



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

INTERACCION DE LAS SUBUNIDADES ASA2,
ASA4 Y ASA7 DE LA ATP SINTASA
MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA
POLYTOMELA SP.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

EDITH ARACELI CANO ESTRADA

TUTOR: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

MÉXICO, D. F.

AGOSTO/2012



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.

INTERACCIÓN DE LAS SUBUNIDADES ASA2, ASA4 Y ASA7 DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA *POLYTOMELLA SP.*

RECONOCIMIENTOS

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

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo del proyecto estuvo formado por:

Dr. Diego González Haphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Heliodoro Celis Sandoval	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Georgina Garza Ramos	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Stephan Wilkens del Departamento de Bioquímica de Upstate University of Syracuse, New York, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de microscopía electrónica para la obtención de un modelo tridimensional de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*

Se reconoce la asesoría del Dr. Lenin Domínguez para los experimentos in silico de anclaje que permitió obtener un modelo estructural de la interacción de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7.

Se reconoce la asesoría técnica de Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo en los experimentos bioquímicos y en la obtención de los anticuerpos usados en este proyecto.

Se reconoce la asesoría técnica de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en la secuenciación de los genes y la síntesis de oligonucleótidos utilizados en este proyecto.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (donativo 128110) y DGAPA-UNAM (donativo IN203311-3). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (No. becario 214946) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	IFC, UNAM
Vocal	Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

El Instituto de Fisiología Celular de la UNAM se convirtió en mi casa durante seis años de trabajo. Durante este tiempo este lugar fue testigo de inmensas alegrías, en ocasiones de tristezas que a veces llegaron a convertirse en llanto, de desesperación al ver que todo el esfuerzo de cada experimento no cosechaba frutos, y de cómo después de cada frustración volvían a mí las ilusiones para empezar una nueva estrategia. No olvidaré ese nerviosismo en cada seminario o cada examen tutorial. Todas estas experiencias serán inolvidables, porque formaron parte importante de mi formación tanto personal como profesional, me enseñaron a ser más fuerte y a afrontar cada reto que se atravesara en mi camino, me enseñaron a no darme por vencida ante la mínima adversidad.

Aquí también conocí admirables personas de quienes traté de aprender todo lo que me fuera posible. También hice entrañables amigos, con quienes siempre podía contar ante alguna adversidad y por que no, a la hora de las fiestas. Y como en todo lugar, también encontré personas con las que no congenie muy bien, pero de quienes también aprendí a ser tolerante, paciente, admitir mis errores y corregir mis errores.

Por todo eso agradezco a la UNAM y al IFC por ser parte importante de mi formación bajo el espíritu universitario, por darme la oportunidad de crecer y madurar.

Este trabajo es el fruto de todo ese tiempo invertido. En este trabajo no sólo se ve reflejado mi esfuerzo y mi dedicación, sino el de varias personas que confiaron en mí y me ayudaron a llevarlo a buen término. Por eso agradezco:

Al Dr. Diego González Halphen por confiar en mí, por su sabiduría, por sus enseñanzas, por sus consejos, y por todo el apoyo brindado durante todos estos seis años que estuve dando lata en su laboratorio. De todo corazón muchas gracias!

*Al Dr. Stephan Wilkens de Upstate University of Syracuse New York por todo su apoyo, su paciencia, su ayuda y su tiempo invertido en la elaboración del modelo tridimensional de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* Sinceramente Muchas gracias!*

Al Dr. Lenin Domínguez por todo su interés demostrado, su infinita ayuda y su dedicación en la obtención del modelo estructural del subcomplejo de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7. Muchas gracias por todas sus enseñanzas en bioinformática!.

*A los miembros de mi comité tutor: **Dra. Georgina Garza Ramos** y **Dr. Heliodoro Celis Sandoval** por todos sus consejos, observaciones y hasta en ocasiones regaños que me hicieron crecer como investigadora y llevar a buen término el trabajo experimental.*

*A la Técnico del laboratorio: **QBP. Miriam Vázquez Acevedo** por su apoyo y su asesoría brindada y por estar siempre al pendiente del laboratorio.*

*Al auxiliar del laboratorio **Sr. Alfredo Octaviano Sánchez** por su gran entrega en su labor diaria. Muchas gracias por sus apoyos ocasionales con el autoclave o con las centrifugas y por estar siempre dispuesto a ayudar.*

*A todos los miembros del laboratorio 322N: A su técnico **Blanca Delgado**, a **Chava**, a **Victor**, a **Luis Pablo** (alias Harry), a **Pau1** y a **Pau2** por todo su apoyo brindado, en especial con el préstamo de las cámaras de electroforesis, la cámara de transferencia y la columna de níquel de 1mL. Sin su ayuda no estuviera escribiendo esta tesis en este momento.*

*A todos los miembros del laboratorio 325N, en especial a su técnico **Dra. Norma** por el uso del sonicador y por los préstamos de reactivos; y a **Miguel** por su ayuda en la elaboración de construcciones bicistrónicas.*

*A **Angela Downy** por su gran ayuda e interés en montar la técnica de las co-purificaciones durante su primera rotación de la Licenciatura en Biomédicas.*

*A todos mis compañeros del laboratorio, que sin excepción colaboraron en gran parte al desarrollo de este trabajo. Muchas gracias **Alexa** por tu apoyo con las polytomellas, por tener todo ordenado, por todos esos deliciosos postres y todos esos ratos amenos en el laboratorio. Muchas Gracias **Elizabeth** por compartir tu experiencia en biología molecular que fueron de gran ayuda para el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias **Paco** por las amenas charlas y por hacerme compañía virtual y física durante mi estancia en Syracuse. Muchas gracias **Ale** por ser como eres, por tu amistad, por compartir todos esos buenos momentos en el laboratorio, y todas esas tardes en el comedor de veterinaria. Muchas gracias **Héctor** por tu ayuda en las purificaciones y por que juntos hicimos un gran equipo para desarrollar este gran proyecto sobre las ASAs. Muchas gracias **Valentín** por ayudar siempre que se necesita y por esas tardes-noches cheleras muy útiles*

para desestresarse. Muchas gracias **Alain** por tus críticas que ayudaron a desarrollar positivamente este proyecto. Muchas gracias **Diana** y **Lili** por el compañerismo y alegrías. Finalmente Muchas gracias a **Adelma** y **Lorena** que en su momento formaron parte del laboratorio.

A **mi familia** por su comprensión, tolerancia y por brindarme todo su apoyo desde el momento que decidí emprender esta nueva gran aventura.

A **Isidro Cruz** por compartir su tiempo conmigo entre pipetas, *E. coli* y proteínas ASAs

A **mis amigos**, en especial a Victor Absalon por su apoyo recibido en su momento.

Finalmente a los **miembros del jurado de examen** por su tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

CONTENIDO

Resumen.	1
Abstract.	3
Abreviaturas.	5
Introducción.	8
1. Las ATPasas y las ATP sintasas.	9
2. La estructura de la F1-Fo ATPasa o ATP sintasa.	11
3. El estator de la ATP sintasa mitocondrial.	13
4. La función de la ATP sintasa.	15
5. La microscopía electrónica como herramienta del estudio estructural de la ATP sintasa mitocondrial.	18
6. Las algas clorofíceas.	19
7. La ATP sintasa de las algas clorofíceas.	21
8. Las características de las subunidades ASA.	23
Antecedentes inmediatos.	26
Planteamiento del problema.	29
Hipótesis.	31
Objetivo.	32
Objetivos particulares.	33
Resultados.	34
1. Las secuencias de las subunidades que componen a la ATP sintasa del alga <i>Polytomella sp.</i>	35
2. La estequiometría de las subunidades de la ATP sintasa del alga <i>Polytomella sp.</i>	37
3. Interacción de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7.	40
3.1 Diseño de las subunidades ASA4 y ASA7 truncas.	40
3.2 Clonación de los genes, expresión y purificación de las proteínas recombinantes.	41
3.3 Dicroísmo circular.	44
3.4 Co-purificaciones.	46
3.4.1 Co-purificación de las subunidades ASA4 y ASA7.	47
3.4.2 Co-purificación de las subunidades ASA2 y ASA7.	50
3.4.3 Co-purificación de las subunidades ASA2 y ASA4.	52
4. Modelo estructural de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 del alga	54

<i>Polytomella sp.</i>	
5. Estudios de anclaje con los modelos de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7.	56
6. Modelo tridimensional de la ATP sintasa del alga <i>Polytomella sp.</i>	58
7. Sobreposición del modelo estructural del brazo periférico dentro del modelo 3D de la ATP sintasa del alga <i>Polytomella sp.</i>	63
Discusión	65
Conclusión	73
Perspectivas	76
Materiales y métodos	78
1. Purificación de la ATP sintasa del alga <i>Polytomella sp.</i>	79
2. Marcaje de los residuos de cisteínas con reactivos fluorescentes.	79
3. Estudio de microscopía electrónica.	80
4. Clonación de los genes de las subunidades ASA de la ATP sintasa del alga <i>Polytomella sp.</i>	81
4.1 Reacción en cadena de la polimerasa.	81
4.2 Preparación de las células competentes.	82
4.3 Clonación en el vector pGEM T-easy.	83
4.4 Extracción del ADN plasmídico por el método de fenol-cloroformo.	83
5. Clonación de los genes de las subunidades de interés en vectores de expresión.	84
6. Expresión de las subunidades.	85
7. Purificación de las subunidades.	85
7.1. Dicroísmo circular.	86
8. Co-purificación de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7.	87
Bibliografía.	89
Anexo I: Cebadores.	98
Anexo II: Secuencias reportadas.	103
Anexo III: Alineamientos de las subunidades ASA2, ASA4, ASA7 y OSCP.	109
Anexo IV: Amortiguadores.	116
Anexo V: Artículos publicados.	125
The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of <i>Polytomella sp.</i> is dimeric.	
Subunits-Subunits interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of <i>Polytomella sp.</i>	

La F₁-F_o ATP sintasa y sus diferencias estructurales.

Artículo en preparación: interaction of the three ASA subunits in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophicean Alga *Polytomella sp.*

RESUMEN

La ATP sintasa mitocondrial del linaje de las algas clorofíceas, presenta una estructura atípica. Esta diferencia estructural se debe a la presencia de nueve subunidades llamadas ASA, que sustituyen estructural y funcionalmente a las subunidades clásicas que forman el estator de la ATP sintasa mitocondrial ortodoxa. Por lo tanto, este complejo enzimático solo presenta homólogos de las subunidades catalíticas α y β , de los componentes del rotor (subunidades γ , δ , ϵ y c), y de los componentes del estator (subunidades a y OSCP).

Estudios de entrecruzamientos y de disociación por calor de la enzima llevaron a proponer un arreglo topológico de las subunidades ASA, sugiriendo que las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7, unidas a la subunidad OSCP, forman el brazo periférico de la enzima. Según estudios de estequiometría, llevados a cabo en este trabajo, una sola copia de estas proteínas y del resto de las subunidades ASA parecen formar la estructura del estator.

La presente investigación se enfoca en el estudio de la interacción de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 con el fin de proponer un modelo estructural del brazo periférico de la enzima del alga clorofícea *Polytomella sp.* Para lograr esto, se clonaron los genes que codifican para estas tres proteínas en dos diferentes vectores de expresión. Además, se diseñaron proteínas truncas para estudiar la región de interacción entre estas subunidades. Todas las proteínas se expresaron en el sistema bacteriano *E.coli*; y se realizaron experimentos de co-purificación para investigar la interacción de las proteínas recombinantes. Se lograron obtener exitosamente las regiones de mayor interacción de las proteínas para la formación de los subcomplejos ASA2-ASA4, ASA2-ASA7 y ASA4-ASA7. Por último, utilizando un programa de anclaje se propuso un modelo estructural parcial del brazo periférico.

Adicionalmente, se obtuvo un modelo tridimensional preliminar del dímero de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* con base en imágenes de microscopía electrónica, donde fue posible sobreponer el modelo del brazo periférico obtenido.

ABSTRACT

The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae has an atypical structure. This structural difference is due to the presence of nine subunits named ASA. These subunits replace the classic subunits that form the orthodox stator of the mitochondrial ATP synthase, both structurally and functionally. Therefore, the homologous subunits found in this complex are the catalytic subunits α and β , the rotor components (γ , δ , ϵ and c subunits) and subunits a and OSCP.

Recent cross-linking and thermal dissociation studies of the enzyme led to the proposal of a topological arrangement of the ASA subunits, suggesting that ASA2 ASA4 and ASA7 subunits bind OSCP subunit to form a section of the peripheral stalk of the enzyme. According to stoichiometry studies, carried out in this work, a single copy of these proteins and the other ASA subunits form this peripheral stalk.

This research focuses on the interaction subunits ASA2, ASA4 and ASA7 in order to propose a structural model of the peripheral stalk of the enzyme from the chlorophycean alga *Polytomella sp.* To accomplish this, the genes for these proteins were cloned in two different expression vectors. Furthermore, truncated proteins were designed to study the interacting regions of these subunits. All proteins were expressed in the *E.coli* bacterial system, and co-purification experiments were performed to investigate the interaction of the recombinant proteins. The main interaction regions of the proteins in the subcomplexes ASA2-ASA4, ASA2-ASA7 and ASA4-ASA7 were characterized. Also, a partial structural model of the peripheral stalk was proposed, using a docking program.

In addition, a preliminary three-dimensional model of the ATP synthase dimer from *Polytomella sp.* was obtained based on electron microscopy images, and the structural model of the peripheral stalk was fitted on it.

ABREVIATURAS.

