consists of one central channel (formed by Tom40, Tom7, Tom6, and Tom5) and three receptor proteins (Tom70, Tom22, and Tom20) (RAPAPORT 2005).

Sorting of the incoming proteins occurs in the mitochondrial intermembrane space (IMS). Two hexameric complexes of small Tim proteins (Tim9/Tim10 and Tim8/Tim13) guide the substrate proteins either to the TOB/SAM complex in the outer membrane or to the TIM22 complex in the inner membrane (NEUPERT and HERRMANN 2007).

The TOB/SAM complex, composed of Tob55, Tob38, and Mas37, mediates the topogenesis of outer membrane β -barrel proteins. Tob55 constitutes the translocation channel, and together with Tob38 it conforms the minimal functional unit of the complex. Mas37 might be involved in the release of β -barrel intermediates to the membrane (PASCHEN *et al.* 2005).

The IMS proteins are imported by means of a bipartite MTS, they anchor to the TIM23 translocase, they are laterally released into the inner membrane, and finally they are liberated as soluble proteins after a second proteolytic cleavage. Alternatively, soluble proteins that lack a MTS are trapped within the IMS after binding cofactors or by folding via disulfide bridges. This second pathway is mediated by Mia40 and Erv1, which conform the disulfide relay system (HERRMANN and HELL 2005).

The proteins that reside within the inner membrane reach their destiny through three different pathways:

- i. Membrane proteins with even-numbered transmembrane segments that expose both N and C termini to the IMS (*i.e.*, the family of carrier proteins) are delivered by the small TIM proteins to the TIM22 complex (composed of Tim12, Tim18, Tim22, Tim54, and a fraction of Tim9 and Tim10; REHLING *et al.* 2004).
- ii. MTS-containing proteins of the inner membrane that have only one transmembrane domain whose N terminus is facing the matrix are imported through TIM23 by a “stop-transfer” mechanism. The transmembrane domain functions as a sorting signal that arrests the import of the precursor and allows its lateral insertion into the inner membrane. The stop-transfer mechanism also works for proteins with the opposite orientation, *i.e.*, N terminus facing the IMS (VAN LOON *et al.* 1986; GLICK *et al.* 1992).
- iii. MTS-containing proteins with more than one transmembrane domain are imported into the matrix where they bind mtHsp70 and are subsequently integrated into the inner membrane (HARTL *et al.* 1987; HERRMANN *et al.* 1997; NEUPERT and HERRMANN 2007). This last integration step is mediated by Oxa1 (HELL *et al.* 1998) and Mba1 (PREUSS *et al.* 2001). These two components are also involved in the insertion of mitochondria-synthesized proteins.

Mitochondrial proteins destined to the matrix are translocated by TIM23 in a process that requires a membrane potential ($\Delta\Psi$) and ATP hydrolysis. TIM23 is formed by two sectors that operate sequentially (KUTIK *et al.* 2007; NEUPERT and HERRMANN 2007): the protein-conducting channel (formed by Tim23, Tim17, Tim21, and Tim50) and the import motor (formed by Tim44, Tim16, Tim14, and mtHsp70). The stepwise insertion of preproteins to the matrix is achieved by spontaneous sliding reactions through the pores of TOM and TIM23. The polypeptides are trapped in the matrix by the sequential binding of several molecules of Hsp70 that also prevent possible retrograde movements (OKAMOTO *et al.* 2002).

Here, we mined the *Chlamydomonas* genome (MERCHANT *et al.* 2007), looking for yeast and Arabidopsis homologs, to reconstruct the algal mitochondrial import machinery. For broader comparison purposes, we also mined the draft genome of the moss *Physcomitrella patens*. In this study, we have limited our analysis to those proteins involved directly in the import process; thus, we have omitted several chaperones, as well as nucleotide exchange factors that do not interact directly with the incoming polypeptides or that do not belong to the import complexes described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Since atypical MTSs are present in several mitochondrial OXPHOS precursors of *Chlamydomonas*, it is likely that uncharacterized machineries exist to ensure the import of proteins containing two or more transmembrane stretches into the inner mitochondrial membrane. As a starting point we explored the components of the mitochondrial import machinery that are conserved in the yeast system. Table 1 lists the identified components of the *Chlamydomonas* mitochondrial import machinery and compares them with its yeast and Arabidopsis counterparts. Figure 1 shows the disposition of the green alga import machinery components in the different mitochondrial compartments. All the main translocation components seem to be present in *Chlamydomonas* as well as in plants. Indeed, isolated mitochondria from *Chlamydomonas* are able to import plant mitochondrial precursor proteins, although with much less efficiency than its own (NURANI *et al.* 1997). Arabidopsis also exhibits duplication of several compo-

TABLE 1

Genomic analysis of the mitochondrial protein import machinery components from *Chlamydomonas*

| Name in yeast (accession no.) | Alternative names in yeast | Counterparts in Arabidopsis (accession no.) | Counterpart in <i>Chlamydomonas</i> (accession no.) | Counterpart present in <i>Physcomitrella patens</i> |
|----------------------------------|-------------------------------|--|---|---|
| Outer membrane: TOM complex | | | | |
| Tom70 (NP_014278) | Mas70, Mom72, Omp1 | NI | NI | NI |
| Tom40 (NP_013930) | Isp42, Mom38 | TOM40-1 (NP_188634) TOM40-2 (NP_175457) | Tom40 (EDP06354) | (+) |
| Tom22 (NP_014268) | Mas17, Mas22, Mom22 | TOM9-1 (NP_563699) TOM9-2 (Q9FNC9) | Tom22 ^a | (+) |
| Tom20 (NP_011596) | Mas20, Mom19 | TOM20-1 (NP_189343) TOM20-2 (NP_174059) TOM20-3 (NP_189344) TOM20-4 (NP_198909) | Tom20 (EDP03564) | (+) |
| Tom7 (NP_014329) | Mom7, Yok22 | TOM7-1 (NP_568593) TOM7-2 (Q3ECI7) | Tom7 (EDP05834) | (+) |
| Tom6 (NP_014688) | Isp6, Mom8B | TOM6 (NP_564545) | Tom6 (EDO98875) ^b | (+) |
| Tom5 (NP_015459) | Mom8A | TOM5 (NP_196421) | Tom5 (EDP08420) | N.I. |
| Outer membrane: TOB/SAM complex | | | | |
| Mim1 (NP_014616) | Tom13 | NI | NI | (+) |
| Tob55 (NP_014372) | Sam50, Tom50, Omp85 | TOB55 (NP_568157) | Tob55 (EDP05088) | (+) |
| Tob38 (NP_011951) | Sam35, Tom38 | METAXIN (NP_565446) | Tob38 (EDP05944) | (+) |
| Mas37 (NP_013776) | Sam37, Tom37 | NI | NI | NI |
| Intermembrane space | | | | |
| Mia40 (NP_012726) | Tim40 | Mia40 (NP_200377) | Mia40 (EDO96731) | NI |
| Erv1 (NP_011543) | | Erv1 (NP_564557) | Erv1 (EDP03768) | (+) |
| Tim13 (NP_011697) | | TIM13 (NP_564780) | Tim13 (EDO99447) | (+) |
| Tim8 (NP_058168) | | TIM8 (NP_199894) | Tim8 (EDP04523) | (+) |
| Tim10 (NP_011869) | Mrs11 | TIM10 (NP_565682) | Tim10 (EDO96752) | (+) |
| Tim9 (NP_010894) | | TIM9 (NP_190240) | Tim9 (EDP09353) | (+) |
| Tim12 (NP_009649) | Mrs5 | NI | NI | NI |
| Inner membrane: TIM23 complex | | | | |
| Tim50 (NP_015262) | | TIM50 (NP_175986) | Tim50 (EDP05270) | (+) |

(continued)

TABLE 1
(Continued)

| Name in yeast (accession no.) | Alternative names in yeast | Counterparts in Arabidopsis (accession no.) | Counterpart in Chlamydomonas (accession no.) | Counterpart present in <i>Physcomitrella patens</i> |
|----------------------------------|-------------------------------|--|--|---|
| Tim44 (NP_012242) | | TIM44-1 (NP_565473) TIM44-2 (NP_181151) | Tim44 (EDO99746) | (+) |
| Tim23 (NP_014414) | Mim23, Mpi3, Mas6 | NP_564028 (TIM23-1) NP_177419 (TIM23-2) (TIM23-3) NP_187131 | Tim23 (EDP09567) | (+) |
| Tim21 (NP_011547) | | NI | NI | NI |
| Tim17 (NP_012392) | Mim17, Mpi2, Sms1 | NP_173460 (TIM17-1) NP_973621 (TIM17-2) NP_196730 (TIM17-3) | Tim17 (EDP07835) | (+) |
| Pam17 (NP_012991) | | NI | NI | NI |
| Tim16 (NP_012431) | Pam16, Tim16, Mia1 | NP_851243 (Tim16) | Tim16 (EDP00908) | (+) |
| Tim14 (NP_013108) | Pam18, Tim14 | NP_565824 (TIM14-1) NP_566352 (TIM14-2) | Tim14 (EDP02285) | (+) |
| Inner membrane: TIM22 complex | | | | |
| Tim54 (NP_012481) | | NI | NI | NI |
| Tim22 (NP_010064) | | NP_566368 (TIM22-1) NP_567754 (TIM22-2) NP_200362 (TIM22-3) | Tim22A (EDP09249) Tim22B (EDO96777) Tim22C (EDP09499) | (+) |
| Tim18 (NP_014940) | | NI | NI | NI |
| Matrix | | | | |
| Tam41 (NP_011560) | Mmp37 | NP_190347 (Tam41) | Tam41 (EDP05657) | (+) |
| Hsp70 (NP_012579) | Ssc1 | NP_196521 (Hsp70) | Hsp70 (EDP02463) | (+) |
| Protein export | | | | |
| Oxa1 (NP_011081) | Alb3, YidC | NP_201011 (OXA1P) | Oxa1 (EDO98825) | (+) |

Homologous sequences in yeast and Arabidopsis were identified in Chlamydomonas. Accession numbers of protein sequences were obtained from Entrez at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Homologous sequences usually exhibited p -values $< 1 \times 10^{-5}$. NI (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found. (+) indicates that a counterpart is present in the draft version of the genome of *Physcomitrella patens* (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html).

^aNot identified in the protein database, but present in the Chlamydomonas genome [scaffold_38 (1,040,279 bp): nucleotides 212,622–212,814 (192 bp)].

^bThe protein model is probably wrong. Tim6 would correspond only to the N-terminal region of a protein EDO98875. A stop codon was probably overlooked in the original ORF. Also present in the Chlamydomonas genome [scaffold_45 (891,468 bp): nucleotides 206,948–207,055 (108 bp)].

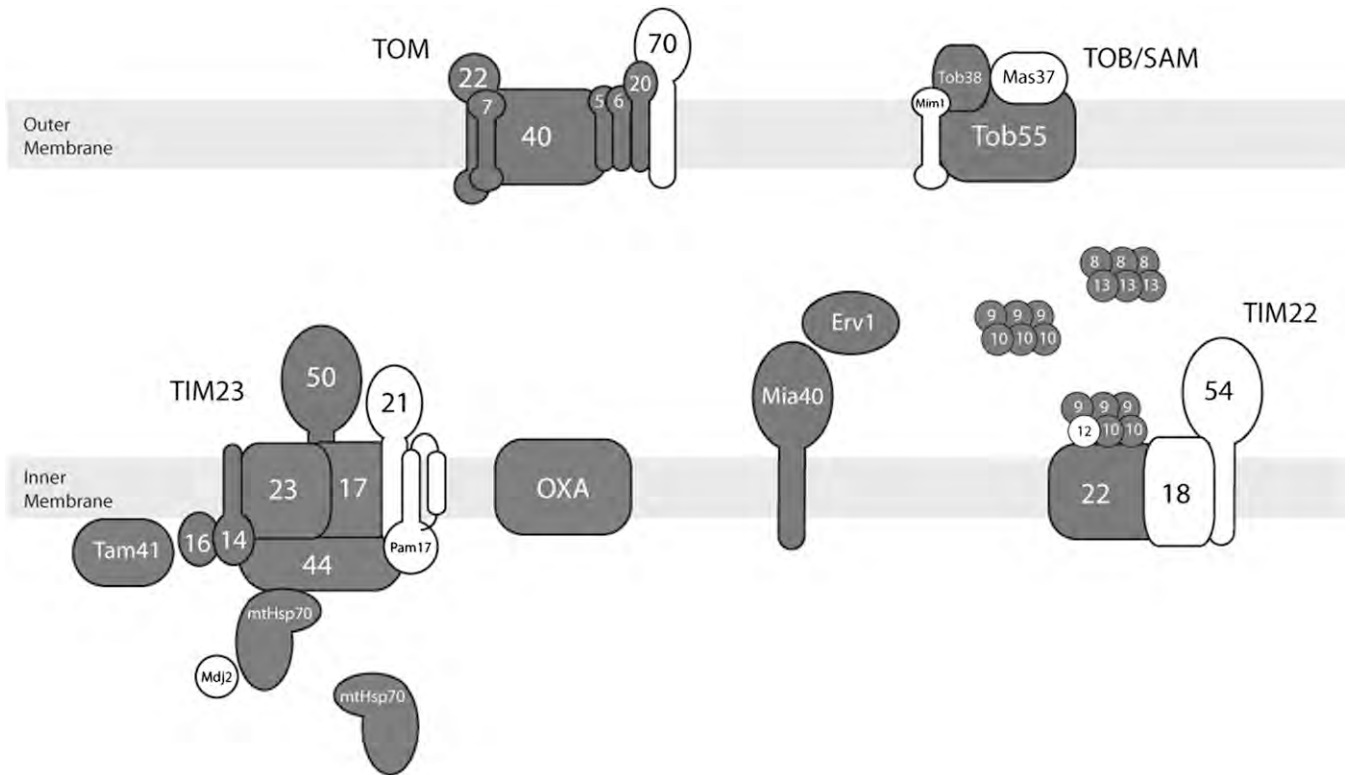


FIGURE 1.—The mitochondrial protein import machinery of yeast and the corresponding homologs identified in *Chlamydomonas*. Shaded components are yeast components that have counterparts in plants and green algae. Open components are proteins present in the yeast mitochondrial import machinery that were not present or could not be identified in plants and green algae.

nents, since isoforms of Tom7, Tom20, Tom22, Tom40, Tim14, Tim17, Tim23, Tim44, and Tim22 are present. *Chlamydomonas* seems to possess at least three isoforms of Tim22. The duplication of Tim22 in land plants and green algae could be related to the absence of Tim18 and Tim54 in the TIM22 complex. The functional significance of multiple Tim22 copies in plants and green algae remains to be ascertained.

Notably, some components that have relatively large hydrophilic regions exposed to the cytosol (Tom70 in the case of TOM and Mim1 and Mas37 in the case of TOB/SAM) or to the IMS (Tim21 in the case of TIM23 and Tim54 and Tim18 in the case of TIM22) seem to be absent in land plants and green algae. These proteins, which are present but are not essential in the yeast import system, may have originated later in evolution. This hypothesis is also supported by the fact that in human mitochondria, and presumably in other animals as well, Mas37, Tim21, Tim54, and Tim18 seem to be also absent (MACKENZIE and PAYNE 2007). Components with large regions protruding out of the lipid bilayer suggest an important function in the recognition of precursor proteins and might reflect the uniqueness of each system. In contrast with what we observed in land plants and green algae, human mitochondria seem to lack receptors like Tom6 and Tom5 but contain Tom70, which appears to be missing in plants and green

algae (MACKENZIE and PAYNE 2007). The plant and algal receptors may have a structure that differs from the one of yeast; this may allow them to recognize specific MTSs, such as the long ones described above. These novel receptors have escaped detection by the *in silico* approach used in this work, but they may be identified by future biochemical and proteomic studies. Efforts in this direction have already been undertaken with the *Arabidopsis* mitochondrial proteome (HEAZLEWOOD and MILLAR 2005; MILLAR *et al.* 2005), and initial novel components as well as minimal units of import complexes have also been described in this land plant (LISTER *et al.* 2007).

As the receptor components that have relatively large hydrophilic regions are absent in both *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*, we looked for other ways to explain the presence of atypical MTSs. Nucleus-encoded proteins with two or more transmembrane stretches containing exceedingly long MTSs are difficult to import into organelles due to their high hydrophobicity (POPOT and DE VITRY 1990; CLAROS *et al.* 1995). To date, *Chlamydomonas* seems to be unique in the sense that it is able to import into the matrix several cytosol-synthesized proteins with two or more transmembrane stretches and to insert them in the mitochondrial inner membrane. When the nucleus-encoded Atp6, Cox3, Cox2A, Nad3, and Nad4L proteins from *Chlamydomo-*

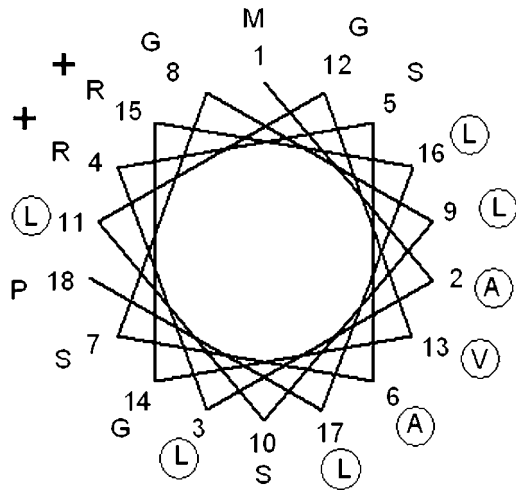


FIGURE 2.—Helical-wheel projection of the first 18 residues of the MTS of the nucleus-encoded mitochondrial Nad3 protein of *Chlamydomonas*. Hydrophobic amino acids are circled and charged residues are indicated by their charge. The amphipathic character of the helix, exposing a large hydrophobic sector, is evident.

nas were compared with their mitochondrion-encoded counterparts from other organisms, it was found that the algal ones are less hydrophobic (PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* 2000, 2001; FUNES *et al.* 2002; CARDOL *et al.* 2006). This reduction in hydrophobicity may increase the importability of the proteins. However, as the proteins contain transmembrane helices, they are still much more hydrophobic than most other proteins that are imported into the mitochondrion. Therefore, it is probable that the proteins have large hydrophobic regions exposed at the surface. To prevent aggregation, it is necessary to mask these hydrophobic surfaces. To some extent, chaperones may help proteins to stay in solution, but for very hydrophobic proteins additional mechanisms may be needed. We now propose that the long MTSs of hydrophobic mitochondrial proteins form amphipathic structures that cover the hydrophobic surfaces of the proteins, increasing their hydrophilicity. Figure 2 shows the helical wheel projection of the first 18 residues of the MTS of the Nad3 preprotein. As shown for other mitochondrial MTS sequences of *Chlamydomonas* (ATTEIA and FRANZÉN 1996), the amphiphilic helices exhibit a large hydrophobic sector. Possibly the long MTSs of hydrophobic preproteins are indeed bipartite: one first segment can direct the protein to the matrix, leaving the second segment available to be recognized by inner membrane components that would guide the proteins to the site where insertion can occur. This processing step linked to insertion could be regulated by inner membrane proteases as it happens in yeast (KOPPEN and LANGER 2007).

There are few other examples of nuclear genes encoding highly hydrophobic mitochondrial proteins that migrated to the nuclear genome; such is the case of

the *cox2* gene of some legumes (ADAMS *et al.* 1999). The mitochondrial import of the Cox2 protein has been studied in soybean (DALEY *et al.* 2002a,b). As in *Chlamydomonas*, the soybean Cox2 protein is less hydrophobic than the mitochondria-encoded Cox2 proteins, and it also has a very long tripartite MTS of 136 amino acids. This MTS cannot be replaced by other MTSs (DALEY *et al.* 2002a). The first 20 amino acids are required for mitochondrial targeting and may be replaced by another MTS, the central portion is required for efficient import, and the last 12 amino acids are required for correct maturation. When this MTS was fused to a mitochondrion-encoded Cox2 protein, the protein could not be imported into soybean mitochondria unless the hydrophobicity of the first transmembrane helix of Cox2 was decreased (DALEY *et al.* 2002b). Thus, the successful import of Cox2 requires two adaptations: a decreased hydrophobicity of the first transmembrane helix and a very long MTS. The central portion of the MTS contains both hydrophobic and hydrophilic amino acids (36% hydrophobic amino acids, 16% charged amino acids). This amino acid composition is compatible with our proposal that the MTS forms an amphipathic structure that masks hydrophobic surfaces of the protein during import.

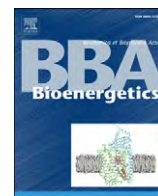
In summary, the recent completion of the *Chlamydomonas* genome (MERCHANT *et al.* 2007) allowed the partial reconstruction of the mitochondrial protein import machinery of the green alga. A future proteomic survey of *Chlamydomonas* mitochondria should focus on identifying probable novel components that function as receptors of protein precursors with a specific plant/algal MTS, in particular, the putative substitutes of the yeast Tom70, Mim1, Mas37, Tim54, Tim21, and Tim18. We expect that this partial reconstruction of the *Chlamydomonas* mitochondrial import machinery may stimulate experimental proteomic approaches that will establish the identity of novel components. Of particular interest is to acquire knowledge of the pathway through which preproteins with two or more transmembrane segments that participate in OXPHOS are imported and inserted into the mitochondrial inner membrane of *Chlamydomonas*.

The technical expertise of Miriam Vázquez-Acevedo (D.G.-H. laboratory) is gratefully acknowledged. Work in our laboratories is supported by grants 56619 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) and IN217108 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. L.-G.F. was supported by a grant from the Carl Trygger Foundation.