ADN	Acido desoxiribonucleico.
ADP	Adenosín difosfato (Difosfato de adenosina).
APS	Siglas en inglés de Persulfato de Amonio.
ARN	Ácido ribonucleico.
ASA	Siglas en inglés de proteína asociada a la ATP sintasa.
ASA4N	Región amino terminal de la proteína asociada a la ATP sintasa 4.
ASA4C	Región carboxilo terminal de la proteína asociada a la ATP sintasa 4.
ASA7N	Región amino terminal de la proteína asociada a la ATP sintasa 7.
ASA7C	Región carboxilo terminal de la proteína asociada a la ATP sintasa 7.
ATP	Adenosín trifosfato (Trifosfato de adenosina).
BCIP	5-bromo 4-cloro 3 indol fosfato.
cDNA	Cadena complementaria de ADN.
DC	Dicroísmo circular.
DEAE	Dietil-aminoetil dextrán.
DMF	Dimetilformamida.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
dNTP	Desoxinucleotidos trifosfatados.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etildiamiltetracético.
EST	Siglas en inglés de etiqueta de una secuencia expresada.
FADH	Flavín adenín dinucleótido (reducido).
FPLC	Siglas en inglés de cromatografía rápida de fase liquida de proteínas.
GRAMM	Siglas en inglés de rango global de marcajes moleculares.
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido.
LM	n-dodecil- β -D-maltósido.
MASAP	Siglas en inglés de proteina asociada a la ATP sintasa mitocondrial.

NADH	Nicotínamida adenín dinucleótido (reducido).
NBT	Nitroazul de tetrazolio.
OSCP	Siglas en inglés de proteína que confiere resistencia a la oligomicina.
Pb	Pares de bases.
PCR	Siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa.
PDB	Siglas en inglés de Banco de datos de proteínas.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RNAse	Nucleasa del ácido ribonucleico.
SDS-PAGE	Siglas en inglés electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sodio.
TEMED	Tetrametiletenodiamina.
TLCK	N- α -L-Tosil lisina clorometil cetona.
UTR	Siglas en inglés de las regiones no traducidas del RNA mensajero.
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3- β -indolil- β -D-galactopiranosido.
5-IAF	5- iodoacetoimida.
6HIS	Etiqueta de hexa-histidinas.

INTRODUCCIÓN

1. Las ATPasas y las ATP sintasas

Las adenosín trifosfatasa (ATPasas) son complejos enzimáticos esenciales para la vida. Existen tres familias de ATPasas que están ampliamente distribuidas en todos los seres vivos: las A, las V y las F-ATPasas (Figuras 1). Se les consideran motores rotatorios moleculares que tienen en común utilizar un gradiente electroquímico de iones para la síntesis o hidrólisis del ATP. Los tres tipos de ATPasas provienen de un ancestro común, una bomba de protones que evolucionó en una ATP sintasa (Gogarten y cols. 1989, Nelson y Taiz 1989); es decir, en un complejo enzimático capaz de llevar a cabo la síntesis de ATP en condiciones aeróbicas. A su vez, esta enzima se convirtió posteriormente en una bomba de protones dentro de las vacuolas de las células eucariontes, llevando a cabo solamente la hidrólisis de ATP.

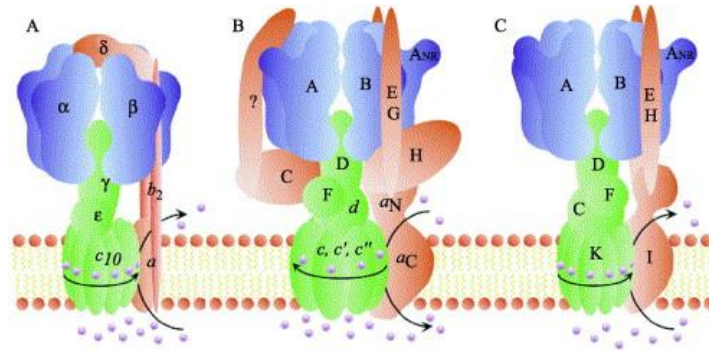


Figura1. Estructura de los diferentes tipos de ATPasas. **A)** Estructura de la familia de las F-ATPasas, se muestra la estructura más sencilla de esta familia, la ATP sintasa bacteriana. **B)** Estructura de la familia de las V-ATPasas, donde destaca la presencia de tres brazos periféricos. **C)** Estructura de la familia de las A-ATPasas, estructuralmente más parecidas a la familia de las V-ATPasa, aunque con la presencia de dos brazos periféricos. (Tomada de Wilkens 2005).

Estructuralmente los tres tipos de ATPasas se dividen en dos dominios: uno hidrofílico llamado A_1 , V_1 o F_1 y otro hidrofóbico llamado A_o , V_o o F_o , respectivamente (Alfonzo y cols., 1981, Coskun y cols. 2004b); por lo que también es común nombrar al complejo enzimático como A_1A_o -ATPasa, V_1V_o -ATPasa y F_1F_o -ATPasa. En todas ellas el dominio hidrofílico se une al dominio membranal por dos tallos, un central y otro periférico llamado también estator. Las subunidades catalíticas se encuentran en el sector soluble (A_1 , V_1 y F_1) y en el sector membranal (A_o , V_o y F_o) se lleva a cabo la translocación de protones.

Las ATPasas tipo A son exclusivas del reino Archea. Estructuralmente son más cercanas a las V-ATPasas (Denda y cols. 1988), pero funcionalmente son más parecidas a las F-ATPasas (Grüber y cols. 2001, Müller y Grüber 2003). Aunque pueden llevar a cabo tanto la

síntesis como la hidrólisis de ATP, *in vivo* funcionan como ATP sintasas. El dominio A₁ lo componen las subunidades A₃, B₃, D, E₂, F y H₂, de las cuales A y B son las subunidades catalíticas que se alternan entre sí para formar un hetero-hexámero en cuya cavidad penetra parte de la subunidad D que forma el tallo central junto con la subunidad F. El brazo periférico de la enzima lo forma un complejo hetero-dimérico de las subunidades E y H. El dominio A₀ lo forman las subunidades C, I y K_x. Multicopias de la subunidad K forman un anillo proteolipídico. La región carboxilo terminal (C-terminal) de la subunidad I se encuentra anclado a la membrana y el dominio amino-terminal (N-terminal) se encuentra orientado hacia el citosol. La subunidad C se encarga de unir al anillo membranal con el tallo central. El conocimiento de este complejo enzimático es limitado dado la dificultad de obtener grandes cantidades de enzima pura y también debido a su inestabilidad.

Las V ATPasas se localizan en las membranas plasmáticas de arqueobacterias, y en una variedad de compartimentos celulares como vacuolas, lisosomas, endosomas y vesículas sinápticas (Finbow y Harrison 1997). Su función es únicamente de ATPasa y está involucrada en diversas funciones como el tráfico de proteínas, la endocitosis de receptores y la liberación de neurotransmisores. En organismos superiores su presencia en células especializadas es importante para la acidificación del túbulo renal y para la absorción de calcio en el hueso. Un deficiente funcionamiento de esta enzima provoca enfermedades tales como osteoporosis, gastritis, diabetes y cáncer. El sector V₁ lo componen las subunidades A₃, B₃, C, D, E₃, F, G₃ y H (Arai y cols. 1988, Xu y cols. 1999). El sector V₀ lo componen las subunidades a, (c, c')₄₋₆, c'', d y e. La hidrólisis del ATP se lleva a cabo en las subunidades catalíticas A y B. El tallo central de la enzima está compuesto por las subunidades D, F y d. El anillo de proteolípidos lo forman las subunidades c, c' y c'' que son el doble del tamaño respecto a su contraparte en las F-ATPasas, resultado de una fusión genética (Wilkens 2005). La presencia de al menos dos brazos periféricos en el complejo enzimático han sido reportados (Boekema y cols. 1999, Wilkens y cols. 1999, 2004); cada uno está formado por las subunidades E y G. Basado en una comparación de secuencia, la ATPasa tipo V es un producto de la transferencia horizontal de genes de las arqueas (Wilkens 2005). La actividad de las V-ATPasas se encuentra muy regulada e involucra un proceso reversible de disociación único en este tipo de ATPasas (Kane 1995). Por lo tanto se ha sugerido que existen subunidades exclusivas para llevar a cabo este mecanismo de disociación, que no presentan similitud con las subunidades de las ATPasas tipo F.

Las ATPasas tipo F se localizan en la membrana plasmática de las bacterias, en la membrana interna mitocondrial y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos. Además de llevar a cabo la función de ATP sintasa, también pueden llevar a cabo la función de ATPasa. La energía para llevar a cabo la catálisis proviene de la cadena de transporte de electrones donde están involucrados complejos enzimáticos que bombean protones (H^+) para generar un gradiente electroquímico. La estructura general de este complejo enzimático es muy parecida a la familia de las A y V-ATPasas, aunque sus subunidades no están muy conservadas. Esta familia de ATPasas, específicamente la ATP sintasa mitocondrial, es de nuestro interés para el desarrollo de este trabajo por lo que su estructura se describirá con detalle más adelante.

Un cuarto tipo de ATPasa son las P-ATPasas. Sin embargo, éstas no están relacionadas evolutivamente con las anteriores. Estas ATPasas están involucradas en el transporte de cationes: calcio, sodio, potasio y algunos metales como cobre a través de las membranas biológicas. La ATPasa de Na^+/K^+ y Ca^{++} son las más estudiadas y participan en el balance de electrolitos y fluidos y en la relajación del músculo.

2. La estructura de la F₁-F_o ATPasa o ATP sintasa

La ATP sintasa es un complejo enzimático altamente conservado a lo largo de la evolución, pues se encuentra en casi todos los organismos vivos; desde procariontes como las bacterias, hasta organismos eucariontes como las plantas y los mamíferos.

La ATP sintasa bacteriana se encuentra anclada en la membrana plasmática. La componen ocho subunidades α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , a , b_2 , y c (Figura 2). El dominio F1 es el dominio catalítico, globular e hidrofílico; y está compuesto por las subunidades catalíticas α y β que son homólogas de las subunidades catalíticas A y B de la familia de las A y V-ATPasas; de la misma manera forman un hetero-hexámero y en su cavidad se localiza parte de la subunidad γ y que se extiende hasta la periferia de la membrana donde interactúa con la subunidad ϵ . Esta última subunidad es la encargada de regular la síntesis e hidrólisis de ATP en el complejo (Tsunoda y cols. 2001, Bulygin y cols. 2004). Una nueva subunidad inhibitoria de 11kDa, diferente a ϵ , se ha encontrada en *Paracoccus denitrificans* y el resto de las α -proteobacterias, ésta se denomina ζ (Morales_Ríos y cols. 2010). La subunidad δ también forma parte del dominio F1 y se encuentra en la parte de la enzima más alejada de la membrana, interactuando con la subunidad α (Wilkens y cols. 2005). El dominio F_o, que es el

dominio membranaral, lo componen las subunidades a , b_2 , y c . La subunidad c forma un anillo proteolipídico, aunque la cantidad de subunidades que forman este anillo varía de una especie a otra. Hay evidencia que en la bacteria *E.coli* está compuesto por 10 subunidades c (Jiang y cols. 2001). El tallo periférico o estator de la enzima lo forma un dímero de subunidades b . Su región N-terminal se inserta en la membrana, mientras que su región C-terminal se une a la subunidad δ (Dmitriev y cols. 1999, Dunn y cols. 1998).

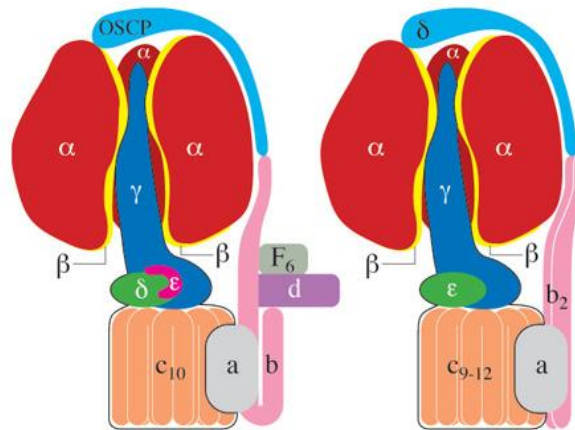


Figura 2. Comparación de las subunidades que componen a la ATP sintasa de las bacterias y ATP sintasa de las mitocondrias. En el lado izquierdo se muestra la estructura de la ATP sintasa mitocondrial y en el lado derecho la estructura de la ATP sintasa bacteriana.

La ATP sintasa de cloroplastos se encuentra embebida en la membrana interna de los tilacoides. Al igual que la ATPasa bacteriana, este complejo enzimático está compuesto por ocho subunidades, α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , I, II, y III_{14} . Homólogos de las subunidades bacterianas forman el dominio F_1 . Por otra parte, el dominio F_0 lo componen las subunidades I, II y III_{14} . Donde, la subunidad III forma el anillo proteolipídico con una estequiometría de catorce subunidades (Seelert y cols. 2000). Sin embargo, se conoce muy poco acerca del dominio F_0 , en contraste con el bien caracterizado dominio F_1 . A diferencia de la ATPasa bacteriana, donde el estator está compuesto por un homo-dímero, el estator de la ATPasa de cloroplastos es un hetero-dímero compuesto de las subunidades I y II (Poetsch y cols. 2007).

El complejo enzimático de los eucariotes presenta una estructura más elaborada (Figura 2). Se localiza en la membrana interna de las mitocondrias, en donde presenta un arreglo oligomérico que participa en estructurar a las crestas mitocondriales y favorece la formación del gradiente electroquímico (Allen 1995, Arnold y cols. 1998, Strauss y cols. 2008). La ATP sintasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una de las más estudiadas debido a la

posibilidad de poder manipularla genéticamente, Otro modelo sumamente estudiado es la ATP sintasa de corazón bovino, debido a las grandes cantidades de enzima que pueden purificarse. Ambas enzimas conservan homólogos de las ocho subunidades bacterianas, aunque a la contraparte de la subunidad δ bacteriana, se le denomina OSCP (Proteína que confiere Sensibilidad a la oligomicina); ya que es un factor que le confiere a la enzima sensibilidad al inhibidor oligomicina (Walter y cols. 1982), aunque no une al inhibidor directamente. Adicionalmente, la ATP sintasa de bovino está compuesta por otras 7 subunidades (δ , d , F_6 , A_6L , e , f , y g) todas ellas tienen contrapartes en la ATP sintasa de la levadura, que además cuenta con dos subunidades más (k e i/j). Estas subunidades adicionales forman el estator de la enzima y/o están involucradas en la dimerización. La complejidad de la estructura de la ATPasa mitocondrial es evidente: a diferencia de la F-ATPasa de bacterias, la ATPasa mitocondrial cuenta con una subunidad extra encargada de regular su actividad enzimática (subunidad IF_1 en bovino y $Inh1$ en levadura).

Actualmente la información estructural de la enzima se ha visto enriquecida con la resolución atómica del dominio F_1 de la ATP sintasa mitocondrial de bovino, tanto en presencia como en ausencia de nucleótidos (Abrahams y cols. 1994, Menz y cols. 2001), el dominio F_1 de rata (Bianchet y cols. 1998), el dominio F_1 de la bacteria *E.coli* (Hausrath y cols. 1999) y el sub-complejo F_1-c_{10} de levadura (Stock y cols. 1999). Sin embargo, no se ha podido obtener una estructura cristalográfica del complejo completo, ni del dominio F_0 .

3. El estator de la ATP sintasa mitocondrial

El estator de la ATP sintasa mitocondrial es más complejo que el estator de la ATP sintasa de las bacterias o los cloroplastos. El tallo periférico del complejo enzimático mitocondrial lo componen las subunidades OSCP, b , d y F_6 . (Collison y cols. 1994, 1996). La subunidad b se compone de 214 residuos y es la principal subunidad formadora del tallo periférico. Su secuencia de aminoácidos no tiene una alta similitud con la secuencia de la subunidad b de las bacterias; sin embargo, las dos subunidades tienen una estructura secundaria y terciaria muy parecida. Al igual que la enzima bacteriana, la región N-terminal de la proteína de bovino forma un dominio membranar que se ancla a la membrana mientras que el dominio C-terminal interactúa con la región C-terminal de la proteína OSCP. En la levadura *S. cerevisiae* esta proteína es nombrada como subunidad 4 (Velours y cols. 1987).

La subunidad d de bovino cuenta con 161 aminoácidos mientras que su homóloga en levadura es 16 aminoácidos más grande. Su plegamiento es de cinco α -hélices (Walker y

cols. 1987, Dickson y cols 2006, Rees y cols. 2009) que no presentan ninguna región altamente hidrofóbica, por lo que no entran en contacto con la membrana.

La subunidad F_6 se localiza en la superficie de la membrana (Rubinstein y cols. 2005). La estructura de la proteína F_6 purificada se resolvió por estudios de RMN (Resonancia magnética nuclear) (Carbajo y cols. 2004) con los que se determinó una estructura flexible de dos α -helices que se entrecruzan y que están unidas por una región no estructurada. Sin embargo, la conformación que adquiere esta proteína al formar el tallo periférico tiene una estructura elongada (Dickson y cols. 2006). Su contraparte en la levadura *S. cerevisiae* es la subunidad *h*.

Finalmente, la subunidad OSCP consta de 190 aminoácidos y tiene un 28% de similitud con la subunidad δ en bacteria. La estructura del dominio N-terminal de la subunidad OSCP de la enzima del bovino se determinó por estudios de RMN (Carbajo y cols. 2007) y al igual que la subunidad bacteriana, éste se une al dominio F_1 por el dominio N-terminal de la subunidad α .

La cuatro subunidades que forman el tallo periférico se expresaron en cepas de la bacteria *E.coli* para estudiar su arreglo topológico. Por otra parte, también se expresó la región soluble de la subunidad *b* (*b'*) que comprende los residuos 79-214, un fragmento de esta región que comprende los residuos 121-214 (*bl*), otro fragmento correspondiente a los residuos 165-214 (*bC*), un tercer fragmento que comprende los residuos 79-164 (*bM*) y la subunidad *d* carente de los primeros 14 aminoácidos (*d'*). Con las proteínas recombinantes se llevaron a cabo estudios de interacción *in vitro*, obteniéndose sub-complejos binarios entre las subunidades OSCP-*b'* y *b'-d*. También se encontraron sub-complejos terciarios entre las subunidades OSCP-*b'-d* y *b'-d-F₆*; sin embargo, el complejo más estable fue el cuaternario entre las subunidades OSCP-*b'-d-F₆* (Collison y cols. 1994, 1996). La reconstitución de este sub-complejo cuaternario con el dominio F_1 también se llevó a cabo con éxito. Con los fragmentos *bl* y *bC* se lograron obtener sub-complejos con OSCP y el dominio F_1 aunque en menores cantidades.

La estructura cristalográfica del tallo periférico de la ATPasa de bovino fue resuelta a 2.8 Å de resolución (Figura 3). Este subcomplejo comprende los residuos 79-183 de la subunidad *b*, los residuos 3-123 de la subunidad *d* y los aminoácidos 5-70 de la subunidad F_6 (Dickson y cols. 2006). El tallo periférico interactuando con el dominio F_1 de la ATP sintasa de bovino

también se resolvió a 3.2Å de resolución (Rees y cols. 2009), donde se observa que dos α -hélices del dominio C-terminal de la subunidad OSCP son las responsables de la interacción con la subunidad *b* (Figura 3). Además, se propone que OSCP le da flexibilidad al estator por medio de una horquilla formada por dos láminas. La subunidad *d* interactúa con la región extrínseca de la subunidad *b* a través de tres α -hélices entrecruzadas, una de ellas paralela y dos de ellas antiparalelas (Dickson y cols. 2006). Una α -hélice localizada en el dominio N-terminal de la proteína F_6 está próxima a una α -hélice localizada en el dominio C-terminal (residuos 169-189) de la subunidad OSCP estabilizando su interacción con la subunidad *b* (Rees y cols. 2009).

El papel principal del estator durante la catálisis es evitar que las subunidades catalíticas sigan el movimiento del rotor durante la síntesis de ATP. Además se ha propuesto que las subunidades que forman tanto el tallo central como el periférico tienen cierta elasticidad que les permite conservar energía durante la translocación de protones y el movimiento rotacional (Cherepanov y cols. 1999).

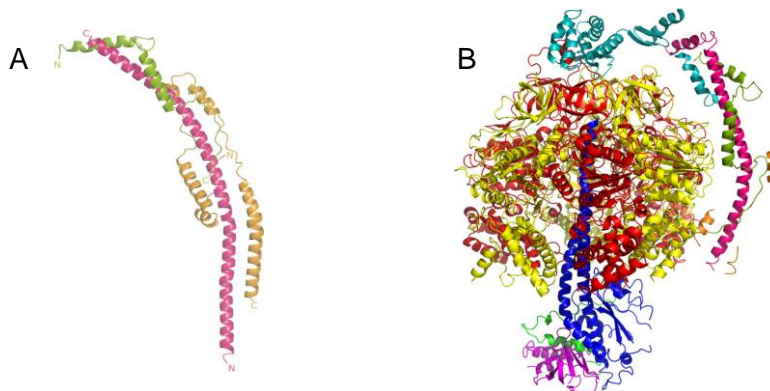


Figura 3. Estator de la ATP sintasa mitocondrial. **A)** Estructura cristalográfica del estator de la ATP sintasa del bovino formado por la interacción *in vitro* de fragmentos de la subunidad *b* (en rosa), de la subunidad *d* (en verde) y de la subunidad F_6 (en naranja). **B)** Estructura cristalográfica del tallo periférico de la enzima del bovino interactuando con el dominio F_1 resuelta a 3.2 Å de resolución. Imágenes tomadas de Dickson y cols. 2006 y Rees y cols. 2009)

4. La función de la ATP sintasa mitocondrial

A la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial se le considera un motor molecular debido al mecanismo de catálisis que lleva a cabo. El rotor está constituido por las subunidades γ , δ , ϵ , y el anillo de subunidades *c*, las cuales rotan alrededor de un eje perpendicular al plano de la membrana. La subunidad *a*, el tallo periférico (subunidades OSCP, *b*, *d* y F_6), y las subunidades

supernumerarias A6L, e, f y g (Golden y Pedersen, 1998; Ko y cols., 2000; Walker y Dickson, 2006) constituyen el estator de la enzima, es decir, los elementos fijos del motor.

La síntesis de ATP (Adenosín trifosfato) se lleva a cabo principalmente en la subunidad β , aunque el sitio de unión a nucleótidos se localiza en la interfase con la subunidad α (Abrahams y cols. 1994). Cada sitio de unión a nucleótidos lo componen aminoácidos que forman una hendidura de unión a adenosina y también cuenta con aminoácidos específicos para formar una hendidura de unión a fosfato denominada asa P. La ATP sintasa aprovecha el gradiente electroquímico de protones, generado por la cadena respiratoria, para llevar a cabo la catálisis. Este gradiente de protones se forma mediante la transferencia de electrones a través del complejo I o NADH deshidrogenasa, el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o Complejo bc_1 y finalmente el complejo VI o Citocromo c oxidasa. Estos complejos enzimáticos cuentan con grupos prostéticos, tales como el grupo hemo o las flavinas, capaces de llevar a cabo reacciones de óxido reducción. De esta manera se transfieren electrones entre los diferentes complejos a partir de sustratos reductores que provienen del ciclo de Krebs tales como el NADH (Nicotidamina adenina dinucleotido reducida) y el FADH (Flavina adenina dinucleotide reducida) hasta el oxígeno molecular como último aceptor de electrones. Durante dicha transferencia de electrones, los complejos I, III y VI bombean protones preferentemente hacia el espacio intermembranal generando el gradiente electroquímico. El regreso de protones hacia la matriz mitocondrial se lleva a cabo a través de la interfaz de las subunidades a y c. Se ha establecido por varios experimentos, entre ellos de mutagénesis, que los residuos Arg210 y Asp61 de las subunidades a y c respectivamente están involucrados en el transporte de iones (Cain 2000, Vik y cols. 2000, Fillingame y cols. 2002). Por otra parte, se ha demostrado que la protonación del residuo cAsp61 conlleva a la rotación de una hélice localizada en el dominio C-terminal de la subunidad c provocando su desplazamiento (Rastogi y Girvin 1999). Cada subunidad c acarrea un protón a medida que gira y este protón es liberado solamente en la interfaz de la subunidad a y c (Fillingame y cols. 2000, von Ballmoos y cols. 2002). Sin embargo, la falta de una estructura cristalográfica de la subunidad a o de su interfaz con la subunidad c, ha limitado el avance en el conocimiento detallado de este mecanismo rotatorio.

El movimiento de la subunidad c conlleva al movimiento del tallo central de la enzima (Figura 4). En un ciclo completo, tres movimientos secuenciales de 120° de la subunidad γ inducen cambios conformacionales consecutivos en las tres subunidades catalíticas β . Las tres

subunidades catalíticas β adquieren conformaciones diferentes durante la síntesis de ATP: abierta, semiabierta y cerrada. Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP, y a su vez se captan las moléculas de ADP (Adenosina difosfato) y fosfato (Itoh y cols. 2004). Con estos sustratos, la subunidad β cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la reacción de formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades β de la ATP sintasa (Figura 4).

Existen subunidades adicionales, IF_1 en bovino y Inh en levadura (Pullman y cols. 1963) que juegan un papel regulatorio (Gledhill y Walker, 2005). La proteína inhibidora se une al dominio F_1 y su acción depende principalmente del pH. Para la ATP sintasa de las bacterias o los cloroplastos, la proteína inhibidora es la subunidad ϵ , actuando como una palanca que controla la dirección de rotación en respuesta a la concentración de nucleótidos o a la presencia de un gradiente electroquímico (Tsunoda y cols. 2001). Su región carboxilo terminal interactúa simultáneamente con la subunidad β en el dominio F_1 y con una subunidad c en el dominio F_0 (Bulygin y cols. 2004).

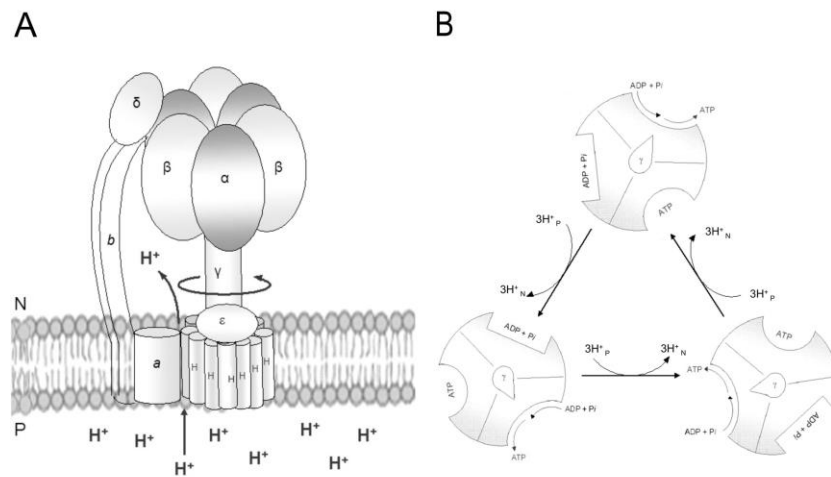


Figura 4. El mecanismo catalítico de la ATP sintasa. (A) Los protones atraviesan la membrana del lado P hacia el lado N a favor de su gradiente electroquímico, por un conducto formado entra las subunidades a y c , provocando un giro de 120° en la subunidad γ , que a su vez produce cambios conformacionales en las subunidades catalíticas. (B) Las tres subunidades catalíticas β adquieren conformaciones diferentes durante la síntesis de ATP llevando a la unión de sustratos (ADP + Pi), la síntesis de ATP, y la liberación del ATP recién sintetizado al medio. (Tomada de Cano-Estrada y Gonzalez Halphen 2011).