LITERATURE CITED

- ADAMS, K. L., K. SONG, P. G. ROESSLER, J. M. NUGENT, J. L. DOYLE *et al.*, 1999. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13863–13868.
- ATTEIA, A., and L.-G. FRANZÉN, 1996. Identification, cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

- Implications for protein targeting and subunit interaction. *Eur. J. Biochem.* **237**: 792–799.
- ATTEIA, A., R. VAN LIS, D. WETTERSKOG, E. B. GUTIÉRREZ-CIRLOS, L. ONGAY-LARIOS *et al.*, 2003 Structure, organization and expression of the genes encoding mitochondrial cytochrome *c*(1) and the Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics* **268**: 637–644.
- CARDOL, P., M. LAPAILLE, P. MINET, F. FRANCK, R. F. MATAGNE *et al.*, 2006 ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme. *Eukaryot. Cell* **5**: 1460–1467.
- CLAROS, M. G., J. PEREA, Y. SHU, F. A. SAMATEY, J. L. POPOT *et al.*, 1995 Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur. J. Biochem.* **228**: 762–771.
- DALEY, D. O., K. L. ADAMS, R. CLIFTON, S. QUALMANN, A. H. MILLAR *et al.*, 2002a Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J.* **30**: 11–21.
- DALEY, D. O., R. CLIFTON and J. WHELAN, 2002b Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10510–10515.
- DENOVAN-WRIGHT, E. M., A. M. NEDELCO and R. W. LEE, 1998 Complete sequence of the mitochondrial DNA of *Chlamydomonas eugametos*. *Plant Mol. Biol.* **36**: 285–295.
- FAN, J., and R. W. LEE, 2002 Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: two linear DNA molecules with homologous inverted repeat termini. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 999–1007.
- FRANZÉN, L. G., and G. FALK, 1992 Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol. Biol.* **19**: 771–780.
- FUNES, S., E. DAVIDSON, M. G. CLAROS, R. VAN LIS, X. PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 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.
- GLICK, B. S., A. BRANDT, K. CUNNINGHAM, S. MÜLLER, R. L. HALLBERG *et al.*, 1992 Cytochromes *c*1 and *b*2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**: 809–822.
- GONZÁLEZ-HALPHEN, D., S. FUNES, X. PÉREZ-MARTÍNEZ, A. REYES-PRIENTO, M. G. CLAROS *et al.*, 2004 Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system. *Ann. NY Acad. Sci.* **1019**: 232–239.
- GRAY, M. W., G. BURGER and B. F. LANG, 1999 Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476–1481.
- HARTL, F. U., J. OSTERMANN, B. GUIARD and W. NEUPERT, 1987 Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell* **51**: 1027–1037.
- HEAZLEWOOD, J. L., and A. H. MILLAR, 2005 AMPDB: the Arabidopsis mitochondrial protein database. *Nucleic Acids Res.* **33**: D605–D610.
- HELL, K., J. M. HERRMANN, E. PRATJE, W. NEUPERT and R. A. STUART, 1998 Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2250–2255.
- HERRMANN, J. M., 2003 Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* **11**: 74–79.
- HERRMANN, J. M., and K. HELL, 2005 Chopped, trapped or tacked-protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 205–211.
- HERRMANN, J. M., and W. NEUPERT, 2003 Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**: 219–225.
- HERRMANN, J. M., W. NEUPERT and R. A. STUART, 1997 Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* **16**: 2217–2226.
- KUTIK, S., B. GUIARD, H. E. MEYER, N. WIEDEMANN and N. PFANNER, 2007 Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import. *J. Cell Biol.* **179**: 585–591.
- KOPPEN, M., and T. LANGER, 2007 Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**: 221–242.
- LISTER, R., C. CARRIE, O. DUNCAN, L. H. HO, K. A. HOWELL *et al.*, 2007 Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* **19**: 3739–3759.
- MACKENZIE, J. A., and R. M. PAYNE, 2007 Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochem. Biophys. Acta* **1772**: 509–523.
- MERCHANT, S. S., S. E. PROCHNIK, O. VALLON, E. H. HARRIS, S. J. KARPOWICZ *et al.*, 2007 The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245–250.
- MILLAR, A. H., J. L. HEAZLEWOOD, B. K. KRISTENSEN, H. P. BRAUN and I. M. MØLLER, 2005 The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* **10**: 36–43.
- NEUPERT, W., and J. M. HERRMANN, 2007 Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 723–749.
- NURANI, G., and L.-G. FRANZÉN, 1996 Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Mol. Biol.* **31**: 1105–1116.
- NURANI, G., M. ERIKSSON, C. KNORPP, E. GLASER and L.-G. FRANZÉN, 1997 Homologous and heterologous protein import into mitochondria isolated from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **35**: 973–980.
- OKAMOTO, K., A. BRINKER, S. A. PASCHEN, I. MOAREFI, M. HAYERHARTL *et al.*, 2002 The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J.* **21**: 3659–3671.
- PASCHEN, S. A., W. NEUPERT and D. RAPAPORT, 2005 Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 575–582.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, X., M. VÁZQUEZ-ACEVEDO, E. TOLKUNOVA, S. FUNES, M. G. CLAROS *et al.*, 2000 Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonas* algae. *J. Biol. Chem.* **275**: 30144–30152.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, X., A. ANTARAMIAN, M. VÁZQUEZ-ACEVEDO, S. FUNES, E. TOLKUNOVA *et al.*, 2001 Subunit II of cytochrome *c* oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J. Biol. Chem.* **276**: 11302–11309.
- POOLE, A. M., and D. PENNY, 2007 Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays* **29**: 74–84.
- POPOT, J.-L., and C. DE VITRY, 1990 On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**: 369–403.
- PREUSS, M., K. LEONHARD, K. HELL, R. A. STUART, W. NEUPERT *et al.*, 2001 Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **153**: 1085–1096.
- RAPAPORT, D., 2005 How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J. Cell Biol.* **171**: 419–423.
- REHLING, P., K. BRANDNER and N. PFANNER, 2004 Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 519–530.
- VAHRENHOLZ, C., G. RIEMEN, E. PRATJE, B. DUJON and G. MICHAELIS, 1993 Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr. Genet.* **24**: 241–247.
- VAN LOON, A. P., A. W. BRÄNDLI and G. SCHATZ, 1986 The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. *Cell* **44**: 801–812.
- WALLACE, D. C., 2007 Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 781–821.



Subunit–subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp.

Araceli Cano-Estrada^a, Miriam Vázquez-Acevedo^a, Alexa Villavicencio-Queijeiro^a, Francisco Figueroa-Martínez^a, Héctor Miranda-Astudillo^a, Yraima Cordeiro^b, Julio A. Mignaco^c, Debora Foguel^c, Pierre Cardol^d, Marie Lapaille^d, Claire Remacle^d, Stephan Wilkens^e, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Genetics of Microorganisms, Institute of Plant Biology, University of Liège, Liège, Belgium

^e Department of Biochemistry & Molecular Biology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY 13210, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2009

Received in revised form 15 February 2010

Accepted 22 February 2010

Available online 25 February 2010

Keywords:

Oxidative phosphorylation

F₁F₀-ATP synthase

Dimeric mitochondrial complex V

Chlorophycean algae

Stator stalk

Chlamydomonas reinhardtii

Polytomella sp.

ASA subunits

ABSTRACT

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase of chlorophycean algae is a dimeric complex of 1600 kDa constituted by 17 different subunits with varying stoichiometries, 8 of them conserved in all eukaryotes and 9 that seem to be unique to the algal lineage (subunits ASA1–9). Two different models proposing the topological assemblage of the nine ASA subunits in the ATP synthase of the colorless alga *Polytomella* sp. have been put forward. Here, we readdressed the overall topology of the enzyme with different experimental approaches: detection of close vicinities between subunits based on cross-linking experiments and dissociation of the enzyme into subcomplexes, inference of subunit stoichiometry based on cysteine residue labelling, and general three-dimensional structural features of the complex as obtained from small-angle X-ray scattering and electron microscopy image reconstruction. Based on the available data, we refine the topological arrangement of the subunits that constitute the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase (complex V) makes ATP using the electrochemical proton gradient generated by the respiratory chain. The synthase is an oligomeric complex embedded in the inner mitochondrial membrane that works like a rotary motor [1–3]. Chlorophycean algae like *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp., a particular lineage of green algae (the Chlorophytes), have a highly stable dimeric mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, with an estimated molecular mass of 1600 kDa [4–9]. The chlorophycean enzyme contains the eight conserved subunits present in the vast majority of eukaryotes, which represent the main components of the proton-driven rotary motor and the catalytic sector of the enzyme: subunits α , β , γ , δ , ϵ , a (ATP6), c (ATP9), and OSCP. Nevertheless, and in sharp contrast with other mitochondrial F₁F₀-ATP synthases, like

the one from beef heart, the algal enzyme seems to lack several classic components [10]: the subunits of the peripheral stalk b , d , f , A6L, and F6 [11,12], the subunits responsible for dimer formation e and g [13,14], and the regulatory polypeptides IF₁ [15] and factor b [16]. Instead, the algal enzyme contains nine subunits with molecular masses ranging from 8 to 60 kDa named ASA1 to ASA9 (for ATP synthase associated proteins) [4,7,10]. The ASA subunits build up a highly robust peripheral stalk with a unique architecture, as observed on single-particle electron microscopy (EM) images [6,17].

Two contrasting models suggesting a topological arrangement for subunits ASA1 to ASA9 of the *Polytomella* ATP synthase have been put forward [7,8]. We found of interest to gain further insights on the close-neighbor relationships between the ASA subunits and their interactions with some of the classical subunits. In this work, we reassessed the topological disposition of the components of the algal mitochondrial ATP synthase using different experimental approaches: detection of subunit–subunit interactions based on cross-linking experiments, generation of subcomplexes after partial dissociation of the dimeric ATP synthase, inference of subunit stoichiometry based on labelling of cysteine residues, and modelling the overall structural

* Corresponding author. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, Delegación Coyoacán, 04510 México D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5622 5620; fax: +52 55 5622 5611.

E-mail address: dhalphen@ifc.unam.mx (D. González-Halphen).

features of the complex from small-angle X-ray scattering (SAXS) data and EM image reconstruction. Based on the results obtained from these diverse experimental strategies, we suggest a refined model for the disposition of the 17 different polypeptides with varying stoichiometries that constitute the algal mitochondrial ATP synthase.

2. Materials and methods

2.1. Algal strains and growth conditions

Polytomella sp. (198.80, E.G. Pringsheim) obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (SAG) was grown as previously described [5].

2.2. Cloning and sequencing of cDNAs encoding subunits of the ATP synthase of *Polytomella* sp.

The DNA sequences encoding regions for the subunits ASA2 (partial), ASA3 (partial), ASA4, ASA6, ASA7, ASA8, δ and OSCP from *Polytomella* sp. were each amplified from a λ -ZAPII cDNA library [18] by PCR with the appropriate oligonucleotide primers. Primers were synthesized with restriction sites to allow efficient subsequent cloning (not shown). The designed forward primers were as follows: ASA2f, 5'-GAC GCT GCC GT (C/G/T) GC(C/G/T) CT(C/T) AC(C/T) TAC-3'; ASA3f, 5'-ATG-CGT-CAG-GCT-AGT-CGC-3'; ASA4f, 5'-GCT ACC GAG CCT GCT GTT TC-3'; ASA6f, 5'-GCT TGA TCT TTC ATA AAG ATG-3'; ASA7f, 5'-CTT ACC ACT TTT ACC TTC-3'; ASA8f, 5'-ATG GTC CTC GGT GAG GTC TAC-3'; DELTAf, 5'-GAC ACT ATG TTT GGA CTC AAA-3'; and OSCPf, 5'-GCT GCC CAG GCT GAG CTC AAG-3'. The reverse primers used were as follows: ASA2r, 5'-TCA (G/A/C)AC (G/A)GC GTA (G/A)CC CTG (G/A/C)GC CTC-3'; ASA3r, 5'-GTG-AAG-TTG-GCG-GAG-ACG-TTG-3'; ASA4r, 5'-TTA AGC AGC GAC CTT AGG GC-3'; ASA6r, 5'-ATA TTG GTC AAT CAT TTA AAG-3'; ASA7r, 5'-CTA TGC TTG GAG AGG AGG AAG-3'; ASA8r, 5'-TAG TGA CCA CCA GCA GTG TAA G-3'; DELTAr, 5'-TTT ATC TAA TTA CGC TTA AGC-3'; and OSCPr, 5'-AAC GAA CTA ATT TAA ATA GAA AGA-3'. The amplified PCR products were fractionated on 1% agarose gel and purified by QIAquick gel extraction kit (Qiagen), cloned with the pGEM-T easy vector system (Promega), and sequenced using T7 and SP6 primers. The obtained sequences have been deposited in GenBank with the accession numbers shown in Table 1.

2.3. *Polytomella* ATP synthase purification

Polytomella sp. mitochondria were solubilized in the presence of *n*-dodecyl- β -maltoside (lauryl maltoside or LM) and the ATP synthase was purified following the described procedure [7]. For EM studies, the buffer in the glycerol gradient centrifugation step was modified. The enzyme obtained from the DEAE-Biogel A column was loaded on discontinuous 15–50% glycerol gradients in 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 mM ATP and 0.2% digitonin, and centrifuged at 54,000 \times g for 17 h at 4 °C. Fractions containing dimeric ATP synthase were identified by BN-PAGE and prepared for EM analysis as described below.

2.4. Protein analysis

After treating with detergents, the algal ATP synthase was subjected to BN-PAGE as described by Schägger [19]. When indicated, BN-PAGE was followed by 2D tricine-SDS-PAGE [20]. Protein concentrations were estimated according to Markwell et al. [21]. Denaturing gel electrophoresis was carried either in a glycine-SDS-PAGE system [22] or in a tricine-SDS-PAGE system [20], as indicated.

Cross-linking experiments were carried out with the water-insoluble, hetero-bifunctional, thiol-cleavable reagent *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyl)dithio)-propionate (SPDP; Pierce) and its water-soluble analog sulfo-succinimidyl 6-[3'-(2-pyridyl)dithio)-propionamido] hexanoate (sulfo-LC-SPDP; Pierce). The enzyme (3.5 mg protein/mL) was

incubated 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 LM, in the presence of 1 mM SPDP or 2 mM sulfo-LC-SPDP, for 7 hours at 4 °C. Reactions were stopped by the addition of 25 mM Tris (pH 8.0) (final concentration). The corresponding samples (120 μ g of protein) were subjected to SDS-tricine-PAGE [7% (wt./vol.) acrylamide] in nonreducing conditions. The lanes of interest were cut and incubated for 1 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% (wt./vol.) acrylamide]. Cross-linking experiments with the water-soluble, homo-bifunctional, thiol-cleavable reagent 3,3'-dithio-bis-(sulfo-succinimidyl-propionate) (DTSSP) and with the water-insoluble, homo-bifunctional, thiol-cleavable reagent dithio-bis-(succinimidyl)-propionate (DSP) were carried out as previously described [7,9].

2.5. Labeling of cysteine residues with fluorescent probes

The cysteine residues of *Polytomella* sp. F₁F₀-ATP synthase were reacted with the fluorescent probes fluorescein-5-maleimide and 5-iodoacetamido-fluorescein (Pierce) under denaturing conditions. Two hundred micrograms of the enzyme was denatured with 1% SDS and 15 mM dithiothreitol (final concentrations) for 30 min. The denatured enzyme was incubated with 5-iodoacetamido fluorescein in a 10-fold molar excess over total estimated thiol groups (1.4 mM final concentration). The reaction was carried out at room temperature for 2 hours. In the case of the fluorescein-5-maleimide labeling, the dithiothreitol was removed dialyzing two times (using a 3500-Da molecular mass cutoff membrane) against 100 mL of a buffer containing 20 mM Tris (pH 7.4), 8 mM sodium EDTA, and 1% SDS at room temperature. Fluorescein-5-maleimide was added in 10-fold molar excess over the total estimated thiol groups (1.4 mM final concentration). The reaction was carried out for 2 hours at room temperature. The excess of reactive reagent was removed by centrifugation through the column of a syringe containing Sephadex G50-fine equilibrated with 20 mM Tris (pH 7.4), 8 mM sodium EDTA, and 1% SDS. The labeled samples were loaded onto tricine-SDS-PAGE at increasing protein concentrations. The fluorescent bands were scanned at 532 nm in a variable mode imager Typhoon 9400 (GE Healthcare), and the fluorescence intensities were quantified using a MacBiophotonics ImageJ program.

2.6. Dissociation of the enzyme into subcomplexes

The purified algal ATP synthase (120 μ g of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of additional 0.5% lauryl maltoside and then heated at 60 °C for 26 seconds. The sample was subjected to BN-PAGE in gradient gels of 4–12% acrylamide. The lanes of interest were excised and incubated in the presence of 1% SDS and 1% β -mercaptoethanol for 15 min and then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE in 14% acrylamide gels.

2.7. SAXS analysis

To obtain overall structural information of the algal F₁F₀-ATP synthase, small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis was carried out at the D11A-SAXS beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) [23]. Purified and solubilized F₁F₀ (3.0 mg/mL) was analyzed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing 0.1 mg/mL LM. As a control, a 12 mg/mL sample of human lysozyme was also measured, yielding the biophysical parameters and low-resolution models in accordance with its known molecular structure. Data were collected using a two-dimensional position-sensitive MARCCD detector, with wavelength = 1.488 Å, at 25 °C. Data acquisition was performed by taking three successive 300-second frames of each sample. The modulus of the scattering vector q was calculated according to $q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$,

Table 1Sequences of the polypeptides associated with *Polytomella* F₁F₀-ATP synthase and percent identity with its *C. reinhardtii* counterparts.

| Subunit name | Organism | GenBank accession number | Counterpart in <i>Chlamydomonas</i> (GenBank accession number) | % identity | Reference |
|--------------|------------------------|--|--|-----------------|-----------|
| ASA1 | <i>Polytomella</i> sp. | CAD90158 | XP_001692395 EDP03873 | 54 | [8] |
| β (ATP2) | <i>Polytomella</i> sp. | CAI34837 | XP_001691632 EDP04740 | 86 | [8] |
| α (ATP1) | <i>Polytomella</i> sp. | CAI34836 | XP_001699641 EDP07337 | 82 | [8] |
| ASA2 | <i>Polytomella</i> sp. | GU014474 (partial) | XP_001696742 EDP00850 | 46 ^a | This work |
| ASA3 | <i>Polytomella</i> sp. | GU121441 (partial) | XP_001700079 EDO98373 | 51 ^a | This work |
| ASA4 | <i>Polytomella</i> sp. | GQ168485 | XP_001693576 EDP08830 | 50 | This work |
| γ (ATP3) | <i>Polytomella</i> sp. | CAF03602 | XP_001700627 EDO97956 | 71 | [8] |
| a (ATP6) | <i>P. parva</i> | EC749403 (partial) | XP_001689492 EDP09230 | 46 ^a | [36] |
| OSCP (ATP5) | <i>Polytomella</i> sp. | GQ422707 | XP_001695985 EDP01322 | 62 | This work |
| ASA7 | <i>Polytomella</i> sp. | GQ427067 | XP_001696750 EDP00858 | 47 | This work |
| δ (ATP16) | <i>Polytomella</i> sp. | GU075869 ^b | XP_001698736 EDO99236 | 67 | This work |
| ASA5 | <i>P. parva</i> | BK006876 (partial) | XP_001697115 EDP00370 | 61 ^a | This work |
| ASA6 | <i>Polytomella</i> sp. | GU112182 ^c | XP_001701878 EDP06853 | 54 | This work |
| ASA8 | <i>Polytomella</i> sp. | GQ443453 | XP_001695222 EDP01930 | 79 | This work |
| ASA9 | <i>P. parva</i> | BK006898 | XM_001694550 EDP02597 | 61 | This work |
| ε (ATP15) | <i>P. parva</i> | EC748275 EC748655 | XP_001702609 EDP06388 | 59 ^a | [36] |
| c (ATP9) | <i>Polytomella</i> sp. | EC749219 (partial) ^d GU075868 ^e | XP_001701531 EDO97408 XP_001701500 EDO97377 | 62 | This work |

^a Identity was estimated comparing the partial sequence of *Polytomella* with the corresponding region of its *Chlamydomonas* counterpart.^b An identical sequence could be constructed for *P. parva* from EST data (GenBank accession number BK006875).^c An identical sequence could be constructed for *P. parva* from EST data (GenBank accession number BK006877).^d The partial sequence of ε subunit may be constructed from the indicated EST data.^e An identical sequence could be constructed for *P. parva* from EST data (GenBank accession numbers EC750491, EC750268, EC750247, and EC750141).

where λ is the wavelength used and 2θ is the scattering angle. The sample-to-detector distance was set at 1602.6 mm, allowing detection of a q range from 0.009 to 0.1979 \AA^{-1} . Monodispersity of the samples was confirmed by Guinier plots of the data, which were linear at small angles [24], and molecular weight calculations by using hen egg lysozyme as standard (not shown) and with the calculation tool, SAXS MoW [25]. Data were corrected properly and fitted using GNOM [26], yielding the pair distance distribution function $[p(r)]$, the radius of gyration (R_g), and maximum distance (D_{max}) of the enzyme. Particle low-resolution models were restored using DAMMIN, which allows *ab initio* shape determination by simulated annealing using a single-phase dummy atom model [27]. Several runs of *ab initio* shape determination led to consistent results and the obtained final particle shape is an average of 10 independent models, performed with DAMAVER [28].

2.8. Electron microscopy studies

The algal dimeric ATP synthase obtained from the digitonin containing glycerol gradient was diluted to a final protein concentration between 20 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 1 mM EDTA, and 0.02% digitonin. Samples of 5 μL were applied to glow-discharged carbon-coated copper grids for negative staining. Grids were washed once with water and stained with 1% uranyl acetate for 1 min and dried. Grids were examined in a JEOL JEM2100 transmission electron microscope (JEOL USA) operating at 200 kV. Images were

recorded on a 4096×4096 slow-scan charge-coupled device (F415-MP; TVIPS GmbH) in single-frame montage mode. Images of the stained samples were recorded with an underfocus of 1.5 μm and an electron magnification of $\times 40,000$, setting the 1st zero of the contrast transfer function at $1/20 \text{ \AA}^{-1}$. Single particles were selected with the Boxer program (EMAN package) [29] and subsequently analyzed with the IMAGIC-5 package [30] as previously described [31]. Images were band-pass-filtered to eliminate unwanted spatial frequencies ($<0.008 \text{ \AA}^{-1}$ and $>0.133 \text{ \AA}^{-1}$) and normalized. Data sets were classified, and initial references for multireference alignment were generated by alignment by classification [32]. Multireference alignment was iterated until no further improvement was observed.