5. La microscopía electrónica como herramienta del estudio estructural de la ATP sintasa mitocondrial

La microscopía electrónica se ha convertido en una herramienta importante con la que es posible construir modelos tridimensionales de baja resolución de diferentes complejos proteicos a partir de su densidad electrónica. Diversos estudios de este tipo se han realizado con la F_1 - F_0 ATP sintasa. Para lograr esto, es necesario obtener el mayor número de micrografías en diferentes ángulos del complejo puro. Estas imágenes se alinean entre ellas y se clasifican en diferentes clases según la orientación de la enzima. Con las diferentes clases se lleva a cabo un proceso iterativo utilizando una referencia inicial sobre la cual se hacen proyecciones en las tres dimensiones y así obtener un modelo tridimensional preliminar que se utiliza como referencia para obtener un segundo modelo más completo (Figura 5).

Estudios de este tipo se han llevado a cabo con la ATP sintasa de bacterias (*E.coli*), cloroplastos y con el monómero de la ATP sintasa mitocondrial (bovino y levadura) (Böttcher y cols. 2000, Mellwig y Böttcher 2003, Rubistein y cols. 2003, Chen y cols. 2004, Lau y cols. 2008). En todos los modelos tridimensionales obtenidos del complejo enzimático se observa claramente el dominio F_1 , el dominio F_0 , el tallo central que conecta a ambos dominios y el tallo periférico de la enzima. Dentro del mapa tridimensional es posible llevar a cabo la superposición de la estructura atómica del subcomplejo F_1 - c_{10} de levadura en el caso de la ATP sintasa mitocondrial (Figura 5). Sin embargo, para el modelo de ATP sintasa de las bacterias y de los cloroplastos es preferible ajustar la estructura cristalográfica del dominio F_1 de *E.coli* junto con la estructura atómica del anillo de 14 subunidades *c*; el cuál contrasta con el anillo de la levadura, compuesto de sólo 10 subunidades *c*. De esta manera, la densidad electrónica que no se ajusta a estas estructuras atómicas correspondería al espacio ocupado por las subunidades que forman al estator de la enzima (Figura 5). Una vez ajustado el anillo de subunidades *c* dentro de la densidad electrónica del sector F_0 , es posible acomodar el modelo estructural de la subunidad *a* (Rastogi y Girvin 1999) y el dominio membranal de la subunidad *b* dentro del espacio sobrante. Comparando el monómero de la ATP sintasa de corazón de bovino con el modelo tridimensional del monómero de la ATP sintasa de levadura, se encontró que éste posee una mayor densidad electrónica en el dominio F_0 , debido a que el estudio con la ATPasa de levadura se realizó en ausencia de dos subunidades membranales adicionales presentes en la ATP sintasa mitocondrial, las subunidades *e* y *g*. Por otra parte se observó que el mapa electrónico del dominio F_1

disminuye cuando existen nucleótidos unidos a las subunidades catalíticas (Böttcher y cols. 2000).

La estructura cristalográfica resuelta para el brazo periférico de la ATP sintasa de corazón de bovino encaja muy bien sobre su modelo tridimensional, haciendo notar las regiones que ocuparían los aminoácidos faltantes en el modelo atómico del tallo periférico. Sin embargo, en el modelo tridimensional del dímero de levadura, la densidad electrónica correspondiente al tallo periférico no alcanza a cubrir completamente su estructura cristalográfica, sugiriendo que el arreglo de las subunidades difiere sutilmente en las formas monomérica y dimérica del complejo. Por otra parte este modelo reveló que los brazos periféricos de cada monómero no entran en contacto entre sí y se propuso cómo el brazo periférico interactuaría con los dímeros de la ATP para formar los oligómeros responsables de la formación de las crestas mitocondriales (Cough y cols. 2010).

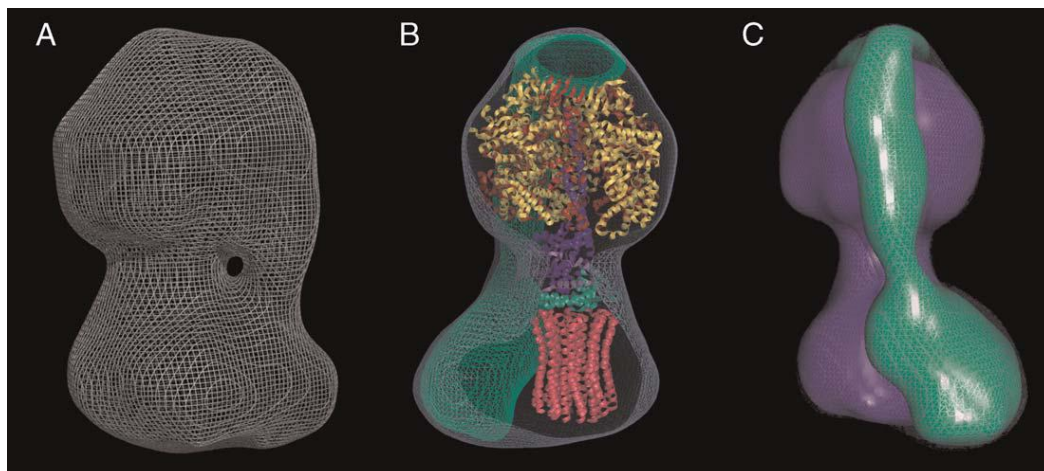


Figura 5. Modelo tridimensional de la ATP sintasa de bovino. **A)** Vista lateral del mapa de densidad electrónica de la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino. **B)** Sobreposición de la estructura cristalográfica de subcomplejo F_1-C_{10} de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **C)** Se señala en verde la densidad electrónica correspondiente al estator de la enzima. (Tomada de Walker y Dickson 2006).

6. Las algas clorofíceas.

Las algas clorofíceas son algas verdes unicelulares que pertenecen al linaje clorofita, el cual se subdivide en las clases prasinofíceas, trebouxifíceas y ulvofíceas.

Las algas verdes se asemejan a las plantas superiores en que tienen clorofila y en que utilizan almidón como material de reserva. Se encuentran en diversos hábitats sólidos y acuosos.

Chlamydomonas reinhardtii es un alga clorofícea biflagelada (Figura 6). Cuenta con pared celular, cloroplastos y mitocondrias. Ha sido de las algas más estudiadas de la clase clorofícea. Se conoce la secuencia completa de su genoma mitocondrial, el cual es lineal y muy compacto, de solamente 15.8 kb (Michaelis y cols. 1990); también se dispone de la secuencia completa de su genoma nuclear y de su genoma cloroplastídico (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre/Chlre3.home.html>).

El género *Polytomella* está formado por algas heterotróficas e incoloras que carecen de pared celular y cloroplastos (Pringsheim 1955). Estas algas han sido consideradas como el equivalente a las algas verdes puesto que comparten con ellas características morfológicas, fisiológicas y genéticas. La evolución de estas algas a partir de un alga ancestral fotosintética se confirmó por análisis filogenéticos de secuencia de las subunidades ribosomales nucleares pequeñas (Pröschold y cols. 2001, Moreira y cols. 2001) y del ARN ribosomal 18S (Melkonian y Surek 1995). La especie *Polytomella* tienen un ADN mitocondrial lineal y reducido al igual que la especie *Chlamydomonas*, donde se codifican únicamente un limitado número de subunidades de los complejos respiratorios (Michaelis y cols. 1990, Fan y Lee 2002). La fragmentación y procesamiento del ARN (Ácido ribonucleico) mitocondrial ocurre de la misma manera en *Polytomella parva* que en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlamydomonas eugametos*. La pérdida de cloroplastos y de pared celular en un momento de la evolución facilita la obtención de mitocondrias de esta alga y por lo tanto facilita la purificación y caracterización de los complejos de la fosforilación oxidativa.

Polytomella sp. es una de las algas más estudiadas del género *Polytomella* (Figura 6). Tiene forma ovoide bastante regular, constituida por una masa de protoplasma de color amarillo pálido, y carece de pared celular; presenta cuatro flagelos encargados de su movilidad. (Aragaos 1910). *Polytomella* mide aproximadamente 11 micras de largo y 8 micras de ancho, mientras que los flagelos miden cerca de 22 micras. Esta alga tiene tendencia al enquistamiento en su etapa de reposo o condiciones ambientales desfavorables.

Estudios realizados en las algas *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* arrojaron evidencia bioquímica de la cercanía filogenético de estas algas. Ambas algas tienen un gen homólogo *coxI* (Antaramian y cols. 1996), tienen fragmentado el gen *coxII* y ambos fragmentos de gen (*coxIIa* y *coxIIb*) se codifican en el núcleo (Pérez-Martínez y cols. 2001). Además ambas algas presentan una ATP sintasa atípica (Atteia y cols. 1997; Funes y cols. 2002, Vázquez-Acevedo y cols. 2006).

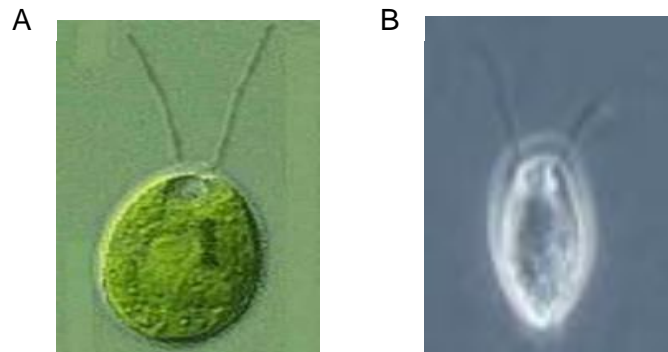


Figura 6. Algas clorofíceas. Se muestran dos de las algas verdes más estudiadas. **A)** Alga *Chlamydomonas reinhardtii*, su genoma nuclear y mitocondrial se encuentran secuenciados. **B)** Alga *Polytomella sp.* que carece de coloración verde debido a la pérdida de cloroplastos, esto facilita la realización de estudios sobre los complejos mitocondriales. Ambas algas están relacionadas evolutivamente.

7. La ATP sintasa de las algas clorofíceas

Estudios recientes revelan la presencia de una ATPasa atípica en el linaje de las algas clorofíceas. La ATP sintasa de estas algas se purifica como un dímero estable con una masa molecular aproximada de 1600 kDa. (van Lis y cols. 2003; van Lis y cols. 2005; Dudkina y cols., 2005, Vázquez-Acevedo y cols. 2006), mientras que la ATP sintasa mitocondriales del bovino o la levadura se purifica preferentemente en su forma monomérica y para estabilizar el dímero es necesario la solubilización de las mitocondrias con detergentes suaves tales como digitonina (Paumard y cols. 2002; Minauro-Sanmiguel y cols. 2005).

Estudios bioquímicos y computacionales de la ATP sintasa del alga *Chlamydomonas reinhardtii* revelaron la presencia de 14 subunidades (van Lis y cols. 2003; Funes y cols. 2002; Cardol y cols. 2005). Únicamente las subunidades catalíticas α y β , las subunidades que componen el tallo central de la enzima (γ y δ); la subunidad *c* que forma parte del rotor y las subunidades OSCP y *a* se identificaron como contraparte de las subunidades de otras ATP sintasas mitocondriales. Para las 7 subunidades restantes no se encontró similitud con alguna otra proteína en los bancos de datos. Además, en el genomas del alga verde *C.*

reinhardtii no se pudieron identificar los genes que codifican para las subunidades clásicas que forman parte del tallo periférico de la ATP sintasa mitocondrial ni los genes que codifican a las proteínas encargadas de la dimerización del complejo. Por el contrario, se identificaron los genes que codifican para siete proteínas que constituyen al estator de la ATP sintasa. Se les nombró ASA (siglas en inglés de proteína asociada a la ATP sintasa) y se numeraron sucesivamente como ASA1, ASA2, ASA4, ASA5, ASA6, ASA7 de acuerdo a la nomenclatura de su genoma (Cardol y cols.2005).

Por otra parte, se obtuvo el patrón electroforético de 17 subunidades que componen a la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* (Vázquez-Acevedo y cols. 2006). Se encontró que la composición polipeptídica es muy similar a la del alga *Chlamydomonas reinhardtii*; pero, además de estar constituida por las subunidades identificadas previamente en esta alga (ASA1-ASA7), se reportó la presencia de la subunidad ϵ y de dos proteínas más que no tienen contraparte en otras ATP sintasas mitocondriales y que tampoco tienen similitud con alguna otra proteína en los bancos de datos (Figura 7). A estas subunidades se les llamó ASA8 y ASA9; posteriormente estas dos proteínas también fueron identificadas como parte de la ATP sintasa de *C. reinhardtii*. Además, en el genoma de *Volvox cartieri*, otra alga verde, también se encontró la presencia de los genes que codifican para estas nueve nuevas subunidades (Vázquez-Acevedo y cols. 2006).

Estudios de microscopía electrónica con el dímero de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* revelaron una estructura atípica de esta enzima (Dudkina y cols. 2005). La densidad electrónica de los brazos periféricos es muy evidente y contrasta fuertemente con la densidad electrónica observada en micrografías de la ATP sintasa del bovino o de la levadura (Figura 7). Por lo tanto, es claro que la presencia de estas nuevas subunidades confieren una arquitectura diferente al estator de la ATP sintasa de las algas clorofíceas, provocando que la enzima sea más estable que el resto de las ATP sintasas de los eucariontes.