2.9. Three-dimensional reconstruction

For starting up the three-dimensional reconstruction from EM images, two molecules of yeast F₁C₁₀ crystal structure (1qo1.pdb) [33] were arranged as a dimer so that projections of the model matched the projections of the enzyme obtained from the multi reference alignment analysis. Model building was done in Chimera [34]. In the structural model, mitochondrial F₁ was replaced by threefold symmetric $\alpha_3\beta_3$ from *Bacillus* PS3 (1sky.pdb) [35]. Projections of the model then served as references to align a data set of 9300 images. Subsequent refinement was performed by alignment of the raw images with an increasing number of projections of the 3D reconstruction from the preceding

round of multireference alignment. Three-dimensional reconstruction was performed assuming two-fold symmetry of the ATP synthase dimer complex. After seven rounds of refinement the resulting 3D model of the *Polytomella* ATP synthase was filtered to a resolution of 20 Å and displayed in Chimera. Details of the image analysis and three-dimensional reconstruction will be published elsewhere.

2.10. Sequence analysis in silico

Expressed sequence tags from *Polytomella parva* (TBestDB) [36] were obtained from ENTREZ at the NCBI server (www.ncbi.nlm.nih.gov) and used to reconstruct the sequences of subunits δ , ϵ , a , c , ASA5, ASA6, and ASA9 of the alga. Prediction of transmembrane helices and of 3D structure was carried out with the homologous *C. reinhardtii* sequences. Transmembrane stretches were predicted by the TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Full-chain protein structure prediction was carried out in the Robetta server (<http://rosetta.bakerlab.org/>).

3. Results

3.1. Resolution of all protein components of the mitochondrial ATP synthase from the colorless chlorophycean alga *Polytomella* sp.

A highly homogeneous preparation of *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase containing 17 different polypeptides with varying stoichiometries was obtained through the previously detailed three-step purification procedure that involves mitochondria solubilization, ion exchange chromatography, and glycerol gradient centrifugation [7]. Previous reports suggested the presence of a proteolyzed ASA3 subunit in the isolated enzyme [7]. Some preparations of the enzyme, kept always at 4 °C and isolated in the presence of protease inhibitors, exhibited an ASA3 subunit with the N-terminus sequence SAPG-SHEHHETPLKMA, indicative of an intact polypeptide.

The subunit composition of the *Polytomella* mitochondrial ATP synthase has been previously reported. To search for possible new subunits that may have escaped detection due to the comigration of two or more bands, a combined gel electrophoresis system was utilized. The electrophoretic conditions involved first dimension in a glycine-SDS-PAGE system [22] followed by 2D tricine-SDS-PAGE system [19]. The

2D gels thus obtained are shown in Fig. 1. This technique allowed almost complete resolution of all polypeptide components. Notably, subunit a and subunit OSCP, which migrate together when using only a tricine-SDS-PAGE system, were completely resolved in this combined 2D system.

3.2. Cloning and sequencing of cDNAs encoding subunits of the ATP synthase of *Polytomella* sp.

Here, we report eight (complete) and three (partial) primary sequences of the subunits that constitute the ATP synthases of *Polytomella* sp. and *P. parva* (Table 1). The corresponding genes were cloned and sequenced from a *Polytomella* sp. cDNA library, while other sequences were reconstructed from EST data of *P. parva*. Both the *C. reinhardtii* and the *Polytomella* enzymes have the same polypeptide composition, and the corresponding subunits exhibit sequence identities that range from 46% to 86%.

3.3. Close-neighbour relationships of the subunits of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp.

To assess close vicinities between polypeptide components, we carried out cross-linking experiments with several bifunctional reagents. Examples of cross-linking patterns obtained with the purified algal ATP synthase have been shown before [7,9]. Novel cross-link products were obtained using additional bifunctional reagents (data not shown but included in Fig. S1 only for review purposes). Table 2 summarizes the different cross-link products that have been unambiguously and reproducibly identified in several experiments. The inferred close vicinities between polypeptides were used to reassess the overall topology of the algal ATP synthase (see below).

3.4. Generation of subcomplexes of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. by detergent treatment

A second approach to assess subunit-subunit interactions is partial dissociation of the complex to generate subcomplexes, which are assumed to keep the original subunit-subunit interactions they had in the intact complex. A carefully controlled dissociation procedure was

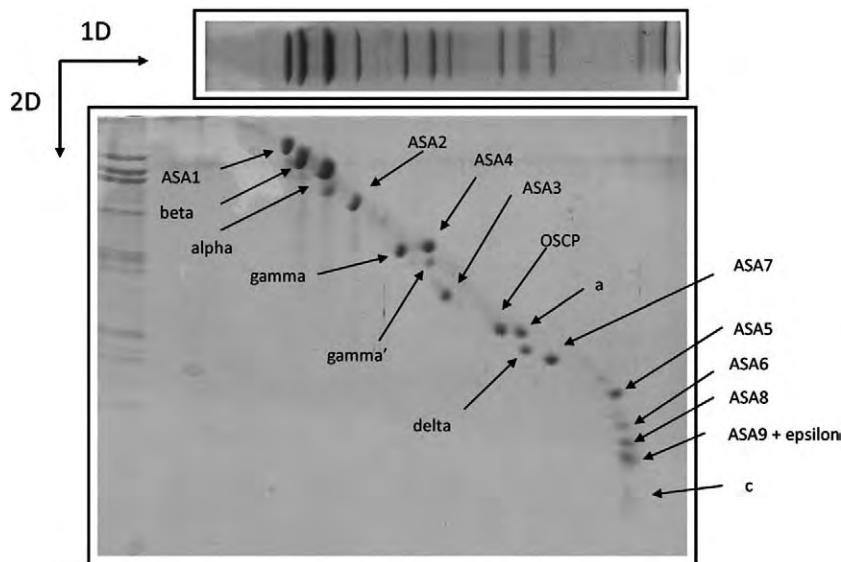


Fig. 1. 2D resolution of the polypeptides that constitute the mitochondrial *Polytomella* F_1F_0 -ATP synthase. *Polytomella* ATP synthase (100 μ g of protein) were resolved in a glycine-SDS-PAGE system (10% acrylamide). The 1D gel was then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained with Coomassie brilliant blue. The identified subunits are indicated by the corresponding arrows and labels.

Table 2

Close vicinities between subunits of the algal ATP synthase inferred from cross-linking experiments.

| Homobifunctional | | Heterobifunctional | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Water-insoluble | Water-soluble | Water-insoluble | Water-soluble |
| DSP | DTSSP | SPDP | Sulfo-LC-SPDP |
| $\alpha + \beta$ | $\alpha + \beta$ | $\alpha + \beta$ | $\alpha + \beta$ |
| $\alpha + \text{OSCP}$ | $\alpha + \text{OSCP}$ | $\alpha + \text{OSCP}$ | $\alpha + \text{OSCP}$ |
| ---- | ---- | $\gamma + \delta$ | $\gamma + \delta$ |
| ASA1 + ASA4 | ---- | ---- | ---- |
| ASA1 + ASA7 | ---- | ---- | ---- |
| ---- | ---- | ---- | ASA2 + ASA4 + ASA7 |
| ASA2 + ASA4 | ASA2 + ASA4 | ASA2 + ASA4 | ASA2 + ASA4 |
| ASA2 + ASA7 | ASA2 + ASA7 | ASA2 + ASA7 | ASA2 + ASA7 |
| ASA3 + ASA8 | ---- | ---- | ---- |
| ASA6 + ASA6 | ---- | ---- | ---- |

carried out with the enzyme as described in Section 2. At short times of incubation at high temperature in the presence of LM, the ATP synthase complex partially dissociates. Both the dimeric and monomeric forms of the enzyme can also be observed in the 2D electrophoretic pattern (Fig. 2). The monomeric form (V) shows a diminished presence of subunits ASA6 and ASA9 as suggested previously [8]. ASA6 and ASA9 may be implicated in the dimerization of the enzyme. Also, a 62-kDa subcomplex formed by ASA2–OSCP was observed. Thus, a novel subunit–subunit interaction, not previously detected by the cross-linking experiments, was identified (Fig. 2).

3.5. Estimation of the stoichiometry of several subunits of the algal ATP synthase as judged by reactivity with cysteine-labelling reagents

The stoichiometry of the conserved subunits that constitute the algal ATP synthase is believed to be similar to the one of orthodox enzymes. Thus a $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\delta_1/\epsilon_1/a_1/\text{OSCP}_1$ stoichiometry is expected

for the motor and catalytic regions of the monomeric enzyme. In contrast, the stoichiometry of the ASA subunits that constitute the peripheral stalk is not known. Here, we explored the stoichiometry of subunits with cysteine-labelling fluorescent probes. The estimated stoichiometry is limited to those subunits that contain at least one cysteine residue. The labelling experiments suggest an $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\delta_1/\text{OSCP}_1/\text{ASA3}_1/\text{ASA4}_1/\text{ASA5}_1$ stoichiometry per monomeric F_1F_0 -ATP synthase (Fig. 3 and Table 3).

3.6. Estimation of the overall dimensions of the ATP synthase of *Polytomella* sp. as judged by SAXS

Small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis allowed us to obtain the initial parameters for the construction of a low-resolution model of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella*. This technique provides direct information on the size, shape and oligomeric structure of biomolecules in solution. The adjusted scattering profile with the program GNOM [26] is shown in Fig. 4A, together with the experimental data. From the Fourier transformation of the scattering data $[I(q)]$, we have calculated the pair distance distribution function $p(r)$ (Fig. 4B), which gives us direct information about the shape and size of the algal F_1F_0 -ATP synthase. The calculated $p(r)$ shows a maximum intramolecular distance (D_{max}) of 400 Å and the obtained radius of gyration (R_g) is $141.5 \text{ Å} \pm 0.243 \text{ Å}$ (Fig. 4B). The calculated $p(r)$ is characteristic of an elongated structure (Fig. 4B); however, the obtained Kratky plot indicates that the protein maintains a globular fold, with a maximum $\sim q = 0.013 \text{ Å}^{-1}$ (Fig. 4C), as Kratky plots of unfolded proteins present no intensity maximum [37,38]. The presence of a loosely associated dimer would account for such event, yielding an elongated structure but with defined globular regions. The estimated molecular mass of the complex is of 1696 kDa. Guinier analysis of the data was performed (Fig. 4D), and linear least squares fittings were done at the small scattering vector region ($q < 1.3 \times R_g^{-1}$), where R_g is the radius of gyration. The Guinier plot analysis gave an R_g value of 133.4 Å (slope of the fitting = $3 \times R_g^{-2}$),

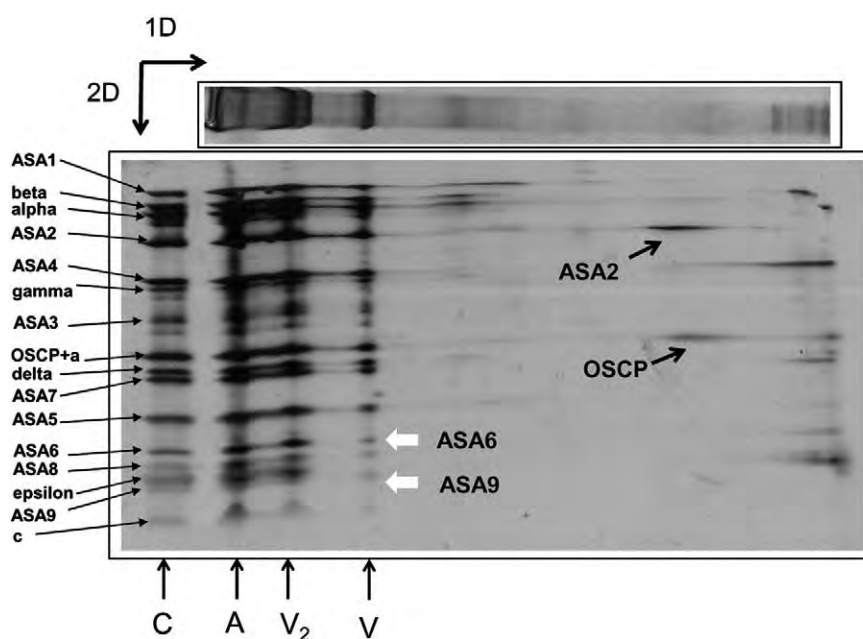


Fig. 2. Subcomplexes of the algal ATP synthase generated by detergent treatment and controlled heat dissociation. The purified algal ATP synthase (120 μg of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of additional 0.5% LM and then heated at 60 °C for 26 sec. The mixture was then resolved by BN-PAGE in a 1D gradient gel of 4–12% acrylamide. The 1D gel was then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained with silver. Fifty micrograms of purified algal ATP synthase was added as a control (lane C); the different polypeptides of the complex are indicated. Some aggregated material (A) was present at the start of the 1D gel. The polypeptides corresponding to the dimeric enzyme (V2) and to the monomeric enzyme (V) are indicated; the monomer exhibits diminished ASA6 and ASA9 subunits (white arrows). The resolved subunits ASA2 and OSCP resulting from the ASA2–OSCP subcomplex are indicated.

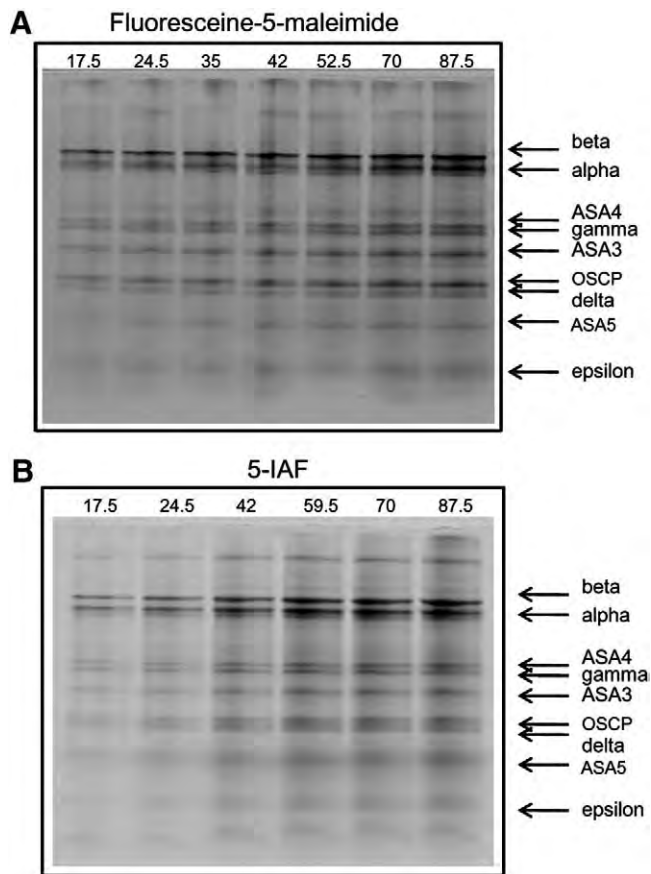


Fig. 3. Labelling of cysteine residues of the algal ATP synthase with fluorescent probes. In both panels, the labeled ATP synthase was resolved by tricine-SDS-PAGE and the images were obtained after scanning the electrophoretic pattern of the fluorescently-labeled enzymes. The amounts of labeled protein loaded on the original gel (in μg of protein) are indicated. The labeled subunits are indicated by arrows. Quantification of the fluorescence emitted by each polypeptide was used to calculate subunit stoichiometries (see Table 3). A) Labelling of the algal ATP synthase with fluorescein-5-maleimide. B) Labelling of the algal ATP synthase with 5-iodoacetamido-fluorescein.

which is similar to the value obtained with the GNOM program [26]; moreover, we could observe that the sample was monodisperse at the measured conditions.

To obtain further information about the three-dimensional fold of the enzyme, low-resolution *ab initio* models using the DAMMIN program were reconstructed [27,39]. A group of 10 models was generated and averaged with the program DAMAVER [28]. The obtained volumetric model represents the shape of the molecule, indicating that the *Polytomella* ATP synthase is organized as a dimer in solution (Fig. 5), in accordance with previous reports suggesting the dimeric nature of the enzyme [4,6,7].

Table 3

Subunit stoichiometry of subunits of the algal ATP synthase inferred from cysteine (Cys) labeling with fluorescent probes.

| Subunit name and (number of Cys) | 5-IAF | | | Fluorescein-5-maleimide | | |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Fluorescence (AU) | Estimated Cys content | Subunit stoichiometry | Fluorescence (AU) | Estimated Cys content | Subunit stoichiometry |
| alpha (4) | 0.147 | 10.75 | 2.68 | 0.147 | 10.62 | 2.65 |
| beta (2) | 0.082 | 6.00 | 3.00 | 0.083 | 6.00 | 3.00 |
| ASA4 (2) | 0.032 | 2.30 | 1.15 | 0.033 | 2.38 | 1.19 |
| gamma (2) | 0.032 | 2.30 | 1.15 | 0.030 | 2.16 | 1.08 |
| ASA3 (3) | 0.04 | 2.90 | 0.96 | 0.048 | 3.46 | 1.15 |
| OSCP (1) | 0.047 | 3.40 | 1.13 | 0.044 | 3.10 | 1.03 |
| delta (1) | 0.019 | 1.39 | 1.39 | 0.018 | 1.30 | 1.30 |
| ASA5 (1) | 0.014 | 1.02 | 1.02 | 0.012 | 0.86 | 0.86 |

3.7. EM analysis leading towards a low-resolution 3D model of the ATP synthase of *Polytomella* sp.

The algal ATP synthase obtained from a glycerol gradient in the presence of 0.02% digitonin proved to be suitable for EM studies. Representative averages of the enzyme, side and top views, are shown in Figs. 6A and B. Reconstruction of 59 averages obtained from a data set of 9300 molecular images gave rise to the EM-derived 3D model of the *Polytomella* ATP synthase (Figs. 6C, side view, and D, top view). The first round of multireference alignment was based on a 3D structural model of dimeric ATP synthase generated from two molecules of the yeast mitochondrial F_1C_{10} complex. Subsequent refinements were performed independently of the crystallographic model structure. The association of the two ATP synthase monomers occurs at the level of the F_0 sector, while the F_1 domains are quite distant. An angle of 50° is formed between the long axes of the two putative monomers. The two F_1 sectors are connected by two robust, peripheral arms that seem to rise from the membrane-embedded section of one monomer towards the upper part (α and β subunits) of the F_1 sector of the second monomer. These peripheral stalks are clearly distinguishable from the central stalk (subunits γ , δ , and ϵ) that connects the F_1 and F_0 sectors of the ATP synthase complex. Figs. 6E and F show fitting of one pair of the crystal structure of the yeast F_1C_{10} used for the initial alignment into the electron density of the final three-dimensional reconstruction of *Polytomella* dimeric ATP synthase.

4. Discussion

4.1. Composition of *Polytomella* sp. ATP synthase

The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae has an atypical subunit composition and a unique overall architecture [6,7]. The presence of atypical subunits was originally proposed based on N-terminal sequences of the polypeptide components of *C. reinhardtii* mitochondrial ATP synthase [40] and mining of the green alga genome [10]. Thus, nine novel subunits, ASA1 to ASA9, were identified and demonstrated to be subunits of the algal mitochondrial ATP synthase [7,8]. The subsequent biochemical characterization of the enzyme was carried out using the chlorophycean alga *Polytomella* sp. This colorless alga, closely related to *Chlamydomonas*, lacks both chloroplasts and cell wall, therefore allowing easy isolation of mitochondria and the subsequent purification of oxidative phosphorylation components [41–43]. To date, genes encoding homologs of these proteins have also been found in the genome of the alga *Volvox carteri* (Doe Joint Genome Institute). The presence of ASA subunits in the mitochondrial ATP synthase seems to be exclusive of the algal lineage of chlorophycean alga closely related to *Chlamydomonas* [44].

Previous work has shown partial resolution of the polypeptides of *Polytomella* ATP synthase by SDS-PAGE [7]. Nevertheless, some subunits migrate together, namely subunits a and OSCP, and subunits

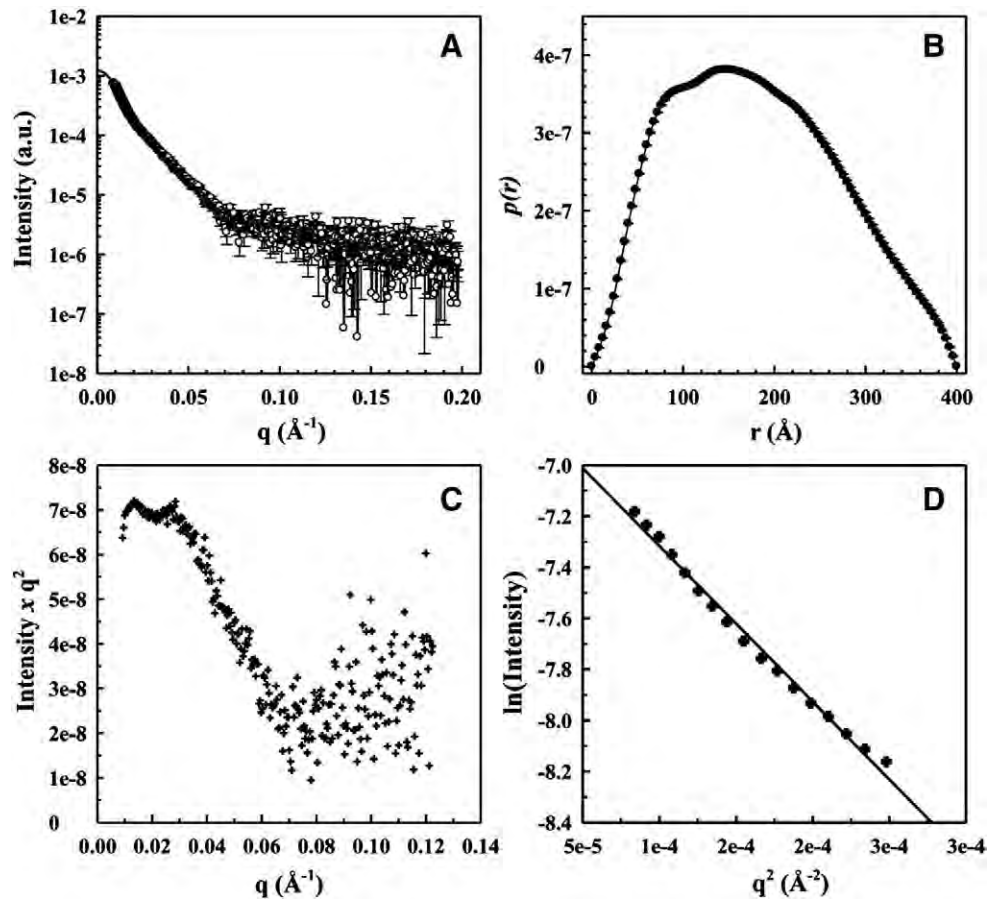


Fig. 4. SAXS data of *Polytomella* F₁F₀ ATP synthase. A) Experimental results of intensity as a function of the modulus of scattering vector q [$I(q)$] with their corresponding errors are shown (white dots); experimental data were fitted using the GNOM program (fit, solid line). B) Pair distance distribution $p(r)$ of the enzyme calculated using the program GNOM. C) Kratky plot for the scattering of ATP synthase. D) Linear fit for the Guinier plot.