Otra característica única de la ATP sintasa de las algas clorofíceas es que las subunidades catalíticas α y β , a pesar de tener una alta similitud con las subunidades catalíticas del resto de las ATP sintasas mitocondriales, presentan extensiones de aminoácidos; la subunidad α cuenta con 20 residuos adicionales en la región N-terminal y la subunidad β cuenta con 60 residuos adicionales en la región C-terminal (Franzén y Falk 1992, Nurani y Franzén 1996). Se

desconoce la función de estas extensiones de aminoácidos, aunque se sugiere que la extensión de residuos en la subunidad β podría estar involucrada en la regulación del complejo, puesto que presenta cierta similitud con la proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial ortodoxa.

Se ha observado que la actividad de hidrólisis de la ATP sintasa pura de *Polytomella sp.* se incrementa hasta 50 veces si se incubaba con detergente LM (n-dodecil- β -D-maltósido), sugiriendo que el detergente provoca un cambio conformacional del complejo y/o la liberación del agente inhibidor (Villavicencio-Queijeiro y cols. 2009). Además, se logró obtener el monómero de la enzima en donde la actividad de hidrólisis obtenida fue menor que el dímero y resultó ser mucho menos estable que la forma dimérica.

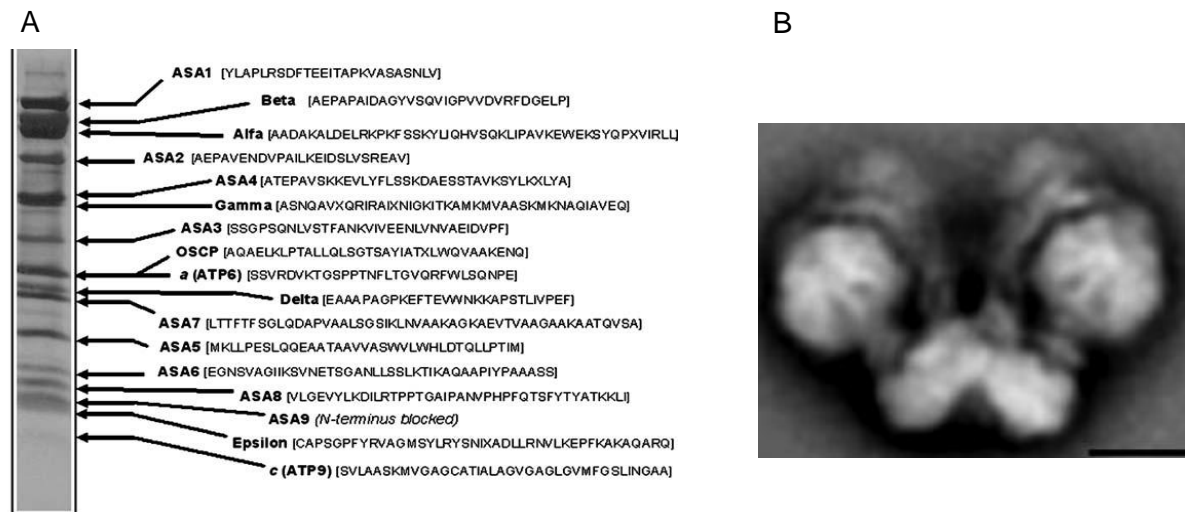


Figura 7. La ATP sintasa atípica de las algas clorofíceas. A) Patrón electroforético de las subunidades que componen a la ATP sintasa del alga clorofícea *Polytomella sp.* **B)** Micrografía electrónica del dímero de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* donde se observa la presencia de brazos periféricos muy robustos. Las nuevas subunidades ASA, encontradas en esta especie de algas, constituyen la nueva arquitectura del estator de esta enzima. (Tomada de Vázquez-Acevedo y cols. 2006; Dudkina y cols. 2005)

8. Las características de las subunidades ASA

Las subunidades ASA son exclusivas de la ATP sintasa mitocondrial de las algas verdes, pues hasta el momento no se han identificado en alguna otra especie, incluso están ausentes en otras algas cercanamente relacionadas, como las ulvofíceas, las prasinofíceas y las trebuxiofíceas. Por lo tanto, su origen hasta el momento es desconocido.

A diferencia de las otras ATP sintasas mitocondriales donde sus subunidades más hidrofóbicas, como las subunidad a, c y A₆L se codifican en la mitocondria, todas las subunidades de la ATP sintasa de las algas clorofíceas son de codificación nuclear, por lo que es necesaria la presencia de un péptido señal o presecuencia para ser dirigidas hacia la mitocondria. Sin embargo, ASA5, ASA8 y ASA9 no cuenta con este péptido señal, así que su importación estaría dirigida por secuencias internas, sugiriendo que estas proteínas se insertan en la membrana interna vía el espacio intermembranal como se ha descrito para otras proteínas de levadura (Herrmann y Neupert 2003).

La subunidad ASA1 de *C. reinhardtii* y *Polytomella sp* fue la primera en caracterizarse (Números de acceso GenBank CAD29654 y CAD90158). Ambas comparten 54% de similitud (Van Lis y cols. 2007). Inicialmente fue llamada MASAP (siglas en inglés de proteína asociada a la ATP sintasa mitocondrial) y se propuso que era la responsable de estabilizar a la estructura dimérica de la enzima (Atteia y cols. 1994, van Lis y cols. 2003). Su masa molecular es de 60.6 kDa y según el análisis *in silico* de su secuencia de aminoácidos se trata de una proteína totalmente hidrofílica, que además predice un 7% de estructura en hélices entrecruzadas, importantes para llevar a cabo interacciones tanto *intra* como *inter* subunidades. Experimentos de disociación de la enzima llevaron a la conclusión que esta subunidad no interactúa con el dominio F₁ (Vázquez Acevedo y cols. 2006). Sin embargo, se encontró asociada con la subunidad a y con otras subunidades ASA de carácter hidrofóbico por lo que ASA1 estaría cerca del dominio membranal Fo pero sin estar en contacto directo con la membrana.

Con el análisis de las secuencias de aminoácidos del resto de las subunidades ASA de la ATP sintasa de *C. reinhardtii*, las proteínas ASA6, ASA8 y ASA9, sugieren ser integrales de membrana; se predicen dos posibles cruces transmembranales para ASA6, mientras que para ASA8 y ASA9 se predice un solo cruce transmembranal. Sus masas moleculares son de 13.3, 10 y 8 kDa respectivamente. La subunidad ASA5 tiene una masa molecular de 14.3 kDa y sólo presenta hidrofobicidad considerable en el dominio N-terminal, mientras que el resto de las subunidades (ASA2, ASA3, ASA4 y ASA7) predicen ser proteínas solubles con masa molecular aparente de 45.5, 36.3, 31.3 y 19.5 kDa respectivamente.

Por otra parte, se sugiere que las subunidades ASA6 y ASA9 son responsables de la dimerización del complejo, ya que al obtener el monómero de la enzima disminuye su

proporción con respecto al resto de las subunidades (van Lis y cols 2007, Villavicencio-Queijeiro y cols. 2009). Sin embargo, las proteínas ASA6 y ASA9 no presentan el motivo GXXXG presente en la subunidad e y que juega un papel importante en la dimerización en las ATPasas mitocondriales ortodoxas.

El silenciamiento de la subunidad ASA7 se llevó acabo mediante ARN de interferencia en *C. reinhardtii*, con el fin de conocer la función que desempeña esta subunidad en el estator del complejo enzimático. Se encontró que la enzima pura carente de esta subunidad es muy inestable y se disocia fácilmente liberando al sector F₁ (Lapaille y cols. 2010). Sin embargo, las mutantes silenciadas crecen normalmente. La pérdida de esta subunidad no tiene ningún impacto en la bioenergética celular ni en la estructura de la mitocondria.

La sustitución de las subunidades clásicas que conforman el estator de la ATP sintasa mitocondrial por las subunidades ASA en la ATP sintasa de las algas clorofíceas es evidente, la disposición de éstas para formar el brazo periférico de la enzima se desconoce y aún no es claro el papel que desempeña cada una de ellas.

ANTECEDENTES INMEDIATOS.

Para lograr una aproximación de la topología de las diferentes subunidades que componen a la ATP sintasa se han realizado estudios de entrecruzamiento y estudios de disociación con calor de la enzima pura.

Para los estudios de entrecruzamiento se utilizaron cuatro diferentes tipos de entrecruzadores, tanto homobifuncionales como heterobifuncionales, con diferente longitud de brazo y con diferente solubilidad (Vázquez-Acevedo y cols. 2006, Cano-Estrada y cols. 2010). En todos los casos se obtuvieron entrecruzamientos de las subunidades $\alpha + \beta$ y $\alpha + \text{OSCP}$; además, con dos de los agentes entrecruzadores se obtuvo el producto entre γ y δ . Dada la topología de las ATP sintasas mitocondriales ortodoxas, todos estos productos de entrecruzamientos eran esperados. Otro resultado de entrecruzamiento muy consistente fue entre las subunidades ASA2 + ASA4, sugiriendo que éstas están muy próximas entre sí y con sus grupos reactivos muy accesibles al medio. Además, se encontraron productos de entrecruzamiento entre las subunidades ASA2 + ASA7 y ASA4 + ASA7; entonces, la subunidad ASA7 interactúa tanto con la subunidad ASA2 como con la subunidad ASA4. Con estos resultados, se propone que estas tres subunidades podrían estar formando el brazo periférico de la enzima junto con la subunidad OSCP en el dominio F_1 (Figura 8). Lamentablemente, no fue posible identificar algún entrecruzamiento de la subunidad OSCP con alguna de las subunidades ASA, pues esto revelaría a la principal subunidad formadora del brazo periférico, homóloga de la subunidad *b* de la ATP sintasa clásica. Por otra parte, con un reactivo insoluble en agua se encontraron entrecruzamientos entre ASA3 + ASA8, ASA1 + ASA7 y entre dos subunidades ASA6. El dímero de subunidades ASA6 propone a esta subunidad como responsable de la dimerización del complejo enzimático; experimentos posteriores comprobaron esta hipótesis (Villavicencio-Queijeiro y cols. 2009). Y aunque, también fue identificado un producto de entrecruzamiento entre dos subunidades ASA4 (Cano Estrada 2008), la participación de esta subunidad en la dimerización del complejo no se pudo comprobar por otros métodos experimentales, por lo que quedó abierta la posibilidad de que su estequiometría fuera diferente de uno (dos subunidades ASA4 en cada monómero). La subunidad ASA3, de acuerdo a los resultados, se localizarían en la superficie de la membrana interactuando con alguna región hidrofílica de la subunidad ASA8.

Los estudios de disociación por calor se llevaron a cabo incubando a la enzima a 60°C por diferentes tiempos (Vázquez-Acevedo y cols. 2006). Se encontró además de la forma

monomérica de la enzima y del dominio F1, un subcomplejo de aproximadamente 200 kDa. el cual está formado por las subunidades ASA1, ASA3, ASA5, ASA8, a y c. Este subcomplejo corrobora la cercanía entre la subunidad ASA3 y ASA8 observada por entrecruzamientos y sugiere la presencia de la subunidad ASA1 en la superficie de la membrana interactuando con proteínas hidrofóbicas. Adicionalmente, la disociación de la enzima en presencia de detergente LM, reveló un subcomplejo de las subunidades ASA2 y OSCP, señalando a esta subunidad como la principal formadora del tallo periférico de la enzima, junto con las subunidades ASA4 y ASA7.

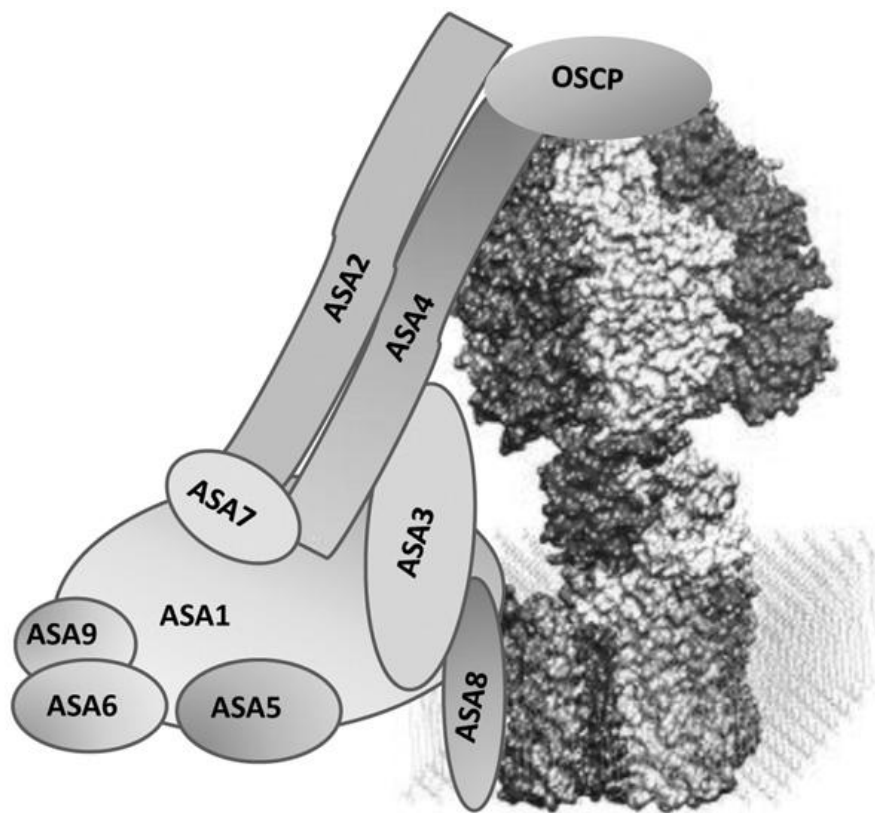


Figura 8. Arreglo topológico de las subunidades ASA del alga incolora *Polytomella sp.* Se muestra únicamente la mitad del dímero de la enzima. La estructura cristalográfica del subcomplejo F₁-C₁₀ es de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Stock y cols. 1999). Se propone que el brazo periférico de la enzima lo forman las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7, mientras que el dominio membranar está formado por el resto de las subunidades. La subunidad ASA6 y ASA9 están involucradas en la dimerización del complejo. (Tomada de Cano-Estrada y cols. 2010)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ATP sintasa mitocondrial es un complejo de la fosforilación oxidativa ampliamente conservado a lo largo de la evolución. Su estructura general es muy similar desde las enzimas bacterianas hasta las enzimas de organismos eucariontes. Además, se han conservado las subunidades que las componen, que si bien no son muy similares a nivel de secuencia, a nivel de estructura secundaria si lo son. Sin embargo, recientemente se han encontrado que la composición polipeptídica de la ATP sintasa de las algas clorofíceas difiere del resto de ATP sintasas. Ésta carece de las subunidades clásicas que componen al estator de la enzima y en su lugar poseen nueve subunidades cuyo origen evolutivo es desconocido.