ϵ and ASA9. In this work, we assayed a combination of SDS-PAGE techniques that allowed the resolution of subunits a and OSCP by two-dimensional electrophoresis. The complete resolution of all polypep-

tides (except ϵ and ASA9 that still comigrate) will allow further characterization of the interaction between these subunits. The resolution of the constituents of the algal mitochondrial ATP synthase

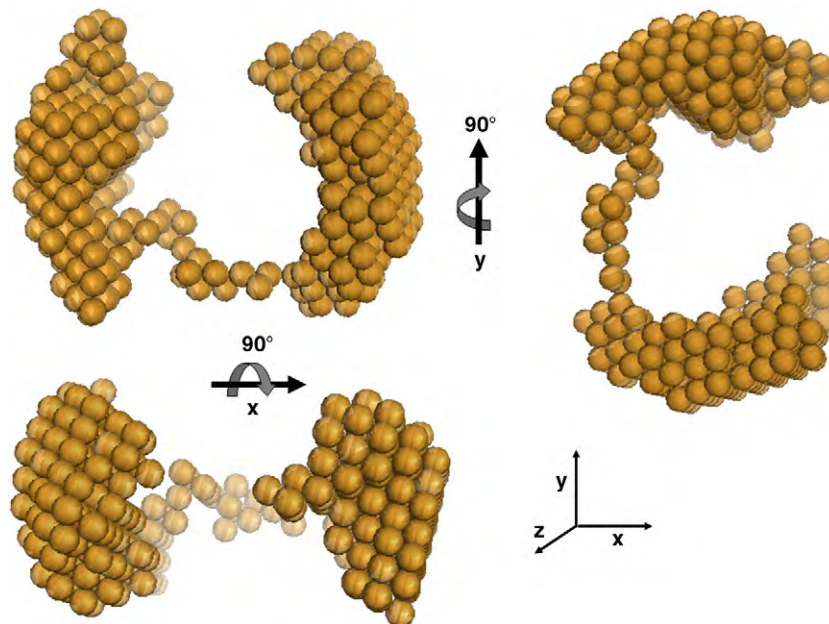


Fig. 5. Three-dimensional model of *Polytomella* ATP synthase inferred from SAXS data. The model strongly suggests that the algal ATP synthase is structured as a dimer in solution. *Ab initio* particle models were restored using the program DAMMIN. Several runs of *ab initio* shape determination led to consistent results and the final particle shape is an average of 10 independent models, performed with DAMAVER. The three structures shown are 90° rotations of the same model and these were generated with the software PyMOL (www.pymol.org).

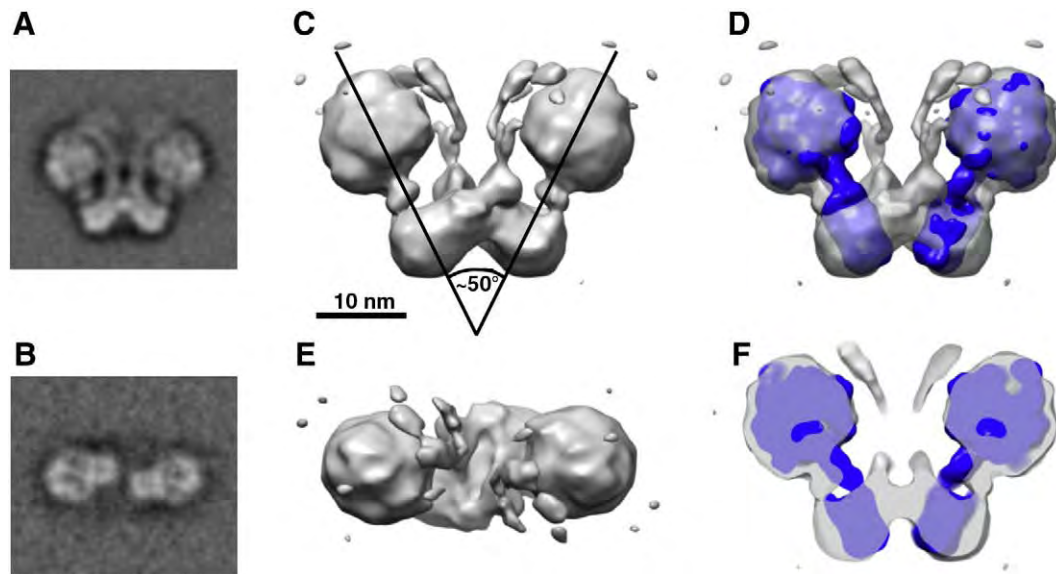


Fig. 6. Representative EM images and preliminary 3D structural of the *Polytomella* ATP synthase. A and B) Particle images of the algal ATP synthase obtained after averaging 100 to 150 single-molecule images (A, side view; B, top view). C and D) 3D structural model of the algal mitochondrial ATP synthase derived from EM studies (C, side view; D, top view). E and F) Fitting of the crystal structure model of the yeast F_1C_{10} subcomplex into the EM-derived electron density of *Polytomella* ATP synthase.

also suggests that no additional polypeptide seems to have escaped detection and that the entire subunit composition of the enzyme is most probably the one listed in Table 1.

4.2. Revisiting the topological disposition of the subunits

Cross-linking reagents have been used to assess close vicinity of polypeptides assembled into a supramolecular complex. Previous work carried out with the *Polytomella* ATP synthase has established neighboring interactions between subunits [7,9]. Here, we extended this work using additional cross-linking agents. The overall cross-link data are summarized in Table 1. Notably, several cross-link products are consistently obtained, even when using different bifunctional reagents, such is the case of $\alpha + \beta$, $\alpha + \text{OSCP}$, $\text{ASA2} + \text{ASA4}$, and $\text{ASA2} + \text{ASA7}$. In contrast, some subunits do not yield cross-linked products at all; therefore, their possible interactions with other subunits remain obscure when using this particular experimental approach. A second strategy used to identify close vicinity of polypeptides in an oligomeric complex is partial dissociation of the complex into subcomplexes, either by controlled heat dissociation or by TDOC treatment. The generated subcomplexes are assumed to conserve the same subunit–subunit interactions present in the intact complex. This is the first time that interactions between the nonconserved components of the algal enzyme (ASA subunits) and orthodox components (OSCP) has been demonstrated.

The stoichiometry of subunits of orthodox ATP synthases has been studied using different approaches [45–47]. Here, we labelled cysteine residues using fluorescent cysteine-labeling reagents. The obtained data suggest a 1:1:1:1 stoichiometry of subunits ASA3, ASA4, and ASA5 with respect to the γ subunit. It is conceivable that the rest of the ASA subunits are also in a 1:1 stoichiometry with respect to γ , as judged by Coomassie blue staining of tricine–SDS gels. Nevertheless, further experimental work using other labelling approaches is required.

The transmembrane helices (TM) of the polypeptides that constitute the algal ATP synthase were predicted *in silico*. Three subunits seem to cross the inner mitochondrial membrane: subunit *a* (with five TM), subunit *c* (two TM), and subunit ASA8 (with a single TM). In addition, three subunits exhibited hydrophobic pockets: subunits OSCP, ASA5, and ASA6. Full-chain protein structure prediction (3D modelling) yielded globular models for all ASA subunits, except for ASA4 that exhibits an elongated shape with coiled coils.

Altogether, cross-link experiments, dissociation experiments, cysteine labeling, and *in silico* predictions suggest structural features of subunits that are in accordance with the topology model of the algal ATP synthase shown in Fig. 7.

4.3. Overall structure of the complex as inferred from SAXS and EM analyses

X-ray scattering measurements have been used to determine the structure of isolated subunits of ATP synthases, in particular, of the dimeric *b* subunit of the F_1F_0 -ATP synthase of *Escherichia coli* [48] and of the H subunit of the A_1A_0 -ATP synthase of the archaea *Methanocaldococcus jannaschii* [49]. Here, a low-resolution model of the entire *Polytomella* mitochondrial ATP synthase was generated from the analysis of SAXS data. The obtained model clearly indicates the dimeric nature of the *Polytomella* ATP synthase, with a maximum intramolecular distance of 400 Å and a radius of gyration of ~ 141 Å, as calculated with the program GNOM (Fig. 4). The data strongly suggest that the algal enzyme maintains a dimeric structure in solution, with an estimated molecular mass of 1696 kDa, which supports previous data based on BNE–PAGE and theoretical calculations based on the molecular masses of the different subunits [7]. The two main structural bodies most probably reflect the F_1F_0 moieties and the peripheral stalks, which seem to be linked by a region with low X-ray scattering properties. The SAXS analysis suggests that the dimeric nature of the algal mitochondrial ATP synthase is also maintained in aqueous solution.

Electron (cryo)microscopy of single particles has been a powerful tool to determine the structure of intact ATP synthases of beef heart [50] or yeast [51] including the enzyme isolated in its dimeric form [52]. Here, a preliminary 3D model of the *Polytomella* mitochondrial ATP synthase complex was obtained by EM analysis. The model shows the basement of the robust peripheral stalks that protrude from the transmembrane domain of the complex. The peripheral stalks seem to extend from the bottom part of the first monomer towards the upper region of the second monomer. This configuration could not be inferred from previously obtained single-particle images [6]. If confirmed, this arrangement would suggest that dissociation of the dimer would disrupt the structure of the whole complex, giving rise to a structurally unstable monomer. This preliminary model is in accordance with previous biochemical data, which suggests that the stable form of the algal ATP synthase is dimeric and that disruption of

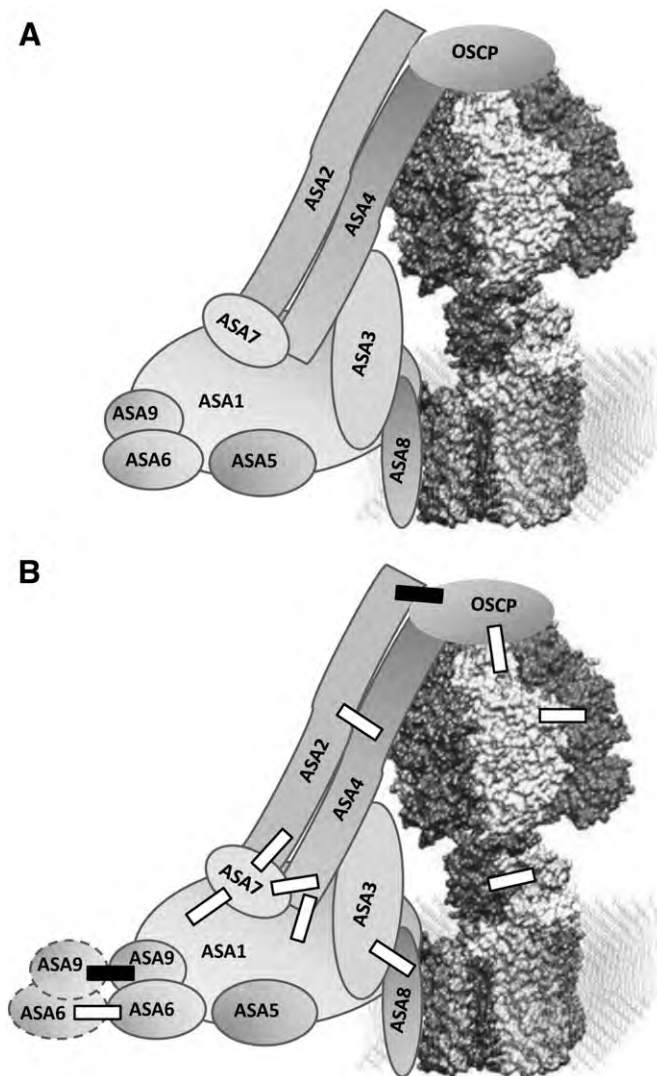


Fig. 7. Subunit arrangement of the dimeric algal mitochondrial ATP synthase. A) The model (only half the dimer is shown) is based on the overall structure of the complex found in the SAXS and EM studies and on the data obtained from the detergent dissociation assays and cross-linking experiments. For illustration purposes, the F_1F_0 moiety comprising subunits $[\alpha_3/\beta_3/\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}]$ corresponds to the yeast F_1c_{10} subcomplex crystallographic model obtained by Stock et al. [33]. B) Subunit–subunit interactions identified experimentally in this work. White rectangles indicate subunit–subunit interactions inferred from cross-linking experiments. Black rectangles indicate subunit–subunit interactions inferred from generating subcomplexes. ASA6 and ASA9 are shown interacting with the corresponding subunits of the adjacent monomer.

the enzyme into its corresponding monomers is accompanied by a structural instability and partial loss of the ATPase activity of the enzyme [9]. Single-particle EM images of the enzyme show a relatively large mass of the peripheral arm interacting with the upper region of the F_1 sector where OSCP, ASA2, and ASA4 are expected to be localized. This large mass is not evident in the 3D model obtained, and this may be due to the fact that the great majority of the algal ATP synthases are oriented on the carbon film to produce the side view projection in which the ATP synthase appears perpendicular to the long axis of the complex. In comparison, few enzymes were oriented exhibiting a top view.

The model presented here differs from the one recently and independently proposed by Dudkina et al. [53], which shows a bulkier mass of the peripheral arm in the region believed to interact with OSCP. Thus, a larger number of images representing orientations other than the side view would be desirable to further refine the model proposed here.

There are some obvious structural differences between the SAXS and the EM models, the first shows a looser dimer in comparison with the second, however, this may be due both to the resolution of each technique and to the different conditions used, i.e., “free in solution” versus “fixed on a grid.” Nevertheless, both models are consistent with the algal ATP synthase being a dimeric complex.

Acknowledgments

This research was supported by grants 56619 from CONACyT (Mexico), IN217108 from DGAPA, UNAM (Mexico), CNPq and FAPERJ (Brazil), the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposals D11A-SAXS1-5944, D11A-SAXS1-6714, and D11A-SAXS1-7672, and by grants from the Belgian F.R.S.-FNRS (2.4638.05, 2.4601.08, 1.5.255.08, 1.C057.09, and F.4735.06). P.C. is a research associate from the Belgian F.R.S.-FNRS. We thank Dr. Tomas S. Plivelic, and Dr. Rodrigo A. Martinez (Brazilian Synchrotron Light Laboratory) for assistance in the SAXS beamline setup.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbabo.2010.02.024.

References

- [1] P.L. Pedersen, Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 349–355.
- [2] M. Nakanishi-Matsui, M. Futai, Stochastic rotational catalysis of proton pumping F-ATPase, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363 (2008) 2135–2142.
- [3] W. Junge, H. Sielaff, S. Engelbrecht, Torque generation and elastic power transmission in the rotary F(O)F(1)-ATPase, *Nature* 459 (2009) 364–370.
- [4] R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernández, D. González-Halphen, Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach, *Plant Physiol.* 132 (2003) 318–330.
- [5] R. van Lis, D. González-Halphen, A. Atteia, Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp., *Biochim. Biophys. Acta* 1708 (2005) 23–34.
- [6] N.V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, H.P. Braun, Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5769–5772.
- [7] M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle, D. González-Halphen, 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. Biomembr.* 38 (2006) 232–271.
- [8] R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Atteia, New insights into the unique structure of the F_0F_1 -ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1190–1199.
- [9] A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vázquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gómez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scofano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 1–13.
- [10] P. Cardol, D. González-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R.F. Matagne, C. Remacle, The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project, *Plant Physiol.* 137 (2005) 447–459.
- [11] J.E. Walker, V.K. Dickson, The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 286–296.
- [12] J. Weber, ATP synthase—the structure of the stator stalk, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 53–56.
- [13] S. Brunner, V. Everard-Gigot, R.A. Stuart, Su e of the yeast F_1F_0 -ATP synthase forms homodimers, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48484–48489.
- [14] G. Arselin, J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M.F. Giraud, A. Dautant, D. Brèthes, J. Velours, The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40392–40399.
- [15] J.R. Gledhill, J.E. Walker, Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 989–992.
- [16] Y.H. Ko, J. Hüllihen, S. Hong, P.L. Pedersen, Mitochondrial F(O)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F_1 motor shielded by F(O), functional significance, and evidence for an involvement of the unique F(O) subunit F(6), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32931–32939.

- [17] N.V. Dudkina, S. Sunderhaus, H.P. Braun, E.J. Boekema, Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3427–3432.
- [18] A. Atteia, R. van Lis, S.I. Beale, Enzymes of the heme biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic alga *Polytomella* sp, *Eukaryot. Cell* 4 (2005) 2087–2097.
- [19] H. Schägger, Denaturing electrophoretic techniques, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 59–79.
- [20] H. Schägger, Native gel electrophoresis, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 81–104.
- [21] M.A.K. Markwell, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [22] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [23] G. Kellermann, F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, I.L. Torriani, The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 880–883.
- [24] D.I. Svergun, Mathematical methods in small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 485–492.
- [25] H. Fischer, M. de Oliveira Neto, H.B. Napolitano, I. Polikarpov, A. F. Craievich, Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale, *J. Appl. Cryst.* 43 (2010) 101–109.
- [26] D.I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.* 25 (1992) 495–503.
- [27] D.I. Svergun, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.* 76 (1999) 2879–2886.
- [28] V.V. Volkov, D.I. Svergun, Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering, *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 860–864.
- [29] S.J. Lüdtke, P.R. Baldwin, W. Chiu, EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, *J. Struct. Biol.* 128 (1999) 82–97.
- [30] M. van Heel, G. Harauz, E.V. Orlova, R. Schmidt, M. Schatz, A new generation of the IMAGIC image processing system, *J. Struct. Biol.* 116 (1996) 17–24.
- [31] Z. Zhang, Y. Zheng, H. Mazon, E. Milgrom, N. Kitagawa, E. Kish-Trier, A.J. Heck, P.M. Kane, S. Wilkens, Structure of the yeast vacuolar ATPase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35983–35995.
- [32] P. Dube, P. Tavares, R. Lurz, M. van Heel, The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry, *EMBO J.* 12 (1993) 1303–1309.
- [33] D. Stock, A.G. Leslie, J.E. Walker, Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase, *Science* 286 (1999) 1700–1705.
- [34] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 2025 (2004) 1605–1612.
- [35] Y. Shirakihara, A.G. Leslie, J.P. Abarahams, J.E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kamabara, K. Saika, Y. Kagawa, M. Yoshida, The crystal structure of the nucleotide-free $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of F_1 -ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 is a symmetric trimer, *Structure* 5 (1997) 825–836.
- [36] M.A. Mallet, R. Lee, Identification of three distinct *Polytomella* lineages based on mitochondrial DNA features, *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (2006) 79–84.
- [37] O. Glatter, Data treatment, in: O. Kratky Glatter (Ed.), *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, New York, 1982, pp. 119–166.
- [38] O. Glatter, Interpretation, in: O. Kratky Glatter (Ed.), *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, New York, 1982, pp. 167–196.
- [39] L.M.T.R. Lima, Y. Cordeiro, L.W. Tinoco, A.F. Marques, C.L. Oliveria, S. Sampath, R. Kodali, G. Choi, D. Foguel, I. Torriani, B. Caughy, J.L. Silva, Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid, *Biochemistry* 45 (2006) 9180–9187.
- [40] S. Funes, E. Davidson, M.G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M.P. King, D. González-Halphen, The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F_1F_0 -ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6051–6058.
- [41] E.B. Gutiérrez-Cirlos, A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, R. Coria, D. González-Halphen, A highly active ubiquinol-cytochrome *c* reductase (bc1 complex) from the colorless alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas*. Characterization of the heme binding site of cytochrome c_1 , *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9147–9154.
- [42] A. Atteia, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the F_0F_1 -ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 275–284.
- [43] X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome *c* oxidase is encoded in the nucleus of chlamydomonad algae, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30144–30152.
- [44] M. Lapaille, A. Escobar-Ramírez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodríguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. González-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F_1F_0 ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme, *Molecular Biology and Evolution* (in press), doi:10.1093/molbev/msq049.
- [45] J.E. Walker, I.M. Fearnley, N.J. Gay, B.W. Gibson, F.D. Northrop, S.J. Powell, M.J. Runswick, M. Saraste, V.L. Tybulewicz, Primary structure and subunit stoichiometry of F_1 -ATPase from bovine mitochondria, *J. Mol. Biol.* 184 (1985) 677–701.
- [46] C. Hekman, J.M. Tomich, Y. Hatefi, Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the F_0 subunits, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13564–13571.
- [47] M. Bateson, R.J. Devenish, P. Nagley, M. Prescott, Single copies of subunits *d*, oligomycin-sensitivity conferring protein, and *b* are present in the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7462–7466.
- [48] P.A. Del Rizzo, Y. Bi, S.D. Dunn, B.H. Shilton, The “second stalk” of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain, *Biochemistry* 41 (2002) 6875–6884.
- [49] G. Biuković, M. Rössle, S. Gayen, Y. Mu, G. Grüber, Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of the peripheral stalk subunit H of the A_1A_0 ATP synthase from *Methanocaldococcus jannaschii* and its binding to the catalytic A subunit, *Biochemistry* 46 (2007) 2070–2078.
- [50] J.L. Rubinstein, J.E. Walker, R. Henderson, Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy, *EMBO J.* 22 (2002) 6182–6192.
- [51] W.C. Lau, L.A. Baker, J.L. Rubinstein, Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase, *J. Mol. Biol.* 382 (2008) 1256–1264.
- [52] F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens, J.J. García, Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F_0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 12356–12358.
- [53] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohan, H.P. Braun, E.J. Boekema, Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by 2 cryo-electron tomography, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 272–277.

The *Chlamydomonas* Sourcebook

SECOND EDITION

Volume 2: Organellar and
Metabolic Processes

Edited by

[David B. Stern, Ph.D.](#)

Boyce Thompson Institute
Ithaca, New York, USA

Editor in Chief

[Elizabeth H. Harris, Ph.D.](#)

Department of Biology
Duke University
Durham, North Carolina, USA



ELSEVIER

AMSTERDAM • BOSTON • HEIDELBERG • LONDON • NEW YORK
OXFORD • PARIS • SAN DIEGO • SAN FRANCISCO • SYDNEY • TOKYO

Academic Press is an imprint of Elsevier



Cover image: Backdrop is an **anti-Fus1**, **anti-tubulin** labeled *Chlamydomonas* gamete, courtesy of Mike Misamore. Overlaid images are clockwise from left, an illustration of the photorespiratory carbon oxidation cycle (see Chapter 8); regulatory circuits of the CES mechanism (see Chapter 29), and major carotenoids of vegetative cells (see Chapter 21). Figures are modified from those provided by Martin Spalding, Yves Choquet, and Martin Lohr, respectively.

Academic Press is an imprint of Elsevier

The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 8GB
30 Corporate Drive, Suite 400, Burlington, MA 01803, USA
525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, USA

First edition 1989

Second edition 2009

Copyright 2009 © Elsevier Inc. All rights reserved

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise without the prior written permission of the publisher.

Permissions may be sought directly from Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, UK: phone (+44) (0) 1865 843830; fax (+44) (0) 1865 853333; email: permissions@elsevier.com. Alternatively you can submit your request online by visiting the Elsevier web site at <http://elsevier.com/locate/permissions>, and selecting *Obtaining permission to use Elsevier material*.

Notice

No responsibility is assumed by the publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of rapid advances in the medical sciences, in particular, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.

Set ISBN: 978-0-12-370873-1

Volume 1: ISBN: 978-0-12-370874-8

Volume 2: ISBN: 978-0-12-370875-5

Volume 3: ISBN: 978-0-12-370876-2

For information on all Academic Press publications
visit our website at www.elsevierdirect.com

Typeset by Charon Tec Ltd., A Macmillan Company. (www.macmillansolutions.com)

Printed and bound in Canada

09 10 11 12 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Working together to grow
libraries in developing countries
www.elsevier.com | www.bookaid.org | www.sabre.org
ELSEVIER | BOOK AID International | Sabre Foundation

Oxidative Phosphorylation: Building Blocks and Related Components

Pierre Cardol,^{1,2} Francisco Figueroa,³ Claire Remacle,¹ Lars-Gunnar Franzén⁴ and Diego González-Halphen³

¹Genetics of Microorganisms, ²Plant Biochemistry and Photobiology, Institute of Plant Biology B22, University of Liège, Belgium,

³Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México,

⁴School of Business and Engineering, Naturrum, University of Halmstad, Sweden

CHAPTER CONTENTS

| | |
|--|-----|
| I. Introduction | 470 |
| II. Complexes of the mitochondrial respiratory chain | 471 |
| A. Complex I, NADH:ubiquinone oxidoreductase | 471 |
| B. Complex II, succinate:ubiquinone oxidoreductase | 475 |
| C. Complex III, ubiquinol:cytochrome <i>c</i> oxidoreductase | 476 |
| D. Cytochrome <i>c</i> | 478 |
| E. Complex IV, cytochrome <i>c</i> oxidase | 479 |
| F. Complex V, ATP synthase | 481 |
| G. Other components related to OXPHOS | 484 |
| III. Import of nucleus-encoded OXPHOS proteins | 487 |
| IV. Conclusions and perspectives | 490 |
| Acknowledgments | 491 |
| References | 491 |

I. INTRODUCTION

Oxidative phosphorylation (OXPHOS) is defined as an electron transfer chain driven by substrate oxidation that is coupled to the synthesis of ATP through an electrochemical transmembrane gradient (Figure 13.1). Historically, bovine heart mitochondria have been the system of choice for the structural characterization of eukaryotic OXPHOS complexes (Saraste, 1999), because they can be purified in relatively large quantities. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is amenable to a large variety of molecular genetic tools (Bonnefoy and Fox, 2002), has become the model organism to study the biogenesis of mitochondrial complexes (Barrientos et al., 2002; Herrmann and Neupert, 2003) and the effect of mutations on OXPHOS components (Fisher et al., 2004). By contrast, mitochondria of photosynthetic organisms have been poorly characterized from a biochemical point of view, mainly due to the difficulties in obtaining preparations free of chloroplast contaminants. Nevertheless, the characterization of *Arabidopsis* mitochondrial components through proteomic approaches has advanced significantly (Millar et al., 2005).

Chlamydomonas is an attractive model for studying mitochondria in unicellular photosynthetic organisms, because it allows combining classical biochemical approaches with genetics, and because photosynthesis-deficient mutants may be grown heterotrophically, and respiratory-deficient mutants as obligate photoautotrophs. Prior work with *Chlamydomonas* mitochondria involved the sequencing of its 15.8 kb linear genome (Gray and Boer, 1988; Michaelis et al., 1990; see Chapter 12), the biochemical characterization of enriched fractions of several OXPHOS complexes (Atteia, 1994), and the sequencing of several nuclear genes encoding polypeptides that participate in OXPHOS (Amati et al., 1988; Franzén and Falk, 1992; Atteia and Franzén, 1996; Nurani and Franzén, 1996; Pérez-Martínez et al., 2000, 2001; Dinant et al., 2001; Funes et al., 2002a; Atteia et al., 2003). In parallel, several *Chlamydomonas* mutants affected in mitochondrial components were characterized (Matagne et al., 1989; Dorthu et al., 1992; Colin et al., 1995; Duby and Matagne, 1999; Remacle et al., 2001, 2004; Cardol et al., 2002, 2006, 2008; Remacle et al., 2004; see Chapter 12), and procedures to obtain purified mitochondria were developed (Eriksson et al., 1995; Nurani and Franzén, 1996). In particular, wall-deficient mutants allowed the isolation of mitochondrial preparations free of thylakoid components. Thereafter, the major mitochondrial complexes of *Chlamydomonas* were resolved with Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) (van Lis et al., 2003; Cardol et al., 2004), allowing N-terminal sequencing or tandem mass spectrometry analysis of individual subunits.

Genome sequencing has allowed the prediction of the *Chlamydomonas* OXPHOS proteome (Cardol et al., 2005), whose major components are shown schematically in Figure 13.1. This chapter summarizes knowledge of the OXPHOS constituents of *Chlamydomonas* and of the components

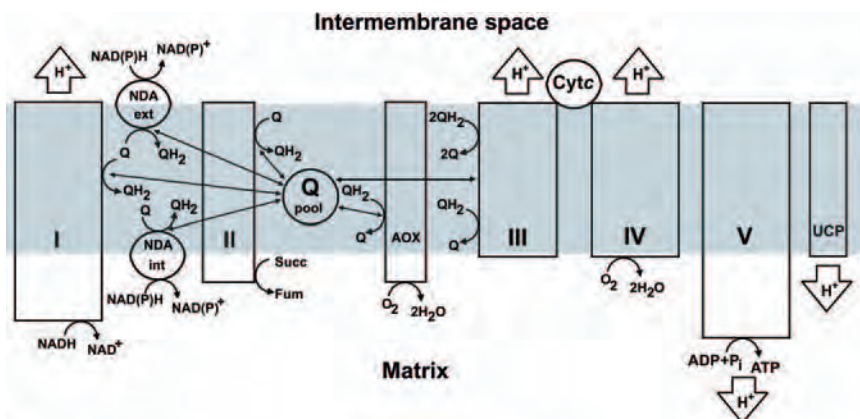


FIGURE 13.1 The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system in the inner membrane of plant mitochondria. Electrons are transferred from NADH and NAD(P)H to coenzyme Q (Q) via type-I NADH:ubiquinone oxidoreductase or complex I (I) and type-II alternative NADH dehydrogenases (NDA; located on the internal (int) or external (ext) faces of the inner membrane). Some electrons from organic acid oxidation are also transferred to Q via the succinate dehydrogenase or complex II (II). Electrons are thereafter transferred from reduced coenzyme Q (QH₂) to cytochrome c (cyt c) via the ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase or complex III (III) and then to oxygen via the cytochrome c oxidase or complex IV (IV). An alternative oxidase (AOX) can bypass complexes III and IV by transferring electrons directly from QH₂ to oxygen. The oxidoreduction reactions mediated by complexes I, III, and IV are coupled with protons (H⁺) transfer from the matrix to the intermembrane space. The energy associated with the proton gradient is used for the production of ATP by complex V (ATP synthase) or dissipated by uncoupling proteins (UCP).

involved in their biogenesis. We also address alternate dehydrogenases and oxidases which are particular to photosynthetic organisms, and several other mitochondrial components related to OXPHOS. When appropriate, we make reference to the components of *Polytomella* sp., a colorless alga closely related to *Chlamydomonas* (Pröschold et al., 2001; see also Volume 1, Chapter 1).

II. COMPLEXES OF THE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN

A. Complex I, NADH:ubiquinone oxidoreductase

Complex I (rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase; EC 1.6.5.3) is the largest membrane-bound multisubunit complex of the mitochondrial respiratory chain. With an apparent molecular mass between 950 kD and 1000 kD, the *Chlamydomonas* enzyme comprises 42 proteins of molecular masses ranging from 7 kD to 77 kD (van Lis et al., 2003; Cardol et al., 2004). Complex I from several organisms has been characterized, including beef heart (45 subunits; Carroll et al., 2006), *Arabidopsis* and rice (42 subunits; Heazlewood et al., 2003; Meyer et al., 2008), and the fungi *Neurospora crassa* (39 subunits; Videira and Duarte, 2002; Marques et al.,

2005) and *Yarrowia lipolytica* (37 subunits; Abdrakhmanova et al., 2004). Five to nine Complex I subunits (the ND subunits) are usually encoded in the mitochondrial genome, whereas the remaining subunits are nuclear gene products. Because of its complexity, information on Complex I structure and mechanism of action is limited. A simpler enzyme is found in bacteria with only 14 subunits, all of which have counterparts in eukaryotic Complex I (Dupuis et al., 1998; Friedrich et al., 1998). Low resolution structures based on electron microscopy have revealed that mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase shares an L-shape with its bacterial counterpart, with one arm embedded in the mitochondrial inner membrane and another arm protruding into the matrix (see e.g. Guenebaut et al., 1998; Sazanov et al., 2003; Radermacher et al., 2006). In bacteria, the membrane arm is constituted by the homologues of the hydrophobic ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, and 6 subunits, usually encoded in the mitochondrial genomes of eukaryotes. It also contains proton translocation machinery with at least one ubiquinone binding site sensitive to rotenone. The matrix arm components contribute to the NADH dehydrogenase segment of the electron pathway by binding a flavin mononucleotide (FMN) and nine iron-sulfur clusters (Hinchliffe and Sazanov, 2005).

Including the 14 highly conserved subunits homologous to the prokaryotic type-I NADH dehydrogenase enzyme, all eukaryotic enzymes contain at least 33 subunits in common (Cardol et al., 2005). *Chlamydomonas* Complex I thus contains nine components that are not found in all kingdoms: NUO21, NUOP1, NUOP3–6, and CAG1–3 (Table 13.1). While NUO21 and NUOP1 are found in land plants and fungi but not in mammals, NUOP3 and CAG1–3 seem to be common only to plants, and NUOP4–6 could be specific to the green algal lineage (Cardol et al., 2004, 2005, 2008). A polypeptide that comigrated with Complex I in *Chlamydomonas*, originally named NUOP6, was subsequently suggested to be a Complex V subunit in both *Chlamydomonas* and *Polytomella* sp., and renamed ASA7 (Vázquez-Acevedo et al., 2006).

The additional subunits associated with Complex I, the so-called supernumerary subunits, are considered to participate in assembly, stability, or regulation, rather than in enzyme activity (Friedrich et al., 1998; Heazlewood et al., 2003). CAG1–3 are three structurally related subunits representing gamma-type carbonic anhydrases (see Chapter 8, section III.C). In *Arabidopsis*, five gamma-type carbonic anhydrase subunits have been assigned to the membrane arm of Complex I (Parisi et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006). One of them (NP_175159) has also been shown to be important for Complex I assembly and to be possibly involved in mitochondrial one-carbon metabolism (Perales et al., 2005). Single particle electron microscopy of Complex I from *Polytomella* and *Arabidopsis* suggested that these gamma-type carbonic anhydrase subunits could constitute a plant-specific spherical domain which is attached to the central part of the membrane arm of Complex I, and exposed to the matrix (Perales et al., 2005; Sunderhaus et al., 2006).

In plants, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of Complex I. GLDH catalyses the final oxidation of galactono-gamma-lactone to ascorbic acid (Ostergaard et al., 1997; Siendones et al., 1999); its activity decreases with leaf age and is modulated by the availability of oxidized cytochrome *c* (Bartoli et al., 2000). Ascorbate, the major soluble antioxidant and redox buffer in mammals and plants, plays important roles in plant development, photoprotection, and cell expansion (Smirnov, 2000; Arrigoni and De Tullio, 2002). Complex I from *Arabidopsis* exhibits two forms of different mobilities in BN-PAGE. The form with higher mobility has associated GLDH, and the activity of this enzyme could be inhibited by rotenone (Heazlewood et al., 2003). These observations pointed towards the existence of a subpopulation of Complex I whose function could include regulating ascorbate synthesis by monitoring the rate of NADH-driven electron flow through Complex I (Millar et al., 2003). There is a GLDH protein homologue encoded in *Chlamydomonas* (EDP08950), whose possible association with Complex I remains to be explored.

Another Complex I-related enzyme is rhodanese (thiosulfate: cyanide sulfur transferase), which catalyses the transfer of a sulphane sulfur atom from thiosulfate to cyanide. Rhodanese is involved in cyanide detoxification, maintenance of the sulfate pool, and selenium metabolism, and participates in the formation of Fe-S clusters. Thus, it may regulate OXPHOS by controlling the status of Fe-S clusters of respiratory chain enzymes (Ogata and Volini, 1990). A 34.6-kD protein exhibiting rhodanese activity has been found associated with Complex I of the yeast *Y. lipolytica*. Deletion of the corresponding gene demonstrated that it is not essential for Complex I biosynthesis (Abdrakhmanova et al., 2005), but it could be important for the repair, regulation, or quality control of the Fe-S proteins of Complex I (Ogata and Volini, 1990). A gene encoding rhodanese is present in *Chlamydomonas* (EDO98946).

Only three chaperones involved in Complex I assembly have been identified to date, CIA30 and CIA84 of *N. crassa* (Kuffner et al., 1998), and a paralogue (B17.2L) of the bovine B17.2 structural subunit (Ogilvie et al., 2005). In *Chlamydomonas*, a gene encoding the CIA30 homologue is present (Table 13.1). Based on subcomplexes identified in various mutants, partial models of Complex I assembly have been proposed for human (Antonicka et al., 2003; Vogel et al., 2007), *Neurospora* (Videira and Duarte, 2002), and *Chlamydomonas* (Cardol et al., 2006, 2008). In *Chlamydomonas*, the analysis of mutants deficient in the synthesis of mitochondrial-encoded hydrophobic components ND1, ND4, ND5, and ND6 (Cardol et al., 2002, 2008; Remacle et al., 2006), or mutants that have lost the expression of nuclear genes encoding ND3 and ND4L (Cardol et al., 2006) led to the identification of two subcomplexes. A 200-kD soluble subcomplex, bearing a rotenone-insensitive NADH dehydrogenase activity, could correspond to a fragment of the matrix-exposed arm. In ND4 and ND5-deficient cells, a

Table 13.1 Complex I constituents and assembly factors

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|--------------------------------|----------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | <i>Neurospora/ Yarrowia</i> | <i>Arabidopsis</i> |
| Constituents (Subunits) | | | | | |
| <i>NUO10</i> | Subunit 10 | ED098029 | NDUFS7/PSST | 19.3/NUKM | NP_196738 |
| <i>NUO8</i> | Subunit 8 | ED096988 | NDUFS8/TYKY | 21.3c/NUIM | NP_173114 NP_178022 |
| <i>NUO5</i> | 24-kD subunit | EDP08001 | NDUFV2/24 | 24/NUHM | NP_567244 |
| <i>NUO9</i> | ND9 subunit | EDP05911 | NDUFS3/30 | 31/NUGM | Q95748 |
| <i>NUO7</i> | 49-kD ND7 subunit | EDP00001 | NDUFS2/49 | 49/NUCM | P93306 |
| <i>NUO6</i> | 51-kD subunit | EDP06369 | NDUFV1/51 | 51/NUBM | NP_196470 |
| <i>NUOS1</i> | 76-kD subunit | EDP03454 | NDUFS1/75 | 78/NUAM | NP_851103 NP_568550 |
| <i>nd1</i> | Subunit 1 | AAB93446 | ND1 | ND1/NU1M | NP_085565 |
| <i>nd2</i> | Subunit 2 | AAB93444 | ND2 | ND2/NU2M | NP_085584 |
| <i>ND3</i> | ND3 subunit | EDP02792 | ND3 | ND3/NU3M | P92533 |
| <i>nd4</i> | Subunit 4 | AAB93441 | ND4 | ND4/NU4M | NP_085518 |
| <i>ND4L</i> | ND4L subunit | EDP00050 | ND4L | ND4L/NULM | NP_085525 |
| <i>nd5</i> | Subunit 5 | AAB93442 | ND5 | ND5/NU5M | NP_085478 |
| <i>nd6</i> | Subunit 6 | AAB93445 | ND6 | ND6/NU6M | NP_085495 |
| <i>NUOA1</i> | 8-kD subunit | EDP07892 | NDUFA1/MWFE | 9.8/NIMM | NP_566330 |
| <i>ACP1</i> | Acyl-carrier protein | ED098915 | NDUFAB1/SDAP | 9.6/ACPM | NP_176708 |
| <i>NUOB8</i> | 11-kD subunit | EDP01212 | NDUFA2/B8 | 10.5/NI8M | NP_199600 |
| <i>NUOB12</i> | 7-kD subunit | EDP07174 | NDUFB3/B12 | 10.6/NB2M | NP_178355 |
| <i>NUOB13</i> | 18-kD subunit | EDP08707 | NDUFA5/B13 | 29.9/NUFM | NP_568778 |
| <i>NUOS6</i> | 16.3-kD subunit | EDP06101 | NDUFS6/13a | 18.4/NUMM | NP_566191 |
| <i>NUOB14</i> | B14 subunit | EDP02978 | NDUFA6/B14 | 14.8/NB4M | NP_566416 |
| <i>TIM22-like</i> | B14.7 subunit | EDP09567 | NDUFA11/B14.7 | 21.3b/N.I. | NP_565968 |
| <i>NUO17</i> | 17-kD subunit | ED099854 | Q8WZ96/ESSS | 11.6/NUWM | NP_567054 |
| <i>NUOS5</i> | 10-kD subunit | EDP05506 | NDUFS5/PFFD | 11.5/NIPM | NP_191838 NP_182291 |
| <i>NUOP2</i> | 13-kD subunit | EDP03217 | NDUFB4/B15 | 7/NUVM | NP_565726 |
| <i>NUOB16</i> | B16.6 subunit | ED097447 | NDUFA12/B16.6 | 14/NB6M | NP_171957 NP_565761 |
| <i>NUO13</i> | 18-kD subunit | ED098585 | DAP13/B17.2 | 13.4/N7BM | NP_566192 |
| <i>NUOB18</i> | 10-kD subunit | ED099667 | NDUFB7/B18 | 11.3/NB8M | NP_565280 |
| <i>NUOS4</i> | 18-kD subunit | EDP01388 | NDUFS4/AQDQ | 21/NUYM | NP_201560 |

(Continued)

Table 13.1 *Continued*

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|--------------------------------|---|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | <i>Neurospora/ Yarrowia</i> | <i>Arabidopsis</i> |
| Constituents (Subunits) | | | | | |
| <i>NUOS4b</i> | 18-kD-like subunit | | | | |
| <i>NUOA8</i> | 12.5-kD subunit | EDO98408 | NDUFA8/PGIV | 20.8/NUJM | NP_850849 |
| <i>NUOB22</i> | 14-kD subunit | EDO99297 | NDUFB9/B22 | 11.7/N.I. | NP_567970 |
| <i>NUOB10</i> | 17.8-kD subunit | EDP02977 | NDUFB10/PDSW | 12.3/NIDM | NP_564540 NP_566608 |
| <i>NUOA9</i> | 39-kD subunit | EDP06432 | NDUFA9/39 | 40/NUEM | NP_565469 |
| <i>NUO21</i> | 13-kD subunit | EDP08510 | N.I. | NUO20.9/NUXM | NP_567500 |
| <i>NUOP1</i> | 10-kD subunit | EDP08728 | N.I. | NUO10.4/N.I. | NP_567596 |
| <i>NUOP3</i> | 22-kD subunit | EDP07513 | N.I. | N.I. | NP_566309 |
| <i>CAG1</i> | Gamma carbonic anhydrase | EDO96533 | N.I. | N.I. | NP_175159 |
| <i>CAG2</i> | Gamma carbonic anhydrase | EDO97352 | N.I. | N.I. | NP_201156 |
| <i>CAG3</i> | Gamma carbonic anhydrase | EDP00854 | N.I. | N.I. | NP_569036 |
| <i>CAH9</i> | Carbonic anhydrase 9 | EDP07163 | N.I. | N.I. | NP_190437 |
| <i>NUOP4</i> | 9-kD subunit | EDP02796 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>NUOP5</i> | 16-kD subunit | EDP02802 | N.I. | N.I. | N.I. |
| Assembly factors | | | | | |
| <i>NUOAF1</i> | Complex I intermediate-associated CIA30 protein | EDP06825 | NDUFAF1/CIA30 | CIA30 | NP_177386 |

Note: N.I. (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found.