Una de las grandes preguntas por resolver es ¿por qué estas subunidades desconocidas sustituyeron a las subunidades ortodoxas del estator? siendo éstas muy conservadas en prácticamente todos los organismos. Esta claro que su presencia le confiere estabilidad al complejo enzimático, pero ¿por qué estas algas requieren de una enzima más estable? ¿En qué momento de la evolución se efectuó este evento? ¿Se trató solo de un evento aislado o existen otros organismos que posean este tipo de enzima? Existen muchas preguntas por resolver a cerca de esta ATP sintasa atípica, estudiar a detalle el arreglo topológico de la enzima nos ayudará a aclarar alguna de ellas y conocer más de la novedosa estructura de esta ATP sintasa. Su caracterización nos permitirá conocer cuál es la función precisa de cada una de estas nuevas subunidades dentro del complejo enzimático, incluso será posible conocer si estas subunidades conservan alguna similitud en su estructura secundaria con las subunidades que conforman al estator clásico de la enzima. Sin embargo, el trabajo que se requiere es arduo, por lo que resulta primordial centrarse en partes específicas de la enzima para un mejor estudio que nos permita entenderla mejor. Por esta razón, este trabajo es sólo una pequeña pieza del rompecabezas, donde el brazo periférico de la enzima fue el objetivo central de nuestro estudio, siendo éste una parte esencial de la enzima.

HIPOTESIS

Las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 se encuentran formando el tallo periférico de la ATP sintasa de algas clorofíceas. Posiblemente alguna de estas tres subunidades interactúa con la subunidad OSCP para unirse al dominio F_1 .

OBJETIVO

Demostrar que las subunidades ASA2, ASA4, ASA7 conforman parte del tallo periférico de la enzima y tratar de entender cómo interaccionan entre sí. Proponer un modelo estructural parcial del tallo periférico la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas basado en enfoques estructurales, bioquímicos, y de genética molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las secuencias de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 del alga incolora *Polytomella* sp.
- Obtener la estequiometría de la subunidad ASA4 con respecto a los demás componentes de la enzima.
- Obtener un modelo tridimensional del complejo dimérico de la ATP sintasa del alga.
- Estudiar la interacción entre la subunidades ASA2, ASA4, ASA7 y OSCP con miras a entender que regiones de estas proteínas son importantes para el reconocimiento entre ellas.

RESULTADOS

1. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades que componen a la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

Uno de los pasos fundamentales para el desarrollo de este proyecto fue conocer las secuencias de aminoácidos de las subunidades que componen a la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*, en especial de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7.

Van Lis y cols. (2007) obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las subunidades catalíticas α y β (GenBank CAI34836 y Gen Bank CAI34837), de la subunidad γ (GenBank CAF03602) y de la subunidad ASA1 (GenBank CAD90158) del alga *Polytomella sp.* Para el resto de las subunidades de la ATP sintasa de esta alga sólo se conocían los aminoácidos de la región N-terminal obtenidas por degradación de Edman (Vázquez Acevedo y cols. 2006). Por otra parte, las secuencias de las subunidades que componen a la ATP sintasa del alga cloroficea *C. reinhardtii* son conocidas, pues su genoma está totalmente secuenciado. Del alga cloroficea *Polytomella parva* se conocen fragmentos de cDNA (cadena complementaria del ácido desoxiribonucleico) que se encuentran depositados en la base de datos de EST (siglas en inglés de etiqueta de una secuencia expresada), haciendo posible la construcción de las secuencias que componen a su ATP sintasa (Mallet y cols. 2006). Para la obtención de las secuencias completas de aminoácidos del resto de las subunidades de ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* se diseñaron cebadores (ver Anexo I) con base en las secuencias de las subunidades de la ATP sintasa de las algas *C. reinhardtii* y *Polytomella parva*, para la amplificación por PCR (siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa), a partir de una genoteca clonada en el fago λ -ZAPII.

Se lograron amplificar exitosamente las subunidades ASA4, ASA6, ASA7, ASA8, δ y OSCP (ver Anexo II). Las subunidades ASA2 y ASA3, se amplificaron de manera parcial. Para la subunidad ASA2 fue necesario el diseño de cebadores degenerados, con base en fragmentos de aminoácidos de la proteína obtenidos por espectrometría de masas, y así lograr la amplificación parcial de la subunidad. En *C. reinhardtii*, la proteína madura ASA2 está compuesta de 1,383 pares de bases (pb) que codifican para los 461 aminoácidos; para *Polytomella sp.* se lograron amplificar 1,221 pb, los cuales codifican para 407 aminoácidos, faltando 7 aminoácidos de la región N-terminal y 43 aminoácidos de la región C-terminal. De la subunidad ASA3 se lograron amplificar 279 pb que codifican para los primeros 93 aminoácidos de la proteína madura, sin embargo, también se logró amplificar su presecuencia formada por 222 pb (74 aminoácidos). La subunidad ASA3 de *C. reinhardtii*,

incluyendo su presecuencia, está formada por 366 aminoácidos; por lo tanto la subunidad ASA3 amplificada de la genoteca de *Polytomella sp.* carece de 197 aminoácidos de la región C-terminal. Las subunidades ASA5, ASA9, ϵ , a y c no se pudieron amplificar. Sin embargo, estas secuencias pudieron ser construidas a partir de los EST de *Polytomella parva* (Mallet y cols. 2006).

El porcentaje de similitud entre las subunidades que componen a la ATP sintasa de *Polytomella sp.* y las subunidades de la ATP sintasa de *C. reinhardtii* fue calculado (Tabla 1). También se calculó el porcentaje de similitud entre las subunidades conservadas del complejo enzimático del alga *Polytomella sp.* con sus contrapartes en el complejo enzimático de bovino (Tabla 1).

Subunidad	Organismo	No. de acceso Gen Bank	Similitud con <i>C. reinhardtii</i> (%)	Similitud con Bovino (%)
ASA1	<i>Polytomella sp</i>	CAD90158	54	
β (ATP2)	<i>Polytomella sp</i>	CAI34837	86	64
α (ATP1)	<i>Polytomella sp</i>	CAI34836	82	61
ASA2	<i>Polytomella sp</i>	ADE92937	46	
ASA3	<i>Polytomella sp</i>	ADE93004	51	
ASA4	<i>Polytomella sp</i>	ACU87552	50	
γ (ATP3)	<i>Polytomella sp</i>	CAF03602	71	34
a (ATP6)	<i>P. parva</i>	EC749403	46	
OSCP (ATP5)	<i>Polytomella sp</i>	ACU82824	62	28
ASA7	<i>Polytomella sp</i>	ACU68928	47	
δ (ATP16)	<i>Polytomella sp</i>	ADE92943	67	28
ASA5	<i>P. parva</i>	DAA33941	61	
ASA6	<i>Polytomella sp</i>	ADE93002	54	
ASA8	<i>Polytomella sp</i>	ADH59420	79	
ASA9	<i>P. parva</i>	DAA33943	61	
ϵ (ATP15)	<i>P. parva</i>	EC748275 EC748655 EC749219	59	32 30
c (ATP9)	<i>Polytomella sp</i>	ADE92942	62	40*

TABLA 1. Secuencias de las subunidades asociadas a la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* Se muestra el porcentaje de identidad con las subunidades de la ATP sintasa del alga *C. reinhardtii* y porcentaje de identidad de las subunidades conservadas con su homólogo en bovino.

2. La estequiometría de las subunidades de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

La estequiometría de las subunidades ASA es desconocida y no puede predecirse dado que, estas subunidades no presentan similitud con alguna otra subunidad de las ATP sintasas ortodoxas. Sin embargo, para las subunidades conservadas se espera un estequiometría igual a sus contrapartes en las ATP sintasas mitocondriales, α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , OSCP, *a*, *c*₁₀.

Para tener un estimado de la estequiometría de las subunidades ASA se utilizaron reactivos fluorescentes que reaccionan con los grupos sulfhidrilos presentes en los residuos de cisteína, por lo tanto esta técnica se limita a aquellas subunidades que presentan estos residuos en la su secuencia. Las subunidades ASA1, ASA2, ASA7, ASA6, ASA8 carecen de cisteínas, por lo que, lamentablemente, no pudieron ser cuantificadas. El resto de las subunidades presentan al menos un residuo de cisteína en su secuencia (Tabla 2). A pesar de ellos, la estequiometría para las subunidades ASA9 y *c* no pudo ser cuantificada.

La fluorescencia incorporada en cada subunidad es proporcional al número de residuos de cisteínas presentes en la secuencia de cada subunidad y por lo tanto, es posible calcular su estequiometría. Si la intensidad de fluorescencia incorporada es igual al número de cisteínas en su secuencia, la estequiometría será de uno; por el contrario, si la intensidad de fluorescencia incorporada resulta ser mayor, la estequiometria sera mayor a uno para esa subunidad. Se utilizaron dos diferentes reactivos fluorescentes, 5-IAF (Iodoacetimidida 5-Fluoresceína) y fluoresceína 5-maleimida. Con ambos reactivos se observó un marcaje específico, es decir, sólo se observó fluorescencia en aquellas subunidades que presentan residuos de cisteínas (Figura 9).

Los cálculos se hicieron con base a la subunidad β , que cuenta con dos residuos de cisteína en su secuencia y además presenta una estequiometría de tres subunidades por monómero. Para el resto de las subunidades se obtuvo una estequiometría por monómero de α_3 , γ , δ , ϵ , OSCP, ASA3, ASA4, ASA5, *a* (Tabla 3). El resultado concuerda perfectamente con la estequiometría esperada para las subunidades conservadas. La estequiometría calculada para las subunidades ASA fue de uno por monómero, sugiriendo que el resto de las subunidades ASA tendrán también esta estequiometría. Analizando geles desnaturalizantes teñidos con coomassie, donde es posible calcular estequiometrías, no se aprecia una

diferencia significativa de intensidad entre las subunidades ASA y la subunidades con una estequiometría de uno por monómero, en contraste, sí es posible apreciar una diferencia entre las subunidades catalíticas, donde su estequiometría es de tres subunidades por monómero con el resto de las subunidades. Aunque esta observación apoya la sugerencia de la estequiometría para el resto de las subunidades ASA, es necesario realizar más experimentos para corroborarla.

Subunidad	Números de residuos de cisteína
ASA1	0
β (ATP2)	2
α (ATP1)	4
ASA2	0
ASA3	3
ASA4	2
γ (ATP3)	2
a (ATP6)	2
OSCP (ATP5)	1
ASA7	0
δ (ATP16)	1
ASA5	1
ASA6	0
ASA8	0
ASA9	3
ϵ (ATP15)	1
c (ATP9)	1

Tabla2. Subunidades que presentan residuos de cisteína en su secuencia y el número de este residuo en cada una de ellas. En rojo se muestran las subunidades que carecen de cisteínas.

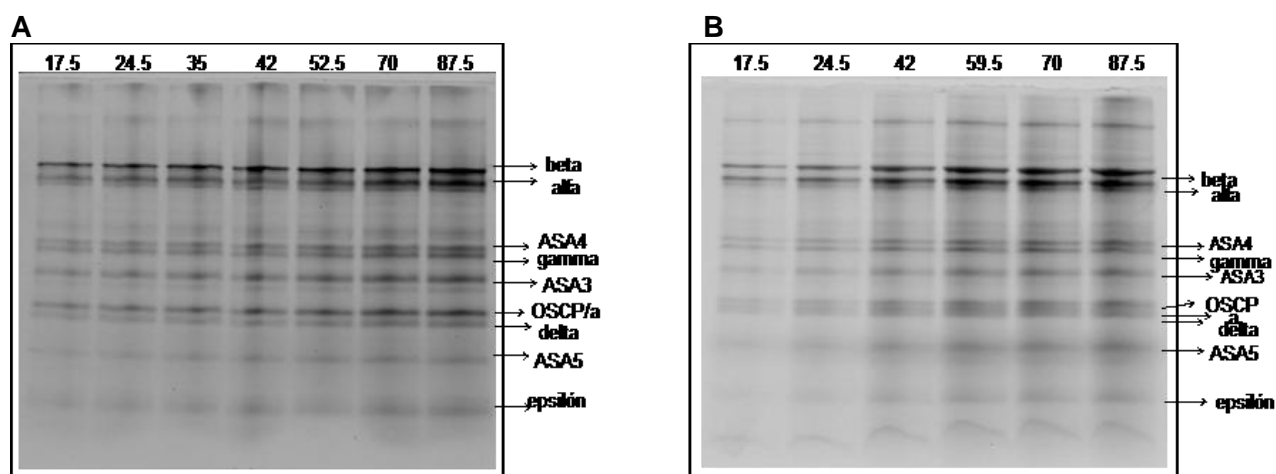


Figura 9. Marcaje de las subunidades que presentan residuos de cisteína en su secuencia. Se muestra el patrón electroforético de la enzima marcada con fluorescencia. Se indican con flechas las subunidades marcadas. La cantidad de proteína (en µg) utilizada para el experimento se muestra en la parte superior de los geles **A)** Marcaje con el reactivo Fluoresceína 5-maleimida. **B)** Marcaje con el reactivo 5-IAF

Subunidades	5-IAF			Fluoresceína-5-maleimida		
	fluorescencia (UA)	Residuos de cisteína calculados	Estequiometría	fluorescencia (UA)	Residuos de cisteína calculados	Estequiometría
Alfa (4)	0.147	10.75 (11)*	3	0.147	10.62 (11)*	3
Beta (2)	0.082	6	3	0.083	6	3
ASA4 (2)	0.032	2.3 (2)*	1	0.033	2.38 (2)*	1
Gamma (2)	0.032	2.3 (2)*	1	0.03	2.16 (2)*	1
ASA3 (3)	0.04	2.9 (3)*	1	0.048	3.46 (3)*	1
OSCP/a (1/2)	0.047	3.4 (3)*	1	0.044	3.1 (3)*	1
Delta (1)	0.019	1.39 (1)*	1	0.018	1.3 (1)*	1
ASA5 (1)	0.014	1.02 (1)*	1	0.012	0.86 (1)*	1
Epsilón (1)	0.012	1.05 (1)*	1	0.015	1.08 (1)*	1

Tabla3. Cálculo de la estequiometría de las subunidades que forman parte de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* * Se indica entre paréntesis el número de residuos de cisteína estimados.