700-kD membrane-associated subcomplex also demonstrates NADH dehydrogenase activity (Cardol et al., 2002; Remacle et al., 2006). This subcomplex is less tightly bound to the membrane than the wild-type enzyme, and is mainly composed of subunits classically belonging to the matrix-exposed arm (Cardol et al., 2008).

B. Complex II, succinate:ubiquinone oxidoreductase

Complex II or succinate:ubiquinone oxidoreductase (EC 1.3.99.1) is usually presented as an enzyme involved both in the Krebs cycle and respiratory chain. Classically, Complex II comprises four distinct nucleus-encoded polypeptides, SDH1 (the flavoprotein subunit), SDH2 (the iron-sulfur subunit),

Table 13.2 Complex II constituents

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|----------------------|---|-------------|-------------------------------------|-------|------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| <i>SDH1</i> | Subunit A | EDP09580 | SDHA | SDH1 | NP_179435 NP_201477 |
| <i>SDH2</i> | Iron-sulfur subunit | EDP08267 | SDHB | SDH2 | NP_198881 NP_189374 |
| <i>SDH3</i> | Subunit b ₅₆₀ , alternative splicing variant 1 | EDP09244 | SDHC (QPS1) | SDH3 | NP_196522 |
| <i>SDH3</i> | Subunit b ₅₆₀ , alternative splicing variant 2 | EDP09245 | SDHC (QPS1) | SDH3 | NP_196522 |
| <i>SDH4</i> | Subunit D | EDP09690 | SDHD | SDH4 | NP_566077 |

and two hydrophobic membrane anchors, SDH3 (subunit III) and SDH4 (subunit IV) (Cecchini et al., 2002; Lemire and Oyedotun, 2002). The genes encoding the corresponding subunits are all present in *Chlamydomonas* (Cardol et al., 2005) (Table 13.2). A single Complex II chaperone, TCM62, has been identified in yeast mitochondria (Dibrov et al., 1998), but no counterpart gene could be identified in *Chlamydomonas*.

C. Complex III, ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase

Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (EC 1.10.2.2), *bc*₁ complex, or mitochondrial Complex III, has been well characterized from a variety of sources including mammals, yeast, and higher plants. Composed of ten well-conserved subunits, the oligomeric membrane protein complex contains three subunits carrying redox groups: cytochrome *b*, cytochrome *c*₁, and a Rieske iron-sulfur protein (ISP) (Braun and Schmitz, 1995; Iwata et al., 1998; Eubel et al., 2003). The *bc*₁ complex from *Chlamydomonas* was isolated and resolved into nine subunits with molecular masses ranging from 10kD to 50kD (Atteia, 1994; van Lis et al., 2003), and four of these polypeptides were identified: QCR1 or core I (53kD), whose N-terminal sequence was obtained; cytochrome *b*, cytochrome *c*₁, and the ISP (Gray and Boer, 1988; Atteia et al., 2003). Six other Complex III components were identified by searching the genome: QCR2 (core II), QCR7 (subunit VI), QCR8 (subunit VII or “ubiquinol-binding” protein), QCR6 (subunit VIII or “hinge protein”), QCR9 (subunit X), and QCR10 (subunit XI) (Cardol et al., 2005; Table 13.3). Thus, on the basis of this putative subunit composition, Complex III of *Chlamydomonas* is very similar to that of other eukaryotes.

Table 13.3 Complex III constituents and assembly factors

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|--------------------------------|---|----------------------|-------------------------------------|-------------------|------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| Constituents (Subunits) | | | | | |
| <i>QCR1</i> | 50-kD core 1 subunit Peptidase beta subunit (beta-MPP) | EDP00713 | UQCRC1/ Core1 | COR1/ beta-MPP | NP_186858 |
| <i>QCR2</i> | core 2 subunit | | UQCRC2/ Core2 | QCR2 | NP_566548 NP_175610 |
| <i>MPPA1</i> <i>MPPA2</i> | Peptidase alpha subunit | EDP00385 EDP05489 | | | |
| <i>cob</i> | Cytochrome <i>b</i> | AAB93440 | CYB/III | COB | P42792 |
| <i>CYC1</i> | Cytochrome <i>c1</i> | ED096204 | CYC1/IV | CYT1 | NP_189360 NP_198897 |
| <i>RIP1</i> | Rieske iron-sulfur protein | EDP09520 | UQCRCFS1/ RISP,IX | RIP1 | NP_196848 NP_568288 |
| <i>QCR7</i> | 14-kD subunit | EDP08285 | UQCRB/VI, 14 kD | QCR7 | NP_849484 NP_194973 |
| <i>QCR8</i> | 9-kD subunit | EDP00113 | UQCRQ/VII | QCR8 | NP_187697 NP_196156 |
| <i>QCR6</i> | 8-kD subunit | ED099747 | UQCRH/VIII | QCR6 | NP_178219 NP_172964 |
| <i>QCR9</i> | 7-kD subunit | ED098612 | UQCR10/X | QCR9 | NP_190841 |
| <i>QCR10</i> | 10-kD subunit | EDP00790 | 6.4 kD/XI | QCR10 | NP_565941 |
| Assembly factors | | | | | |
| <i>CBP3</i> | Chaperone | EDP09522 | CBP3 | CBP3 | NP_199935 |
| <i>BCS1</i> | Biogenesis factor | ED097908 | BCS1 | BCS1 | NP_850841 |
| <i>ABC1</i> | Ubiquinone biosynthesis protein | EDP06299 | ABC1 | ABC1 | NP_192075 |

QCR1 and QCR2 homologues from higher plants possess a proteolytic activity (mitochondrial processing peptidase or MPP) that cleaves the transit peptide of preproteins when they are imported into mitochondria (Glaser and Dessi, 1999). In *Chlamydomonas*, QCR1 exhibits consensus sequences typical of β -MPPs while QCR2 does not share consensus sequences for α -MPP activity (van Lis et al., 2003). Nevertheless, a third

component, with the characteristics of an MPP α subunit (MPPA) is also encoded in *Chlamydomonas* (Table 13.3).

Several proteins involved in Complex III biogenesis have been identified in yeast: COQ8 (previously ABC1: Bousquet et al., 1991; Do et al., 2001), the assembly factor BCS1, required for the expression of a functional ISP (Nobrega et al., 1992; Cruciat et al., 1999); the chaperone CBP3 (Shi et al., 2001); CBP1, 2, and 6, CBS1 and 2, required for proper expression, maturation, assembly, and stability of cytochrome *b* (Dieckmann et al., 1982; McGraw and Tzagoloff, 1983; Dieckmann and Tzagoloff, 1985; Rodel, 1986) and the assembly factor CBP4 (Crivellone, 1994). Three homologues of the yeast proteins were found to be encoded in *Chlamydomonas*: COQ8, BCS1, and CBP3. Their participation in Complex III biogenesis remains to be confirmed.

D. Cytochrome *c*

Soluble cytochrome *c* from *Chlamydomonas* is encoded by a single nuclear gene (Table 13.4) very similar to those of higher plants (Amati et al., 1988). The gene has three introns, two of which are located at almost the same positions in the corresponding genes of *Arabidopsis* and rice, suggesting that these two introns predate the divergence of green algae and higher plants. Expression of cytochrome *c* in *Chlamydomonas* is induced by acetate and light. Inhibitors of the mitochondrial respiratory chain do not induce its expression but DCMU, an inhibitor of the photosynthetic electron transport chain, does (Felitti et al., 2000).

Three distinct pathways of cytochrome *c* biogenesis have been described (Kranz et al., 1998). System I occurs in mitochondria from higher plants and protozoa, system II is found in many Gram-positive bacteria, cyanobacteria,

Table 13.4 Cytochrome *c* and assembly factors

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------------|-----------------|------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| Cytochrome <i>c</i> | | | | | |
| <i>CYC</i> | Mitochondrial cytochrome <i>c</i> | EDP00604 | CYC/CytC | CYC1 | NP_173697 NP_192742 |
| Assembly factors | | | | | |
| <i>HCS1</i> | Cytochrome <i>c</i> heme lyase | EDP00694 | CCHL | CYT2 (CC1HL) | N.I. |
| <i>HCS2</i> | Cytochrome <i>c</i> heme lyase | ED098886 | N.I. | CYC3 | N.I. |
| <i>HCS3</i> | Cytochrome <i>c</i> heme lyase | EDP00575 | N.I. | N.I. | N.I. |

Note: N.I. (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found.

and chloroplasts from higher plants and green algae, and system III occurs in mitochondria from yeasts (CYC3 and CYT2) and animals (CCHL). In *Chlamydomonas*, whereas no system I counterparts could be identified, three heme lyase enzymes homologous to system III components (yeast CYC3 and CYT2, and animal CCHL) are encoded (Cardol et al., 2005).

E. Complex IV, cytochrome *c* oxidase

Complex IV (cytochrome *c* oxidase, EC 1.9.3.1) catalyzes electron transfer from soluble cytochrome *c* to oxygen and contributes to the formation of the electrochemical potential. In yeast and mammals, the complex is composed of 12 (Taanman and Capaldi, 1992) and 13 (Yanamura et al., 1988) subunits, respectively. In *Arabidopsis*, the enzyme is composed of 10–12 subunits but only 7 have been identified (Eubel et al., 2003). Three subunits, usually encoded in the mitochondrial genome, comprise the catalytic core: COX1, which binds heme *a*, heme *a*₃, and Cu_B; COX2, which binds Cu_A; and COX3. The other subunits, all of which are nucleus-encoded, are considered to be regulatory proteins or polypeptides that participate in biogenesis of the complex. Exceptions to mitochondrial coding of the catalytic core exist. In some legumes only subunits COX1 and COX3 are mitochondrially-encoded (Daley et al., 2002), whereas in *Chlamydomonas* (Michaelis et al., 1990) and *Polytomella parva* (Fan and Lee, 2002) only COX1 is encoded in the mitochondrial genome.

The *Chlamydomonas* cytochrome *c* oxidase complex was resolved by BN-PAGE into 10 polypeptides with molecular masses ranging from 8 kD to 40 kD (van Lis et al., 2003). Eight coding sequences for these polypeptides have been identified in *Chlamydomonas*, the orthologues of bovine subunits COX1, 2, 3, 4, 5b, 6a, and 6b (Cardol et al., 2005) and the plant-specific subunit COX5c (Jansch et al., 1996; Hamanaka et al., 1999; Table 13.5). The subunit composition of *Chlamydomonas* Complex IV deduced from genome sequencing is quite similar to the subunit composition of Complex IV from *Arabidopsis*. Nevertheless, important differences do exist. In *Chlamydomonas* and *Polytomella*, COX2 is encoded by two separate nuclear genes (*COX2a* and *COX2b*), whereas in the vast majority of eukaryotes COX2 is encoded by a single mitochondrial gene. The chlorophycean genes encode COX2A, which comprises the N-terminal, hydrophobic half of a conventional COX2 protein; and COX2B, which corresponds to the soluble C-terminal half (Pérez-Martínez et al., 2001). These algal subunits contain unique C- and N-terminal extensions, respectively – not present in conventional COX2 subunits – that may participate in the assembly and stabilization of the split COX2 subunit in the mature complex (Pérez-Martínez et al., 2001). Split *COX2a* and *COX2b* genes have also been identified in other *Chlamydomonas*-related algae and in apicomplexan parasites (Funes et al., 2002b; Gardner et al., 2002).

Table 13.5 Complex IV constituents and assembly factors

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|--------------------------------|--|-------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| Constituents (Subunits) | | | | | |
| <i>COX1</i> | Subunit 1 | AAB93443 | COI | COI | P60620 |
| <i>COX2a</i> | Subunit II, protein IIa of split subunit | EDP00208 | COII | COII | P93285 |
| <i>COX2b</i> | Subunit II, protein IIb of split subunit | EDP09974 | COII | COII | P93285 |
| <i>COX3</i> | Subunit 3 | EDP04132 | COIII | COIII | P92514 |
| <i>COX5b</i> | Subunit 4, 13 kD | EDP08953 | COX5B | IV (COX4) | NP_188185 NP_178140 |
| <i>COX5c</i> | 11-kD subunit | EDP00106 | N.I. | N.I. | NP_850738 NP_182260 |
| <i>COX13</i> | 12-kD subunit | EDP03436 | COX6A | COXVIa (COX13) | NP_195496 |
| <i>COX12</i> | COX subunit | EDP05132 | COX6B | COXVIb (COX12) | NP_173661 NP_194535 |
| <i>COX90</i> | COX subunit | ED098724 | N.I. | N.I. | N.I. |
| Assembly factors | | | | | |
| <i>SHY1</i> | COX assembly protein | ED097446 | Surfeit1 | SHY1 | NP_566592 |
| <i>SCO1</i> | COX assembly factor | ED097370 | SCO1, SCO2 | SCO1, SCO2 | NP_566339 |
| <i>COX10</i> | COX assembly protein | ED096513 | COX10 | COX10 | NP_566019 |
| <i>COX11</i> | COX assembly protein | ED098350 | COX11 | COX11 | NP_171743 |
| <i>COX15</i> | COX assembly factor | EDP06678 | COX15 | COX15 | NP_200420 |
| <i>COX16</i> | COX assembly factor | EDP06214 | AAH01702 | COX16 | NP_680684 |
| <i>COX17</i> | COX assembly protein | ED097130 | COX17 | COX17 | NP_175711 |
| <i>COX18</i> | COX assembly factor | ED098825 | OXA1 | COX18, OXA1 (PET1402) | NP_201011 |
| <i>COX19</i> | COX assembly protein | EDP08032 | COX19 | COX19 | NP_849852 |
| <i>COX23</i> | COX assembly protein | ED098664 | NP_077276 | COX23 | NP_171718 |
| <i>PET191</i> | COX assembly protein | ED098359 | AAH47722 | PET191 | BAC43353 |

Note: N.I. (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found.

Chlamydomonas Complex IV supernumerary subunits show some unusual characteristics. One is that the first 60 residues of the mature subunit COX6b are highly hydrophobic and have counterparts in plant sequences, but not in animals or yeast. Second, COX4 lacks the three conserved cysteines that are known to bind a zinc atom in cytochrome *c* oxidase (Rizzuto et al., 1991). Finally, COX6a possesses an N-terminal region with

high similarity to COX5a from mammals, while the C-terminal region is more similar to the COX6a subunit. The functional significance of these differences remains to be explored.

The Complex IV assembly pathway is well-studied in *S. cerevisiae*, with more than 20 chaperones involved in its biogenesis. Several homologues of these proteins have been identified in *Chlamydomonas* (Cardol et al., 2005): those that play a role in copper delivery to cytochrome *c* oxidase such as COX11, COX17, COX19, COX23, SCO1, and SCO2 (Nobrega et al., 2002; Barros et al., 2004; Horng et al., 2004; Leary et al., 2004); those required for heme *a* biosynthesis, such as COX10 and COX15 (Glerum and Tzagoloff, 1994; Barros and Tzagoloff, 2002); SHY1, which is believed to act as a translational activator for the mitochondrially-encoded subunits (Barrientos et al., 2002); those required for the insertion of various hydrophobic proteins in the inner mitochondrial membrane such as COX18 and OXA1 (He and Fox, 1997; Saracco and Fox, 2002; Funes et al., 2004); and two chaperones, COX16 and Pet191 (McEwen et al., 1993; Carlson et al., 2003). Lastly, COX90 is a protein identified in *Chlamydomonas* which has no counterpart in other organisms apart from green algae (Lown et al., 2001).

F. Complex V, ATP synthase

Complex V (F_0F_1 -ATP synthase, EC 3.6.1.3) catalyzes the phosphorylation of ADP by inorganic phosphate, using the proton motive force generated by the substrate-driven electron transfer chain. F_0F_1 -ATP synthase is considered 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/F₆*], 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 rotor-stalk. 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 regulatory roles, 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).

The eukaryotic Complex V contains components similar to those found in bacteria, but possesses additional subunits. In mammals, ATPase includes 16 subunits (Collinson et al., 1994) whereas the yeast enzyme comprises 20 components, 13 being essential for the structure of the complex (Velours et al., 1998; Velours and Arselin, 2000). Mitochondrial ATP synthase preparations from *Chlamydomonas* exhibited an activity of 2.87 μ moles ATP

hydrolyzed/minute/mg protein, and was 40% inhibited by oligomycin (Nurani and Franzén, 1996). The algal mitochondrial ATP synthase contains 16 subunits of 7–60 kD (Franzén and Falk, 1992; Nurani and Franzén, 1996; Funes et al., 2002a; van Lis et al., 2003; Cardol et al., 2005; Vázquez-Acevedo et al., 2006; Table 13.6). Eight polypeptides were identified as subunits α , β , γ , δ , ϵ , a (ATP6), c (ATP9), and OSCP, while no homologues of the b , d , e , f , g , A6L, and F6 subunits were found. Nine novel polypeptides (named ASA for ATP Synthase Associated proteins), ASA1–9, are associated with chlorophycean mitochondrial ATP synthases and exhibit no counterparts in other eukaryotes (Cardol et al., 2005; Vázquez-Acevedo et al., 2006). The ASA1 polypeptide (61 kD), initially named MASAP, MAAP67, or P60, was found in the isolated mitochondrial ATP synthases of both *Chlamydomonas* and *Polytomella* sp. It was hypothesized that ASA1 is responsible for the extraordinary stability of the chlorophycean Complex V dimer (van Lis et al., 2003, 2005). Complex V of chlorophycean algae such as *Chlamydomonas*, *Polytomella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Chlorogonium elongatum*, and *Chlorococcum ellipsoideum* migrates in BN-PAGE as a stable dimer of 1600 kD (van Lis et al., 2003; Dudkina et al., 2005; van Lis et al., 2005; Vázquez-Acevedo et al., 2006). The dimer was further confirmed in *Polytomella* sp. by electron microscopy (Dudkina et al., 2005) and biochemical studies (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Models suggesting the topological arrangement of subunits ASA1–9 in Complex V have been proposed (Vázquez-Acevedo et al., 2006; Van Lis et al., 2007). Thus, chlorophycean algae contain novel constituents in their mitochondrial ATP synthase which give rise to a highly stable, dimeric enzyme.

The chlorophycean OXPHOS complex exhibits three additional particular features. First, in contrast to other eukaryotes, it is entirely nucleus-encoded (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Second, two isoforms of ATP9 (subunit c) could be present in *Chlamydomonas*, since two genes are predicted to encode c -like subunits. These genes are adjacent on linkage group XIX, and are divergently transcribed. Nevertheless, the N-terminal sequences of the ATP9 subunits (van Lis et al., 2003) do not allow predictions regarding whether both or only one of the polypeptides are present in the mature complex. Third, the β subunit of *Chlamydomonas* and *Polytomella* Complex V has a C-terminal extension not found in other organisms (Franzén and Falk, 1992; Atteia et al., 1997), which shows sequence similarity to the inhibitor protein of the F_0F_1 -ATPase from other eukaryotes, and to the ϵ subunit of the *E. coli* enzyme. Therefore, the C-terminal extension may play a regulatory role in these algae.

Eight assembly factors for Complex V have been identified in yeast: two chaperones for the F_1 domain, ATP11 and ATP12 (Ackerman and Tzagoloff, 1990a; Wang et al., 2001); FMC1, which is required for the assembly or stability of F_1 in heat stress conditions (Lefebvre-Legendre et al., 2001); ATP10 and ATP22, which are required for the assembly of F_0 (Ackerman

Table 13.6 Complex V constituents and assembly factors

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| Constituents (Subunits) | | | | | |
| <i>ATP6</i> | Subunit 6 | EDP09230 | ATP6/a | ATPA (ATP6) | P93298 P92547 |
| <i>ATP9A</i> | Subunit 9, isoform A | ED097408 | ATP5G3/c | ATPC (ATP9) | P60112 NP_178769 |
| <i>ATP9B</i> | Subunit 9, isoform B | ED097377 | ATP5G3/c | ATPC (ATP9) | P60112 NP_178769 |
| <i>ATP1</i> | Alpha subunit | EDP07337 | ATP5A1/α | α (ATP1) | P92549 NP_178788 |
| <i>ATP1B</i> | Alpha subunit isoform B | EDP06403 | ATP5A1/α | α (ATP1) | P92549 NP_178788 |
| <i>ATP2</i> | Beta subunit | EDP04740 | ATP5B/β | β (ATP2) | NP_568203 NP_680155 NP_568204 |
| <i>ATP3</i> | Gamma subunit | ED097956 | ATP5C1/γ | γ (ATP3) | NP_180863 |
| <i>ATP16</i> | Delta subunit | ED099236 | ATP5D/δ | δ (ATP16) | NP_199514 |
| <i>ATP15</i> | Epsilon subunit | EDP06388 | ATP5E/ε | ε (ATP15) | NP_175576 |
| <i>ATP5</i> | Subunit 5, OSCP subunit | EDP01322 | ATP5O/OSCP | ATP5 | NP_196849 |
| <i>ASA1</i> | Associated 60.6-kD protein | EDP03873 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA2</i> | Associated 45.5-kD protein | EDP00850 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA3</i> | Associated 36.3-kD protein | ED098373 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA4</i> | Associated 31.2-kD protein | EDP08830 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA5</i> | Associated 14.3-kD protein | EDP00370 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA6</i> | Associated 13.3-kD protein | EDP06853 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA7</i> | Associated 19.5-kD protein | EDP00858 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA8</i> | Associated 10.0-kD protein | EDP01930 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ASA9</i> | Associated 12.0-kD protein | EDP02597 | N.I. | N.I. | N.I. |
| Assembly factors | | | | | |
| <i>ATP11</i> | Assembly factor 1 for F1 component | EDP05655 | ATPAF1 | ATP11 | NP_565778 |
| <i>ATP12a</i> | Assembly factor 2, splice variant a | EDP00509 | ATPAF2 | ATP12 | NP_198882 |
| <i>ATP12b</i> | Assembly factor 2, splice variant b | EDP00510 | ATPAF2 | ATP12 | NP_198882 |

Note: N.I. (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found.

and Tzagoloff, 1990b; Helfenbein et al., 2003; Tzagoloff et al., 2004); AEP1 and AEP2, which are required for the correct expression of ATP9 (Payne et al., 1991; Finnegan et al., 1995); and AEP3, which stabilizes the mitochondrial dicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 (Ellis et al., 2004). Genes for only two of them, ATP11 and ATP12 (with two splice variants), could be identified in *Chlamydomonas* (Table 13.6). The rest of the genes encoding ATP synthase biogenesis factors may not be present at all, or their sequences may have highly diverged. Also, specific chaperones involved in the biogenesis of the ASA subunits, unique to algal ATP synthase but yet unidentified, may be present in *Chlamydomonas*.

G. Other components related to OXPHOS

1. Alternative NAD(P)H dehydrogenases

In addition to the proton-pumping Complex I, plant and fungal mitochondria contain several type II NAD(P)H dehydrogenases. These enzymes, located at the surface of the mitochondrial inner membrane and facing either the intermembrane space or the matrix, allow electron transfer from NAD(P)H to ubiquinone. They are single, low molecular weight polypeptides whose activity is insensitive to rotenone (Møller et al., 1993). In *S. cerevisiae*, three enzymes have been characterized (Marres et al., 1991; Luttik et al., 1998) whereas in *Arabidopsis*, three gene families (*NDA*, *NDB*, and *NDC*), with different evolutionary origins, encode NADH dehydrogenases that are exclusively targeted to mitochondria (Michalecka et al., 2003; Elhafez et al., 2006).

Chlamydomonas encodes six proteins with amino acid similarity to known type II – NAD(P)H dehydrogenases (*NDA1*, 2, 3, 5, 6, and 7; Cardol et al., 2005; Table 13.7). In particular, the *NDA6* and *NDA7* genes are adjacent and presumably arose through a duplication event. Biochemical studies suggest that at least one type-II NAD(P)H dehydrogenase could be involved in plastoquinone reduction in *Chlamydomonas* chloroplasts (Peltier and Cournac, 2002; Mus et al., 2005). This situation differs with land plants where a bacterial Complex I-like enzyme, absent in *Chlamydomonas*, acts in the chloroplast (Sazanov et al., 1998).

2. Alternative oxidases

Besides the classical terminal *aa*₃-type oxidase, mitochondria from plants, several fungi, and several protists also possess an alternative oxidase (AOX) that drives the electrons from the ubiquinol pool directly to molecular oxygen and does not contribute to the formation of an electrochemical gradient. The enzyme is thought to regulate mitochondrial respiratory electron flow and to protect plant cells from oxidative damage (Maxwell et al., 1999). In plants, various developmental and environmental conditions enhance AOX expression (Berthold et al., 2000; Clifton et al., 2006; Elhafez et al., 2006),

Table 13.7 Alternative electron transfer constituents

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|----------------------|---|-------------|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| <i>AOX1</i> | Alternative oxidase | EDP02600 | N.I. | Q01355 (Nc) | NP_188876 (AOX1a) |
| <i>AOX2</i> | Alternative oxidase | EDP06011 | N.I. | N.I. | NP_188875 (AOX1b) |
| <i>NDA1</i> | Mitochondrial type-II NADH dehydrogenase | ED099183 | N.I. | ND1 | NP_180560 (NDA2) |
| <i>NDA2</i> | Type-II calcium- dependent NADH dehydrogenase | ED096450 | N.I. | N.I. | NP_567283 (NDB2) |
| <i>NDA3</i> | Mitochondrial NADH dehydrogenase | ED097072 | N.I. | N.I. | NP_179673 (NDB4) |
| <i>NDA5</i> | Type-II NADH dehydrogenase | EDP04459 | N.I. | N.I. | NP_568205 (NDC1) |
| <i>NDA6</i> | Type-II NADH dehydrogenase | ED096700 | N.I. | N.I. | NP_190005 |
| <i>NDA7</i> | Type-II NADH dehydrogenase | ED096701 | N.I. | N.I. | NP_974819 |

Note: N.I. (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found.

whereas its induction in fungi is mainly dependent on cytochrome pathway restriction and triggering by reactive oxygen species (Helmerhorst et al., 2005; Juárez et al., 2006).

In *Chlamydomonas*, a cyanide and carbon monoxide-resistant respiratory pathway was recognized (Hommersand and Thimann, 1965), and later shown to be sensitive to salicyl hydroxamic acid (Weger et al., 1990). Furthermore, the alternate respiratory pathway was present under normal growth conditions but decreased considerably at high CO₂ concentrations (Goyal and Tolbert, 1989). Several *Chlamydomonas* respiratory-deficient mutants with an impaired cyanide-sensitive cytochrome pathway still exhibit a fully functional alternative pathway (Dorthu et al., 1992).

Evidence for the presence of an AOX in *Chlamydomonas* has been provided (Matagne et al., 1989; Eriksson et al., 1995; Derzaph and Weger, 1996) and the expression of two genes, *AOX1* and *AOX2*, has been reported (Table 13.7), *AOX1* being more actively transcribed than *AOX2* (Dinant et al., 2001). By fusing the *AOX1* promoter region to the promoterless aryl-sulfatase reporter gene, it was shown that this promoter is unresponsive to H₂O₂-induced oxidative stress, antimycin A and other inducers known to act on AOX in higher plants (Baurain et al., 2003). In contrast, the reporter

gene was strongly activated by changing the nitrogen source from NH_4 to NO_3 , and the level of the AOX protein concomitantly increased. However, RNA gel blot experiments demonstrated that the *AOX1* mRNA level was increased not only by changing the nitrogen source but also by the presence of H_2O_2 , cold stress and antimycin A (Molen et al., 2006). This may indicate that key regulatory elements exist downstream of the transcriptional start, which escaped the detection using the reporter gene. Nevertheless, and unlike higher plants, even when AOX is transcriptionally activated by antimycin A, there is no accumulation of AOX protein, suggesting a post-transcriptional control of AOX levels (Molen et al., 2006). In contrast to *Chlamydomonas*, *Polytomella* seems to lack AOX, which may be related to the loss of photosynthesis in this alga (Reyes-Prieto et al., 2002).

3. Uncoupling proteins

Uncoupling proteins (UCPs) belong to the mitochondrial anion carrier protein family. UCPs are anchored in the inner membrane and compete with the F_0F_1 -ATP synthase for the proton electron gradient built up by the activity of respiratory-chain Complexes I, III, and IV. They are present in all eukaryotes investigated except yeast, and their physiological roles are still under investigation and debate. A consensus function for UCPs might be the maintenance of energy balance during phosphorylating conditions, indirectly protecting the mitochondrion against reactive oxygen species by diminishing the reduced state of the respiratory chain (Sluse et al., 2006). To date, three UCP-encoding genes have been identified in *Chlamydomonas*: *UCP1*, *UCP2*, and *UCP3* (Table 13.8).

Table 13.8 Other mitochondrial constituents

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|----------------------|---------------------------------|-------------|--|----------|--------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens</i> / <i>Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| <i>UCP1</i> | Uncoupling protein | EDP01675 | NP_068605(UCP1) | N.I. | NP_190979 (UCP1) |
| <i>UCP2</i> | Uncoupling protein | EDP08337 | NP_003346 (UCP2) | N.I. | NP_974962 (UCP2) |
| <i>UCP3</i> | Uncoupling protein | EDP04204 | O95847 (UCP4) | N.I. | NP_172866 |
| <i>ANT1</i> | Adenine nucleotide translocator | EDP01885 | ADT1,2,3 | ADT1,2,3 | NP_194568 |
| <i>ANT2</i> | ADP/ATP carrier protein | EDP05104 | ADT1,2,3 | ADT1,2,3 | NP_196853 |
| <i>PFL1</i> | Pyruvate-formate lyase | EDP09457 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>PAT1</i> | Phosphotransacetylase | EDP02499 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ACK1</i> | Acetate kinase | EDP02500 | N.I. | N.I. | N.I. |
| <i>ACK2</i> | Acetate kinase | EDP04790 | N.I. | N.I. | N.I. |

Note: N.I. (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found.

4. Pyruvate formate-lyase

When *Chlamydomonas* is subjected to anaerobic conditions in the dark – in artificial systems where oxygen is replaced by inert gases such as argon or nitrogen – fermentative products such as formate, ethanol, acetate, small amounts of lactate and glycerol, and low amounts of CO₂ and H₂ can be detected (Gfeller and Gibbs, 1984; Kreuzberg, 1984). The production of formate in the ratio of 2:1:1 relative to ethanol and acetate was predicted to be carried out by pyruvate formate-lyase (PFL) (Kreuzberg, 1984), the enzyme that cleaves pyruvate into acetyl-CoA and formate. PFL is widespread in bacteria but rarely found in eukaryotes. The genes encoding PFL, phosphotransacetylase, and acetate kinase are present in *Chlamydomonas* (Table 13.8) and biochemical evidence exists for the presence of the corresponding protein products in mitochondria (Atteia et al., 2006). Thus, an alternative route of mitochondrial ATP synthesis is present in *Chlamydomonas* involving pyruvate, acetyl-CoA, acetyl-phosphate, and acetate as end product.

5. Ubiquinone biosynthesis pathway components

Ubiquinone (Coenzyme Q or CoQ) is a lipid composed of a redox-active benzoquinone ring connected to a long isoprenoid side chain (usually 6–10 units). CoQ plays a central role in the mitochondrial respiratory chain since it shuttles electrons from Complex I, Complex II, and type-II NAD(P)H dehydrogenases to Complex III and AOX. In addition, the redox state of CoQ regulates the activity of UCPs in land plants, mammals, and protists (Turunen et al., 2004; Sluse et al., 2006). In yeast, the terminal biosynthesis of CoQ starts from farnesyl pyrophosphate, a common lipid precursor, and requires at least nine enzymes (Coq1–9). However, the exact functions of several COQ genes are still unknown and their corresponding products may either catalyze an individual step in CoQ biosynthesis (e.g. COQ5, COQ6) or have a regulatory role (e.g. COQ8, COQ9) (Turunen et al., 2004; Johnson et al., 2005). In addition, the yeast Coq10 protein could be a Q-binding protein required for proper localization of the quinone within mitochondria (Barros et al., 2005). While the size of the isoprenoid side chain is not known in *Chlamydomonas*, the CoQ biosynthesis pathway is well conserved based on genome sequence, which includes homologues of COQ1–6 and COQ8–10 (Table 13.9).

III. IMPORT OF NUCLEUS-ENCODED OXPHOS PROTEINS

Nucleus-encoded mitochondrial proteins are synthesized as precursors with N-terminal extensions called mitochondrial targeting sequences (MTSs), mitochondrial targeting peptides or presequences. These MTSs are required for import into the organelle, and are usually removed by intra-mitochondrial proteases during or shortly after import (Neupert, 1997).

Table 13.9 Putative constituents of the ubiquinone biosynthesis pathway

| <i>Chlamydomonas</i> | | | Counterparts in other organisms | | |
|----------------------|--|--|-------------------------------------|-----------|--------------------|
| Gene | Protein product | Accession # | <i>Homo sapiens/ Bos taurus</i> | Yeast | <i>Arabidopsis</i> |
| <i>COQ1</i> | <i>trans</i> -Prenyltransferase | EDP05515 | TPT | COQ1 | NP_850234 |
| <i>COQ2</i> | Polyprenyl-4-hydroxybenzoatetransferase | EDP01665 | COQ2 | COQ2 | NP_849431 |
| <i>COQ3</i> | 2,3-Dihydroxy-5-polyprenylbenzoate-methyltransferase | EDP06526 | COQ3 | COQ3 | NP_180649 |
| <i>COQ4</i> | Unknown function | EDP00126 | COQ4 | COQ4 | NP_178465 |
| <i>COQ5</i> | C-Methyltransferase | EDP07004 EDP01746 EDP06889 EDP09311 ED099272 ED095817 | COQ5 | COQ5 | NP_200540 |
| <i>COQ6</i> | C-Hydroxylase | EDP07603 | COQ6 | COQ6 | NP_189062 |
| <i>COQ8</i> | Unknown function | EDP06299 | ABC1 | COQ8/ABC1 | NP_192075(ABC1) |
| <i>COQ9</i> | Unknown function | EDP08484 | COQ9 | COQ9 | NP_973861 |
| <i>COQ10</i> | Q-binding protein | EDP04032 | COQ10 | COQ10 | NP_193500 |

Chlamydomonas MTSs appear to range from relatively short to unusually long. Among the OXPHOS proteins, MTSs of the following lengths have been found: Complex V β subunit, 26 amino acids (Franzén and Falk, 1992); Complex V α subunit, 45 amino acids (Nurani and Franzén, 1996); Rieske ISP, 54 amino acids (Atteia and Franzén, 1996); cytochrome c_1 , 70 amino acids (Atteia et al., 2003); ATP6, 107 amino acids (Funes et al., 2002a); COX3, 110 amino acids (Pérez-Martínez et al., 2000); and COX2A, 130 amino acids (Pérez-Martínez et al., 2001). COX2B lacks a cleavable MTS, but the protein contains an N-terminal extension of 43 amino acids that is not present in (mitochondria-encoded) COX2 proteins from other organisms (Pérez-Martínez et al., 2001).

An analysis of these MTSs reveals a number of common features including a low number of acidic residues, and a high proportion of alanines, leucines, serines, glycines, and arginines. They also contain regions with the potential to form positively charged, amphiphilic α -helices, a characteristic feature of MTSs (von Heijne et al., 1989). For the MTS of the F_0F_1 -ATPase β subunit (Franzén and Falk, 1992), this analysis is strengthened by NMR and circular dichroism studies showing that a synthetic peptide corresponding

to the MTS adopts an α -helical structure in 2,2,2-trifluoroethanol/water, a solvent supposed to mimic biological membranes (Lancelin et al., 1996). A similar analysis of peptides corresponding to chloroplast targeting sequences from *Chlamydomonas* ferredoxin (Lancelin et al., 1994) and Rubisco activase (Krimm et al., 1999) showed that a helix-coil motif or a coil-helix motif is formed in the solvent/water mixture. Although these helices are amphiphilic they have weaker hydrophobic sectors, and therefore they are less amphiphilic than the helices predicted in MTSs. These differences between the mitochondrial and chloroplast targeting sequences are probably important for the sorting of proteins between these organelles.

The shorter *Chlamydomonas* MTSs are those that seem to direct the protein exclusively to the mitochondrial matrix, such as in the case of the F₀F₁-ATP synthase α and β subunits. The rest of the MTSs seem to have bipartite structures, with N-terminal regions containing positively charged, amphiphilic α -helices that may direct the precursor to the mitochondrial matrix (mitochondrial targeting signal), followed by C-terminal regions that may direct the proteins to their final destination in the inner mitochondrial membrane. Bipartite MTSs seem to be unusually large in those preproteins that are relatively more hydrophobic (with two or more putative transmembrane stretches) and where the corresponding genes have been transferred to the nucleus relatively recently in evolution: *ATP6*, *COX2A*, *COX3*, *NAD3*, and *NAD4L*. A long MTS could improve the interaction of the precursor with the mitochondrial import machinery (Claros and Vincens, 1996) or could help the unfolding of the protein to increase its importability (Claros et al., 1995).

After import into the mitochondrion, the MTS is removed by MPP, which was mentioned in section II.C. In most organisms, this protease is a soluble enzyme, but in higher plants it is membrane-bound. It has been found that the QCR1 and QCR2 subunits of the higher plant Complex III are identical to the MPP subunits. Thus in higher plants, Complex III is a bifunctional enzyme, involved in both electron transport and protein processing (Glaser and Dessi, 1999). In most organisms, including animals and *S. cerevisiae*, there is a soluble MPP, the subunits of which show sequence homology to the core proteins of Complex III (Neupert, 1997). As mentioned above, *Chlamydomonas* QCR1 appears to be a typical β -MPP protein while QCR2 is not a typical α -MPP protein (van Lis et al., 2003). The situation in *Chlamydomonas* appears to be similar to the one in *N. crassa*, in which the β -MPP protein has two different roles; together with the α -MPP protein it functions as a soluble MPP; it also functions as the QCR1 protein of Complex III. The QCR2 protein of *N. crassa* is different from the α -MPP (Neupert, 1997; Glaser and Dessi, 1999). This analysis is consistent with the results of Nurani et al. (1997), who reported that the *Chlamydomonas* MPP is a soluble enzyme. Either MPPA1 (EDP00385)

or MPPA2 (EDP05489), additional QCR/MPP proteins distinct from QCR1 and QCR2, could play the role of the α subunit of a soluble MPP.

The bacterial equivalent of Complex III lacks core proteins. Following endosymbiosis and the evolution of mitochondria, a soluble protease with two subunits may have been attached to Complex III, giving rise to the situation seen in higher plants. In most organisms, the genes of both protease subunits were duplicated. One set of genes evolved to encode core proteins without protease activity, and the other set to encode a soluble MPP. *Chlamydomonas* and *N. crassa* may represent an intermediate stage in this process. Here, the *QCR2*/ α -MPP gene has been duplicated, and the two copies have evolved into genes encoding a core protein and a soluble protease subunit, respectively. The *QCR1*/ β -MPP gene is not duplicated, and some copies of the gene product integrate into Complex III together with QCR2, while other copies remain soluble and interact with α -MPP.

IV. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Overall, the OXPHOS structural components of *Chlamydomonas* are similar to those of higher plants. The main complexes involved in electron transport seem to share a similar number of subunits, and many of the algal polypeptides have plant homologues. Some differences are apparent, such as the presence of a fragmented COX2 subunit, which seems to be unique to chlorophyte algae. More notable is the presence of 8–9 novel subunits in mitochondrial ATP synthase that have no counterparts in plants or other eukaryotes. These subunits, of an as-yet unknown evolutionary origin, appear to form a scaffold that gives rise to a highly stable dimeric complex of 1600 kD, the largest OXPHOS component described to date. The functional consequences (is it more active?, is it more tightly regulated?) of such an ATP synthase in chlorophyte mitochondria remain to be ascertained.

More elusive are the proteins involved in the biogenesis of OXPHOS components. *Chlamydomonas* does encode homologues of some yeast components possibly involved in the biogenesis of mitochondrial OXPHOS proteins. The functions of these components remain to be proven, and other biogenesis proteins, perhaps unique to chlorophyte algae, may well exist.

As a unicellular organism, *Chlamydomonas* offers the unique opportunity to study organelle–organelle interactions, particularly between mitochondria and chloroplasts. It has become evident that crosstalk between these organelles takes place, mainly through intracellular metabolite pools (Raghavendra and Padmasree, 2003). In particular, mitochondrial respiration plays an important role in optimizing photosynthetic efficiency in the chloroplast. Evidence for mitochondria-chloroplast crosstalk in

Chlamydomonas is starting to accumulate. Schönfeld et al. (2004) identified a novel mitochondrial transcription termination factor, MOC1, which regulates the composition of the mitochondrial respiratory chain in the light so that it can act as an effective sink for reductant produced by the chloroplast. Loss of MOC1 causes a high light-sensitive phenotype and disrupts the transcription and expression profiles of cytochrome *c* oxidase and the rotenone-insensitive external NAD(P)H dehydrogenase. Other experimental approaches have shown that activation of *Chlamydomonas* respiration by acetate in the dark induces the activation of mRNAs of nucleus-encoded photosynthetic genes (Matsuo and Obokata, 2006). In addition, inhibitors of the cytochrome pathway (rotenone, antimycin A, or cyanide) inhibited photosynthetic mRNA induction, but inhibitors of the alternate pathway (salicyl hydroxamate) enhanced it. Therefore, nucleus-encoded photosynthetic gene mRNAs are induced in response to activation of the mitochondrial cytochrome pathway (Matsuo and Obokata, 2006). These glimpses into the fine-tuned regulation of mitochondrial function as related to chloroplast components and vice versa, will be expanded in the years to come and will lead us to a more profound understanding of the metabolic interplay between these two organelles. *Chlamydomonas* will be one of the models of choice for these studies.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in our laboratories is supported by grants 56619 from CONACyT (Mexico), IN217108 from DGAPA, UNAM (Mexico) and by grants from the Belgian FRFC (2.4587.04 and 2.4582.05) C.R and from the Belgian FNRS (F.4735.06) to P.C. P.C. is postdoctoral researcher of the Belgian FNRS. The technical expertise of Miriam Vázquez-Acevedo (D.G.-H. laboratory) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schägger, H., Kerscher, S., and Brandt, U. (2004). Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast. *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 148–156.
- Abdrakhmanova, A., Dobrynin, K., Zwicker, K., Kerscher, S., and Brandt, U. (2005). Functional sulfurtransferase is associated with mitochondrial complex I from *Yarrowia lipolytica*, but is not required for assembly of its iron-sulfur clusters. *FEBS Lett.* **579**, 6781–6785.
- Ackerman, S.H. and Tzagoloff, A. (1990a). Identification of two nuclear genes (*ATP11*, *ATP12*) required for assembly of the yeast F_1 -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4986–4990.
- Ackerman, S.H. and Tzagoloff, A. (1990b). *ATP 10*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F_1 - F_0 complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 9952–9959.