3. Interacción de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

Se ha propuesto que las principales subunidades formadoras del brazo periférico del complejo son ASA2, ASA4 y ASA7, según estudios bioquímicos realizados con la enzima pura (Vázquez-Acevedo 2006). Para demostrar esta hipótesis se realizaron estudios de interacción *in vitro* con sus proteínas recombinantes. Además, las subunidades ASA4 y ASA7 se dividieron en dos fragmentos, uno de ellos corresponde a la región N-terminal y el otro a la región C-terminal, esto con el fin de determinar qué dominio de estas proteínas está involucrada en su interacción. Con el objetivo de hacer la reconstitución completa del brazo periférico, se decidió obtener la proteína recombinante de la subunidad OSCP y también se diseñó una proteína carente de los últimos 120 aminoácidos (OSCP120), pues se espera que esta región sea la responsable de la interacción con la subunidad ASA2, siguiendo el modelo de interacción de la subunidad OSCP y la subunidad *b* de bovino.

Para llevar a cabo los estudios de interacción fue necesaria la clonación de los genes correspondientes a cada proteína, incluyendo los fragmentos, en vectores de expresión apropiados para poder realizar su sobreexpresión y posteriormente su purificación.

3.1. Diseño de las subunidades ASA4 y ASA7 truncas.

La subunidad ASA4 de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* tiene 294 aminoácidos. Esta subunidad tiene una similitud del 50% con la subunidad ASA4 del alga *C. reinhardtii*. La predicción de estructura secundaria con base en su secuencia de aminoácidos es predominantemente en forma de α -hélices. Para el diseño de los fragmentos de esta subunidad se analizó el alineamiento de secuencias de la subunidad ASA4 de las algas *Polytomella sp.*, *C. reinhardtii* y *Volvox cartieri*, con la finalidad de encontrar regiones conservadas dentro de las proteínas de estas diferentes algas clorofíceas (ver Anexo III). La subunidad ASA4 de *Volvox carteri* presenta una inserción de 60 aminoácidos después del residuo 170, pero a pesar de esto, se observó que tanto la región N-terminal como la región C-terminal de las subunidades de estas tres algas comparten residuos conservados. De hecho, los últimos 50 aminoácidos presentan un mayor porcentaje de similitud entre ellas. La región que comprende los residuos 83 a 92 se encuentra totalmente conservada (APVKRYAAEL). Por lo tanto, en el diseño de las proteínas truncas de ASA4 de *Polytomella sp.*, el dominio N-terminal (ASA4N) comprende los primeros 154 aminoácidos (residuos 1-

154), la cuál incluye la región altamente conservada; y su masa molecular es de 18.2 kDa. El diseño del fragmento correspondiente a la región C-terminal (ASA4C) está compuesto de 187 aminoácidos (residuos 107-294) y una masa molecular de 19.9 kDa.

La subunidad ASA7 de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* está formada de 176 aminoácidos. Tiene una similitud del 47% con la subunidad ASA7 de *C. reinhardtii*. La predicción de estructura secundaria con base en su secuencia de aminoácidos predice un dominio estructural de hojas β en su región N-terminal y un dominio estructural de α -hélices. La fragmentación de esta subunidad se realizó separando ambos dominios. El fragmento correspondiente al N-terminal (ASA7N) cuenta con 77 aminoácidos, (residuos 1-77) y una masa molecular de 7.4 kDa., mientras que el fragmento correspondiente al C-terminal (ASA7C) presenta 102 aminoácidos (residuos 74-176) y una masa molecular de 11.8 kDa.

Para la subunidad ASA2 no se diseñó ninguna proteína trunca, puesto que esta subunidad ya carece de los primeros 7 aminoácidos y de los últimos 43 aminoácidos.

3.2. Clonación de los genes, expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Se utilizaron dos diferentes vectores de expresión para la clonación de genes; uno de ellos fue el vector pet28a. Este vector adiciona una etiqueta de 6His (hexa-histidinas) en el extremo amino de las proteínas para facilitar su purificación mediante columnas de afinidad de níquel; además, cuenta con un sitio de unión a trombina para el corte de dicha etiqueta, una vez que la proteína sea purificada. Por tanto, la proteína traducida tendrá una extensión de 19 aminoácidos extra. En este vector se clonaron todos los genes que codifican para las proteínas de interés, incluyendo a las proteínas truncas.

Otro vector utilizado fue el pet3a; éste no adiciona etiquetas a la proteína por lo que su purificación resulta más laboriosa. En este vector sólo se clonaron los genes que codifican para las proteínas ASA2, ASA4, ASA4N y ASA4C. La finalidad inicial de clonar los genes en dos vectores diferentes fue garantizar la expresión de la proteína y evitar así que la presencia de la etiqueta de 6His en el amino-terminal de las proteínas interfiera en su interacción. También, tener clonados los genes en ambos sistemas de expresión nos ayudó a diseñar una estrategia de co-purificación para ensayar la interacción de las subunidades de interés.

En los cebadores empleados para la amplificación de las secuencias, se adicionaron sitios de restricción diseñados para la clonación en ambos vectores de expresión (ver anexo I). Los amplificados fueron clonados inicialmente en el vector pGEM para conocer la secuencia de las proteínas. Posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción específicas para los sitios de corte y clonados en los vectores de interés.

La expresión de las subunidades en ambos vectores se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. Todas ellas se expresaron en la primera hora de inducción a 37°C con 1 mM de IPTG (Isopropyl-β-D-tiogalactopiranosido)(Figura 10). Sin embargo, todas las proteínas se encontraron en cuerpos de inclusión por lo que fue necesario su solubilización con 6 M de cloruro de guanidina.

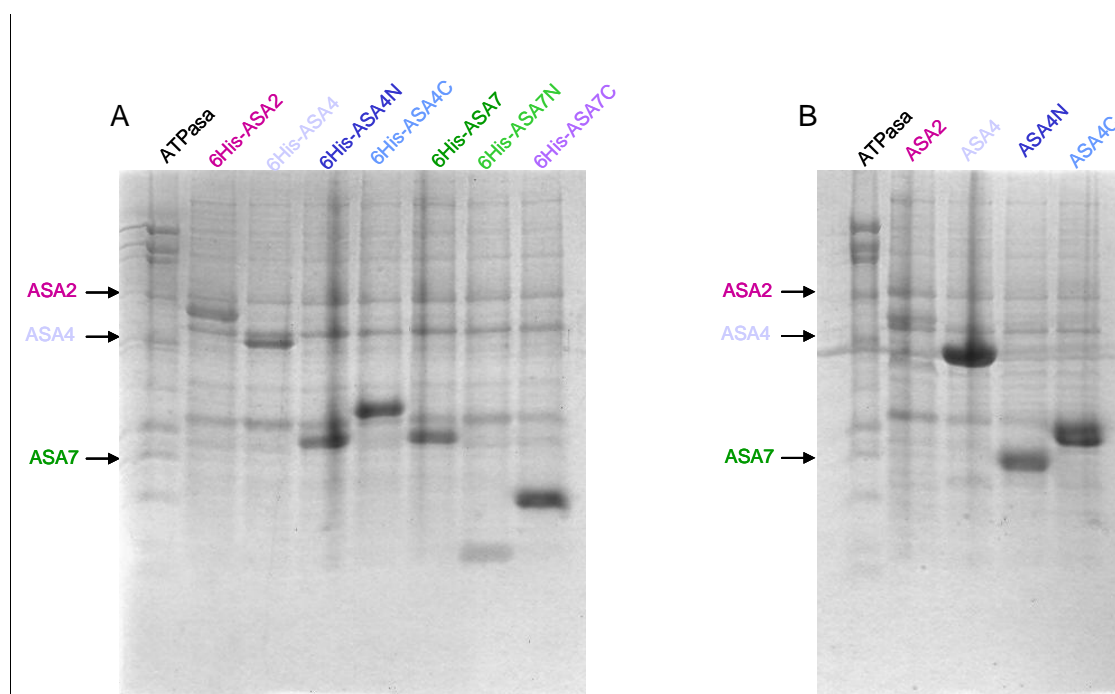


Figura 10. Expresión de las proteínas ASA2, ASA4, ASA4N, ASA4C, ASA7, ASA7N y ASA7C. A) Se señalan las proteínas expresadas en el vector pet28a y se comparan con las subunidades intrínsecas de la ATP sintasa. Se aprecia una diferencia en la masa molecular debido a la extensión de 19 aminoácidos que adiciona este vector a las proteínas recombinantes incluyendo la etiqueta de 6 histidinas. B) Se señalan las proteínas expresadas en el vector pet3a y se comparan con las subunidades intrínsecas de la ATP sintasa. A diferencia del vector pet28a, no se observa una diferencia en el peso molecular, puesto que este vector no adiciona ninguna extensión de aminoácidos. En ambos casos se observa una desigualdad en la masa de la subunidad ASA2 debido a que la proteína recombinante carece de 50 aminoácidos.

Sólo se llevó a cabo la purificación de las proteínas expresadas en el vector pet28a (Figura 11). Se utilizaron columnas de afinidad con níquel acoplado (ver materiales y métodos). Se dializó la muestra para replegar a la proteína y posteriormente se utilizó una columna de

intercambio iónico como segundo paso de purificación. La subunidad ASA4 y sus respectivas proteínas truncas fueron las más estables en amortiguador Tris 50 mM pH 8.0 y en Fosfatos 50 mM pH 7.8. Las subunidades ASA2, ASA7 y sus respectivas proteínas truncas fueron susceptibles a degradación en las mismas condiciones, pese a la adición de inhibidores de proteasas como el PMSF (Fenil metil sulfonil fluor) y el TLCK (Tosil lisina clorometil cetona) en la preparación. Por otra parte, la subunidad ASA7 y sus respectivos fragmentos resultaron no ser proteínas solubles estables; se probaron una gran variedad de amortiguadores (Acetato, Fosfatos, Mops, Tris y Caps) en un rango amplio de pHs (2, 4, 6, 8, 10) y en todas las condiciones no se logró estabilizar completamente a estas proteínas, pues tienden a agregarse y precipitarse. No obstante, se decidió trabajar con la proteína ASA7 y sus respectivos fragmentos en presencia de Fosfatos 50 mM pH 7.8. La subunidad OSCP y su respectiva proteína trunca pura también tienden a agregarse. Sin embargo, la mayor estabilidad se obtuvo en amortiguador Mes a pH 7.0.

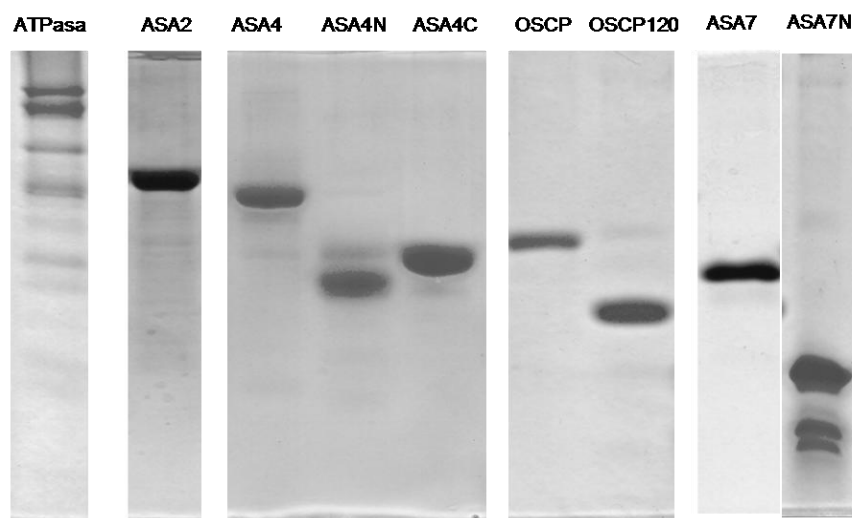


Figura 11. Patrón electroforético de las proteínas recombinantes puras. Se llevo a cabo la purificación de las proteínas que presentan etiqueta de histidina mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas con níquel acoplado y posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se observa la degradación de la proteína ASA7N.

Las cantidades de las proteínas recombinantes puras ASA2, ASA4, ASA4N, ASA4C y OSCP fue de aproximadamente 6mg. Mientras que la concentración de las proteínas ASA7, ASA7N, ASA7C y OSCP120 fue menor de 4 mg.