- Amati, B.B., Goldschmidt-Clermont, M., Wallace, C.J., and Rochaix, J.D. (1988). cDNA and deduced amino acid sequences of cytochrome c from *Chlamydomonas reinhardtii*: Unexpected functional and phylogenetic implications. *J. Mol. Evol.* **28**, 151–160.
- Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R.P., Haller, R.G., Vissing, J., Kennaway, N.G., and Shoubridge, E.A. (2003). Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J. Biol. Chem.* **278**, 43081–43088.
- Arrigoni, O. and De Tullio, M.C. (2002). Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta* **1569**, 1–9.
- Atteia, A. (1994). Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *C.R. Acad. Sci. Paris* **317**, 11–19.
- Atteia, A. and Franzén, L.-G. (1996). Identification, cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Implications for protein targeting and subunit interaction. *Eur. J. Biochem.* **237**, 792–799.
- Atteia, A., Dreyfus, G., and González-Halphen, D. (1997). Characterization of the alpha and beta-subunits of the F₀F₁-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 275–284.
- Atteia, A., van Lis, R., Wetterskog, D., Gutiérrez-Cirlos, E.B., Ongay-Larios, L., Franzén, L.G., and González-Halphen, D. (2003). Structure, organization and expression of the genes encoding mitochondrial cytochrome c₁ and the Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics* **268**, 637–644.
- Atteia, A., van Lis, R., Gelius-Dietrich, G., Adrait, A., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N., and Martin, W. (2006). Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 9909–9918.
- Barrientos, A., Korr, D., and Tzagoloff, A. (2002). Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J.* **21**, 43–52.
- Barros, M.H. and Tzagoloff, A. (2002). Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **516**, 119–123.
- Barros, M.H., Johnson, A., and Tzagoloff, A. (2004). COX23, a homologue of COX17, is required for cytochrome oxidase assembly. *J. Biol. Chem.* **279**, 31943–31947.
- Barros, M.H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J. Biol. Chem.* **280**, 42627–42635.
- Bartoli, C.G., Pastori, G.M., and Foyer, C.H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* **123**, 335–344.
- Baurain, D., Dinant, M., Coosemans, N., and Matagne, R.F. (2003). Regulation of the alternative oxidase *Aox1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the *Aox1* promoter. *Plant Physiol.* **131**, 1418–1430.
- Berthold, D.A., Andersson, M.E., and Nordlund, P. (2000). New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 241–254.

- Bonnefoy, N. and Fox, T.D. (2002). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Enzymol.* **350**, 97–111.
- Bousquet, I., Dujardin, G., and Slonimski, P.P. (1991). *ABC1*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: It suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc₁ complex. *EMBO J.* **10**, 2023–2031.
- Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1995). The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 423–436.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V., and Stuart, R.A. (2002). Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase forms homodimers. *J. Biol. Chem.* **277**, 48484–48489.
- Cardol, P., Matagne, R.F., and Remacle, C. (2002). Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **319**, 1211–1221.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R., and Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of the mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 212–224.
- 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 Physiol.* **137**, 447–459.
- Cardol, P., Lapaille, M., Minet, P., Matagne, R.F., Franck, F., and Remacle, C. (2006). ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus-encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for the activity and assembly of the enzyme. *Eukaryotic Cell* **5**, 1460–1467.
- Cardol, P., Boutaffala, L., Memmy, S., Devreese, B., Matagne, R.F., and Remacle, C. (2008). In *Chlamydomonas*, the loss of ND5 subunit prevents the assembly of whole mitochondrial complex I and leads to the formation of a low abundant 700 kD subcomplex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 388–396.
- Carlson, C.G., Barrientos, A., Tzagoloff, A., and Glerum, D.M. (2003). *COX16* encodes a novel protein required for the assembly of cytochrome oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 3770–3775.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2006). Bovine complex I is a complex of forty-five different subunits. *J. Biol. Chem.* **281**, 32724–32727.
- Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R.P., and Maklashina, E. (2002). Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 140–157.
- Claros, M.G. and Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–786.
- Claros, M.G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F.A., Popot, J.L., and Jacq, C. (1995). Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur. J. Biochem.* **228**, 762–771.
- Clifton, R., Millar, A.H., and Whelan, J. (2006). Alternative oxidases in *Arabidopsis*: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 730–741.

- Colin, M., Dorthu, M.P., Duby, F., Remacle, C., Dinant, M., Wolwertz, M.R., Duyckaerts, C., Sluse, F., and Matagne, R.F. (1995). Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome b of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 179–184.
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., and Walker, J.E. (1994). F₀ membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: Purification, subunit composition, and reconstitution with F₁-ATPase. *Biochemistry* **33**, 7971–7978.
- Crivellone, M.D. (1994). Characterization of *CBP4*, a new gene essential for the expression of ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 21284–21292.
- Cruciat, C.M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc₁ complex. *EMBO J.* **18**, 5226–5233.
- Daley, D.O., Clifton, R., and Whelan, J. (2002). Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10510–10515.
- Derzaph, K.L.M. and Weger, H.G. (1996). Immunological identification of the alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **32**, 621–623.
- Dibrov, E., Fu, S., and Lemire, B.D. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *TCM62* gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II). *J. Biol. Chem.* **273**, 32042–32048.
- Dieckmann, C.L. and Tzagoloff, A. (1985). Assembly of the mitochondrial membrane system. *CBP6*, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome b. *J. Biol. Chem.* **260**, 1513–1520.
- Dieckmann, C.L., Pape, L.K., and Tzagoloff, A. (1982). Identification and cloning of a yeast nuclear gene (*CBP1*) involved in expression of mitochondrial cytochrome b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1805–1809.
- Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B., and Matagne, R.F. (2001). Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **39**, 101–108.
- Do, T.Q., Hsu, A.Y., Jonassen, T., Lee, P.T., and Clarke, C.F. (2001). A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* *abc1* mutants. *J. Biol. Chem.* **276**, 18161–18168.
- Dorthu, M.P., Remy, S., Michel-Wolwertz, M.R., Colleaux, L., Breyer, D., Beckers, M.C., Englebert, S., Duyckaerts, C., Sluse, F.E., and Matagne, R.F. (1992). Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **18**, 759–772.
- Duby, F. and Matagne, R.F. (1999). Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*. *Plant Cell* **11**, 115–125.
- 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 Lett.* **579**, 5769–5772.
- Dupuis, A., Chevallet, M., Darrouzet, E., Duborjal, H., Lunardi, J., and Issartel, J.P. (1998). The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 147–165.
- Elhafez, D., Murcha, M.W., Clifton, R., Soole, K.L., Day, D.A., and Whelan, J. (2006). Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases

- in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression. *Plant Cell. Physiol.* **47**, 43–54.
- Ellis, T.P., Helfenbein, K.G., Tzagoloff, A., and Dieckmann, C.L. (2004). Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 15728–15733.
- Eriksson, M., Gardeström, P., and Samuelsson, G. (1995). Isolation, purification and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **107**, 479–483.
- Eubel, H., Jansch, L., and Braun, H.P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* **133**, 274–286.
- Fan, J. and Lee, R.W. (2002). Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: Two linear DNA molecules with homologous inverted repeat termini. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 999–1007.
- Felitti, S.A., Chan, R.L., Sierra, M.G., and Gonzalez, D.H. (2000). The cytochrome c gene from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, Structure and expression in wild-type cells and in obligate photoautotrophic (*dk*) mutants. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1149–1156.
- Finnegan, P.M., Ellis, T.P., Nagley, P., and Lukins, H.B. (1995). The mature AEP2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, required for the expression of subunit 9 of ATP synthase, is a 58 kDa mitochondrial protein. *FEBS Lett.* **368**, 505–508.
- Fisher, N., Bourges, I., Hill, P., Brasseur, G., and Meunier, B. (2004). Disruption of the interaction between the Rieske iron-sulfur protein and cytochrome b in the yeast bc₁ complex owing to a human disease-associated mutation within cytochrome b. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1292–1298.
- Franzén, L.G. and Falk, G. (1992). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol. Biol.* **19**, 771–780.
- Friedrich, T., Abelmann, A., Brors, B., Guenebaut, V., Kintscher, L., Leonard, K., Rasmussen, T., Scheide, D., Schlitt, A., Schulte, U., and Weiss, H. (1998). Redox components and structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 215–219.
- Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J., and Brethes, D. (2006). The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry* **45**, 6715–6723.
- Funes, S., Davidson, E., Claros, M.G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P., and González-Halphen, D. (2002a). 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.
- Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallon, S., Herion, P., King, M.P., and González-Halphen, D. (2002b). A green algal apicoplast ancestor. *Science* **298**, 2155.
- Funes, S., Nargang, F.E., Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2004). The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1853–1861.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S. et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498–511.

- Gfeller, R.P. and Gibbs, M. (1984). Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol.* **75**, 212–218.
- Glaser, E. and Dessi, P. (1999). Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc₁ complex in plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 259–274.
- Gledhill, J.R. and Walker, J.E. (2005). Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **386**, 591–598.
- Glerum, D.M. and Tzagoloff, A. (1994). Isolation of a human cDNA for heme A: farnesyltransferase by functional complementation of a yeast *cox10* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8452–8456.
- Golden, T.R. and Pedersen, P.L. (1998). The oligomycin sensitivity conferring protein of rat liver mitochondrial ATP synthase: arginine 94 is important for the binding of OSCP to F₁. *Biochemistry* **37**, 13871–13881.
- Goyal, A. and Tolbert, N.E. (1989). Variations in the alternative oxidase in *Chlamydomonas* grown in air or high CO₂. *Plant Physiol.* **89**, 958–962.
- Gray, M.W. and Boer, P.H. (1988). Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **319**, 135–147.
- Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., and Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105–112.
- Hamanaka, S., Ohtsu, K., Kadowaki, K., Nakazono, M., and Hirai, A. (1999). Identification of cDNA encoding cytochrome c oxidase subunit 5c (COX5c) from rice: Comparison of its expression with nuclear-encoded and mitochondrial-encoded COX genes. *Genes Genet. Syst.* **74**, 71–75.
- He, S. and Fox, T.D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: Distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1449–1460.
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A., and Millar, A.H. (2003). Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: Orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1604**, 159–169.
- Helfenbein, K.G., Ellis, T.P., Dieckmann, C.L., and Tzagoloff, A. (2003). *ATP22*, a nuclear gene required for expression of the F₀ sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 19751–19756.
- Helmerhorst, E.J., Stan, M., Murphy, M.P., Sherman, F., and Oppenheim, F. G. (2005). The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion* **5**, 200–211.
- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2003). Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**, 219–225.
- Hinchliffe, P. and Sazanov, L.A. (2005). Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771–774.
- Hommersand, M.H. and Thimann, K.V. (1965). Terminal respiration of vegetative cells and zygospores in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **40**, 1220–1227.
- Hong, Y.C., Cobine, P.A., Maxfield, A.B., Carr, H.S., and Winge, D.R. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 35334–35340.

- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F_1 -ATPase. *Nature* **427**, 465–468.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* **281**, 64–71.
- Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* **9**, 357–368.
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Hsieh, E.J., Wu, M., Barros, M.H., Clarke, C. F., and Tzagoloff, A. (2005). *COQ9*, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 31397–31404.
- Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R.E., and Pardo, J.P. (2006). The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS J.* **273**, 4603–4615.
- Ko, Y.H., Hullihen, J., Hong, S., and Pedersen, P.L. (2000). Mitochondrial F_0F_1 ATP synthase. Subunit regions on the F_1 motor shielded by F_0 , functional significance, and evidence for an involvement of the unique F_0 subunit F_6 . *J. Biol. Chem.* **275**, 32931–32939.
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., and Merchant, S. (1998). Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: Three distinct systems. *Mol. Microbiol.* **29**, 383–396.
- Kreuzberg, K. (1984). Starch fermentation via formate producing pathway *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorogonium elongatum*, and *Chlorella fusca*. *Plant Physiol.* **61**, 87–94.
- Krimm, I., Gans, P., Hernandez, J.F., Arlaud, G.J., and Lancelin, J.M. (1999). A coil-helix instead of a helix-coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **265**, 171–180.
- Kuffner, R., Rohr, A., Schmiede, A., Krull, C., and Schulte, U. (1998). Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **283**, 409–417.
- Lancelin, J.M., Bally, I., Arlaud, G.J., Blackledge, M., Gans, P., Stein, M., and Jacquot, J.P. (1994). NMR structures of ferredoxin chloroplastic transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii* promoted by trifluoroethanol in aqueous solution. *FEBS Lett.* **343**, 261–266.
- Lancelin, J.M., Gans, P., Bouchayer, E., Bally, I., Arlaud, G.J., and Jacquot, J.P. (1996). NMR structures of a mitochondrial transit peptide from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **391**, 203–208.
- Leary, S.C., Kaufman, B.A., Pellicchia, G., Guercin, G.H., Mattman, A., Jaksch, M., and Shoubridge, E.A. (2004). Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1839–1848.
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P.P., and di Rago, J.P. (2001). Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial $F(1)$ -ATPase in heat stress conditions. *J. Biol. Chem.* **276**, 6789–6796.
- Lemire, B.D. and Oyedotun, K.S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 102–116.

- Lown, F.J., Watson, A.T., and Purton, S. (2001). *Chlamydomonas* nuclear mutants that fail to assemble respiratory or photosynthetic electron transfer complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 452–455.
- Luttik, M.A., Overkamp, K.M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* **273**, 24529–24534.
- Marques, I., Duarte, M., Assuncao, J., Ushakova, A.V., and Videira, A. (2005). Composition of complex I from *Neurospora crassa* and disruption of two “accessory” subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1707**, 211–220.
- Marres, C.A., de Vries, S., and Grivell, L.A. (1991). Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 857–862.
- Matagne, R.F., Michel-Wolwertz, M.R., Munaut, C., Duyckaerts, C., and Sluse, F. (1989). Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell. Biol.* **108**, 1221–1226.
- Matsuo, M. and Obokata, J. (2006). Remote control of photosynthetic genes by the mitochondrial respiratory chain. *Plant J.* **47**, 873–882.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8271–8276.
- McEwen, J.E., Hong, K.H., Park, S., and Preciado, G.T. (1993). Sequence and chromosomal localization of two PET genes required for cytochrome c oxidase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **23**, 9–14.
- McGraw, P. and Tzagoloff, A. (1983). Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of a yeast nuclear gene involved in the processing of the cytochrome b pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **258**, 9459–9468.
- Meyer, E.H., Taylor, N.L., and Millar, A.H. (2008). Resolving and Identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis. *J. Proteome Res.* **7**, 786–794.
- Michaelis, G., Vahrenholz, C., and Pratje, E. (1990). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: The gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 211–216.
- Michalecka, A.M., Svensson, A.S., Johansson, F.I., Agius, S.C., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S., and Rasmusson, A.G. (2003). *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* **133**, 642–652.
- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., and Foyer, C.H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol.* **133**, 443–447.
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L., Kristensen, B.K., Braun, H.P., and Møller, I.M. (2005). The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* **10**, 36–43.
- Molen, T.A., Rosso, D., Piercy, S., and Maxwell, D.P. (2006). Characterization of the alternative oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to oxidative stress and a shift in nitrogen source. *Physiol. Plant.* **127**, 174–186.
- Moller, I.M., Rasmusson, A.G., and Fredlund, K.M. (1993). NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductases in plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 377–384.
- Mus, F., Cournac, L., Cardellini, V., Caruana, A., and Peltier, G. (2005). Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1708**, 322–332.

- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863–917.
- Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., and Tzagoloff, A. (1992). *BCS1*, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**, 3821–3829.
- Nobrega, M.P., Bandeira, S.C., Beers, J., and Tzagoloff, A. (2002). Characterization of *COX19*, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **277**, 40206–40211.
- Nurani, G. and Franzén, L.-G. (1996). Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1105–1116.
- Nurani, G., Eriksson, M., Knorpp, C., Glaser, E., and Franzen, L.-G. (1997). Homologous and heterologous protein import into mitochondria isolated from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 973–980.
- Ogata, K. and Volini, M. (1990). Mitochondrial rhodanese: Membrane-bound and complexed activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 8087–8093.
- Ogilvie, I., Kennaway, N.G., and Shoubridge, E.A. (2005). A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J. Clin. Invest.* **115**, 2784–2792.
- Ostergaard, J., Persiau, G., Davey, M.W., Bauw, G., and Van Montagu, M. (1997). Isolation of a cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**, 30009–30016.
- Parisi, G., Perales, M., Silvina Fornasari, M., Colaneri, A., Gonzalez-Schain, D., Gomez-Casati, D., Zimmermann, S., Brennicke, A., Araya, A., Ferry, J.G., Echave, J., and Zabaleta, E. (2004). Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* **55**, 193–207.
- Payne, M.J., Schweizer, E., and Lukins, H.B. (1991). Properties of two nuclear *pet* mutants affecting expression of the mitochondrial *oli1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **19**, 343–351.
- Peltier, G. and Cournac, L. (2002). Chlororespiration. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**, 523–550.
- Perales, M., Eubel, H., Heinemeyer, J., Colaneri, A., Zabaleta, E., and Braun, H.P. (2005). Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I + III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *J. Mol. Biol.* **350**, 263–277.
- Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., Tolkunova, E., Funes, S., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P., and González-Halphen, D. (2000). Unusual location of a mitochondrial gene, Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. *J. Biol. Chem.* **275**, 30144–30152.
- Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P., and González-Halphen, D. (2001). Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J. Biol. Chem.* **276**, 11302–11309.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U.G., and Melkonian, M. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist* **152**, 265–300.

- Radermacher, M., Ruiz, T., Clason, T., Benjamin, S., Brandt, U., and Zickermann, V. (2006). The three-dimensional structure of complex I from *Yarrowia lipolytica*: A highly dynamic enzyme. *J. Struct. Biol.* **154**, 269–279.
- Raghavendra, A.S. and Padmasree, K. (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* **8**, 546–553.
- Remacle, C., Baurain, D., Cardol, P., and Matagne, R.F. (2001). Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I. Characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics* **158**, 1051–1060.
- Remacle, C., Gloire, G., Cardol, P., and Matagne, R. (2004). Impact of a mutation in the mitochondrial LSU rRNA gene from *Chlamydomonas reinhardtii* on the activity and the assembly of respiratory-chain complexes. *Curr. Genet.* **45**, 323–330.
- Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M., and Bonnefoy, N. (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4771–4776.
- Reyes-Prieto, A., El-Hafidi, M., Moreno-Sánchez, R., and González-Halphen, D. (2002). Characterization of oxidative phosphorylation in the colorless chlorophyte *Polytomella* sp. Its mitochondrial respiratory chain lacks a plant-like alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1554**, 170–179.
- Rizzuto, R., Sandona, D., Brini, M., Capaldi, R.A., and Bisson, R. (1991). The most conserved nuclear-encoded polypeptide of cytochrome c oxidase is the putative zinc-binding subunit: primary structure of subunit V from the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**, 100–104.
- Rodel, G. (1986). Two yeast nuclear genes, *CBS1* and *CBS2*, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr. Genet.* **11**, 41–45.
- Saracco, S.A. and Fox, T.D. (2002). Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1122–1131.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488–1493.
- Sazanov, L.A., Burrows, P.A., and Nixon, P.J. (1998). The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: Isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1319–1324.
- Sazanov, L.A., Carroll, J., Holt, P., Toime, L., and Fearnley, I.M. (2003). A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* **278**, 19483–19491.
- Schönfeld, C., Wobbe, L., Borgstadt, R., Kienast, A., Nixon, P.J., and Kruse, O. (2004). The nucleus-encoded protein MOC1 is essential for mitochondrial light acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **279**, 50366–50374.
- Shi, G., Crivellone, M.D., and Edderkaoui, B. (2001). Identification of functional regions of Cbp3p, an enzyme-specific chaperone required for the assembly of ubiquinol-cytochrome c reductase in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1506**, 103–116.
- Shrager, J., Hauser, C., Chang, C.W., Harris, E.H., Davies, J., McDermott, J., Tamse, R., Zhang, Z., and Grossman, A.R. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii*

- genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.* **131**, 401–408.
- Siendones, E., González-Reyes, J.A., Santos-Ocana, C., Navas, P., and Córdoba, F. (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono- γ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol.* **120**, 907–912.
- Sluse, F.E., Jarmuszkiewicz, W., Navet, R., Douette, P., Mathy, G., and Sluse-Goffart, C.M. (2006). Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 480–485.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**, 1455–1464.
- Sunderhaus, S., Dudkina, N.V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2006). Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *J. Biol. Chem.* **281**, 6482–6488.
- Taanman, J.W. and Capaldi, R.A. (1992). Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 22481–22485.
- Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* **1660**, 171–199.
- Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2004). Atp10p assists assembly of Atp6p into the F₀ unit of the yeast mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* **279**, 19775–19780.
- 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., González-Halphen, D., and Atteia, A. (2005). Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta* **1708**, 23–34.
- van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G., and Atteia, A. (2007). New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **144**, 1190–1199.
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Reyes-Prieto, A., Remacle, C., and 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. Biomembr.* **38**, 271–282.
- Velours, J. and Arselin, G. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 383–390.
- Velours, J., Spannagel, C., Chaignepain, S., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V., Velours, G., and Camougrand, N. (1998). Topography of the yeast ATP synthase F₀ sector. *Biochimie* **80**, 793–801.
- Videira, A. and Duarte, M. (2002). From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 187–191.
- Vogel, R.O., Smeitink, J.A., and Nijtmans, L.G. (2007). Human mitochondrial complex I assembly: A dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 1215–1227.

- von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**, 535–545.
- Walker, J.E. and Dickson, V.K. (2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 286–296.
- Wang, Z.G., White, P.S., and Ackerman, S.H. (2001). Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F₁-ATPase in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 30773–30778.
- Weger, H.G., Chadderton, A.R., Lin, M., Guy, R.D., and Turpin, D.H. (1990). Cytochrome and alternative pathway respiration during transient ammonium assimilation by N-limited *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **94**, 1131–1136.
- Yanamura, W., Zhang, Y.Z., Takamiya, S., and Capaldi, R.A. (1988). Tissue-specific differences between heart and liver cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **27**, 4909–4914.