Con las proteínas puras se generaron anticuerpos específicos contra las subunidades, ASA2, OSCP y ASA7N, pues en laboratorio ya se contaba con anticuerpos específicos para

la subunidad ASA4. Además, se realizaron ensayos de dicroísmo circular para corroborar un buen plegamiento de las proteínas recombinantes.

3.3. Dicroísmo circular.

El dicroísmo circular (DC) es una técnica muy empleada en ingeniería de proteínas para comprobar que las proteínas recombinantes adquieran estructura secundaria después del tratamiento con agentes caotrópicos, siendo posible cuantificar la cantidad de estructura secundaria por residuo. La técnica consiste en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada (en miligrados), tanto a la derecha como a la izquierda, por compuestos quirales. Para ello, se obtiene un espectro de la absorción de la luz en el UV lejano (260 a 190 nm). Existen espectros característicos según los elementos estructurales que conforman a las proteínas (ver materiales y métodos). Generalmente, el espectro de una proteína plegada totalmente en α -hélices presenta un mínimo a 220 nm y otro a 208 nm. El espectro de una proteína en la que su estructura secundaria solamente es hojas β presenta un mínimo a 214 nm. Por otra parte, el espectro de una proteína sin estructura se mantiene muy cercano a cero en el rango 260 a 220 nm y posteriormente el espectro desciende a números negativos.

Para esta técnica es indispensable tener a las proteínas completamente puras y en condiciones solubles, por esta razón se obtuvieron únicamente los espectros de las proteínas ASA2, ASA4, ASA4N y ASA4C (Figura 12). Sus espectros fueron característicos de proteínas con estructura secundaria definida, es decir, las subunidades ASA2 y ASA4 con sus respectivas proteínas truncas son capaces de plegarse después del tratamiento con 6M de guanidina.

El espectro de la subunidad ASA2 es muy similar al espectro de una proteína con estructura secundaria predominante en hojas β . En el espectro obtenido para ASA4 se observa perfectamente los mínimos a 220 y 208 nm, aunque el mínimo a 208 nm es más pronunciado. Espectros de este tipo se han observado en proteínas de tipo $\alpha + \beta$. Es decir, cuentan con un dominio estructural en hojas β y otro dominio estructural de α -hélices.

Los espectros de las proteínas truncas presentan un mayor ruido hacia la región de los 210-195 nm. Es probable que estas proteínas, al tratarse de fragmentos de una subunidad, sean más inestables. Sin embargo, es posible apreciar los mínimos característicos a 220, por otra parte el 208 no es claro. La proteína ASA4N presenta un mínimo a 208 más pronunciado que

el fragmento ASA4C, sugiriendo que ASA4N presenta una mayor cantidad de hojas β en su estructura secundaria por residuo.

Hasta el momento no se conoce la estructura cristalográfica de alguna subunidad ASA, por lo tanto, no es posible saber si las proteínas se replegaron en su forma nativa. Por otra parte, los espectros obtenidos no son lo suficientemente claros para cuantificar el contenido de estructura secundaria por residuo de las diferentes proteínas recombinantes.

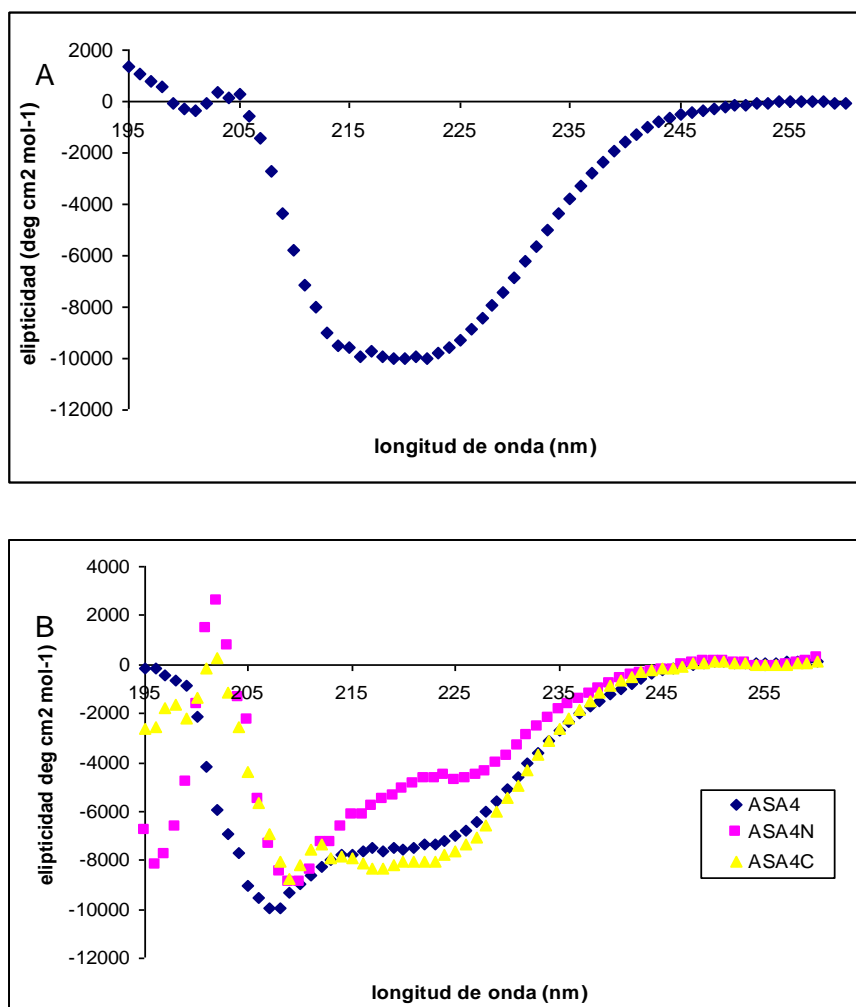


Figura 12. Espectros de dicroísmo circular (DC) de las proteínas recombinantes ASA2, ASA4, ASA4N y ASA4C. Los espectros de DC fueron realizados con 0.6 μ g de proteína en un barrido de longitud de onda de 260-195 a 10°C en amortiguador de fosfatos 20 mM y 100 mM de NaCl pH 7.8. En todos los casos se observa que las proteínas recombinantes presentan estructura secundaria. **A)** Espectro de la subunidad ASA2 donde se aprecia un mínimo a 220 nm característico de una proteína con α -helices. **B)** Espectro de la subunidad ASA4, ASA4N y ASAC, donde se puede observa que las proteínas ASA4 y ASAC tienen prácticamente la misma estructura secundaria, con un mínimo a 220 y otro mínimo más pronunciado a 208 nm, indicando la presencia de α -hélice. Sin embargo, ASA4N presenta una mayor cantidad de hojas β característica en un mínimo a 208 nm.

3.4. Co-purificaciones.

Una vez confirmado que las proteínas recombinantes adquieren estructura secundaria durante su replegamiento, se realizaron estudios de interacción con éstas. La interacción de las proteínas recombinantes se llevó a cabo siguiendo técnicas de co-purificación en columnas de cromatografía.

La proteína con etiqueta de 6His (expresada en el vector pet28a) se fija a una columna de afinidad con níquel acoplado a ella, posteriormente se hace pasar la proteína sin etiqueta (expresada en el vector pet3a). Se espera que si existe una interacción entre ambas proteínas en el interior de la columna, éstas co-eluyan al aplicar un gradiente de imidazol (30 a 500 mM). Por otra parte, si no existe interacción se espera que la proteína sin etiqueta eluya inmediatamente de la columna de níquel. Para evitar cualquier interacción inespecífica de la proteína sin etiqueta de 6His con el níquel, o bien con alguna otra proteína presente en el extracto crudo, se hace un control pasando únicamente la proteína sin etiqueta por la columna de níquel, donde se espera que ésta eluya inmediatamente, del mismo modo que cuando no existe interacción. Las proteínas recombinantes fueron detectadas por inmunoréplicas tipo western utilizando anticuerpos específicos contra cada una de ellas.

3.4.1. Co-purificación de las subunidades ASA7 y ASA4.

La cercanía de las subunidades ASA7 y ASA4 fue observada inicialmente por estudios de entrecruzamientos en el complejo enzimático puro (Tesis de maestría Edith Araceli Cano Estrada 2008). Estos estudios sugirieron que estas proteínas se encuentran interactuando para formar el brazo periférico de la enzima.

En los estudios de co-purificación con estas proteínas recombinantes se confirmó su interacción (Figura 13). La proteína ASA7 presenta una etiqueta de 6His (ASA7-6His), mientras que la proteína ASA4 carece de etiquetas. En el control del experimento se observa que la proteína ASA4 pasa de largo por la columna y el resto eluye en el lavado con 30mM de imidazol. Sin embargo, cuando la proteína ASA7-6His se encuentra fija en el interior de la columna se observa una clara co-elución debido a la formación de un subcomplejo entre estas proteínas.

Para revelar que región de la subunidad ASA4 interactúa con la subunidad ASA7, se realizó el mismo experimento con la proteína ASA7-6His y con la proteína ASA4N (Figura 13). El control del experimento tuvo un comportamiento similar al control anterior; es decir, la

proteína ASA4N eluyó inmediatamente de la columna. En el gradiente de 30 a 500 mM de imidazol no se detectó co-elución de este fragmento con ASA7-6His, sugiriendo que la región N-terminal de la subunidad ASA4 (residuos 1-154) no interactúa o bien interactúa muy débilmente con la subunidad ASA7-6His.

Finalmente se hizo el mismo experimento con las proteínas ASA7-6His y ASA4C (Figura13). En este experimento se obtuvo una clara co-purificación de ambas proteínas. En el control, el fragmento ASA4C también eluye inmediatamente de la columna como en los casos anteriores. Por lo tanto, el dominio C-terminal de la subunidad ASA4 (residuos 107-294) es la región responsable de la interacción y formación del subcomplejo con la subunidad ASA7.

Por otra parte, para conocer qué región de la subunidad ASA7 es responsable de la interacción con ASA4 se realizaron experimentos uniendo a la columna la proteína ASA7N o la proteína ASA7C. Posteriormente se hizo pasar a través de ella a la proteína ASA4 carente de etiqueta (Figura 14). Se obtuvo la co-purificación de las proteínas ASA4 y ASA7C. Sin embargo, no se observó interacción de las proteínas ASA4 y ASA7N. Concluimos, que la subunidad ASA7 interactúa con la subunidad ASA4 por medio de su dominio C-terminal (74-176). Para confirmar la interacción de las regiones C-terminal de ambas proteínas, se realizó el experimento fijando a la columna el fragmento ASA7C y pasando a través de ella al fragmento ASA4C, obteniendo su co-purificación (Figura14).

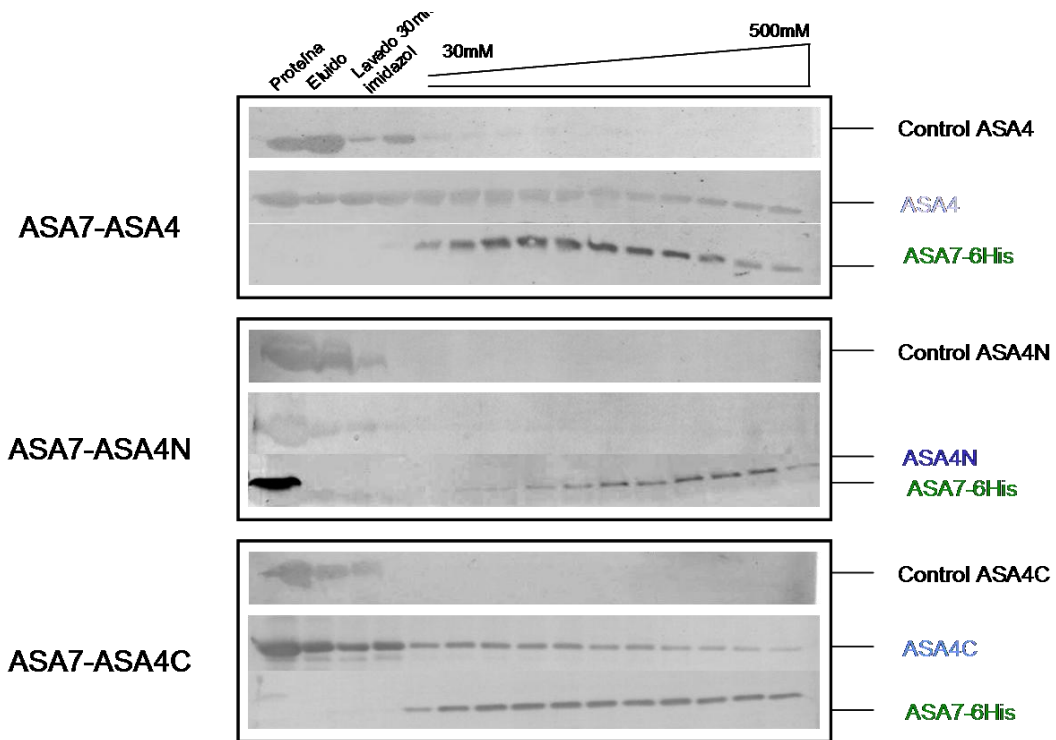


Figura 13. Co-purificación de las proteínas ASA7 y ASA4 con sus respectivos fragmentos. En la parte superior de cada panel se observa el control del experimento donde solo se purifica la proteína ASA4, ASA4N o ASA4C sin etiqueta de histidinas, en la parte inferior de cada control se muestra la co-purificación de la subunidad ASA7-6His con la proteína ASA4, ASA4N o ASA4C. En los carriles marcados como proteína, eluido y lavado con 30 mM de imidazol se detectaron únicamente a la proteína ASA4, ASA4N o ASA4C, mientras que en las fracciones del gradiente de imidazol se muestra que la proteína ASA7 co-eluye solamente con las proteínas ASA4 y ASA4C. Se observa que la co-elución de ASA7 con la proteína ASA4N es prácticamente nula.

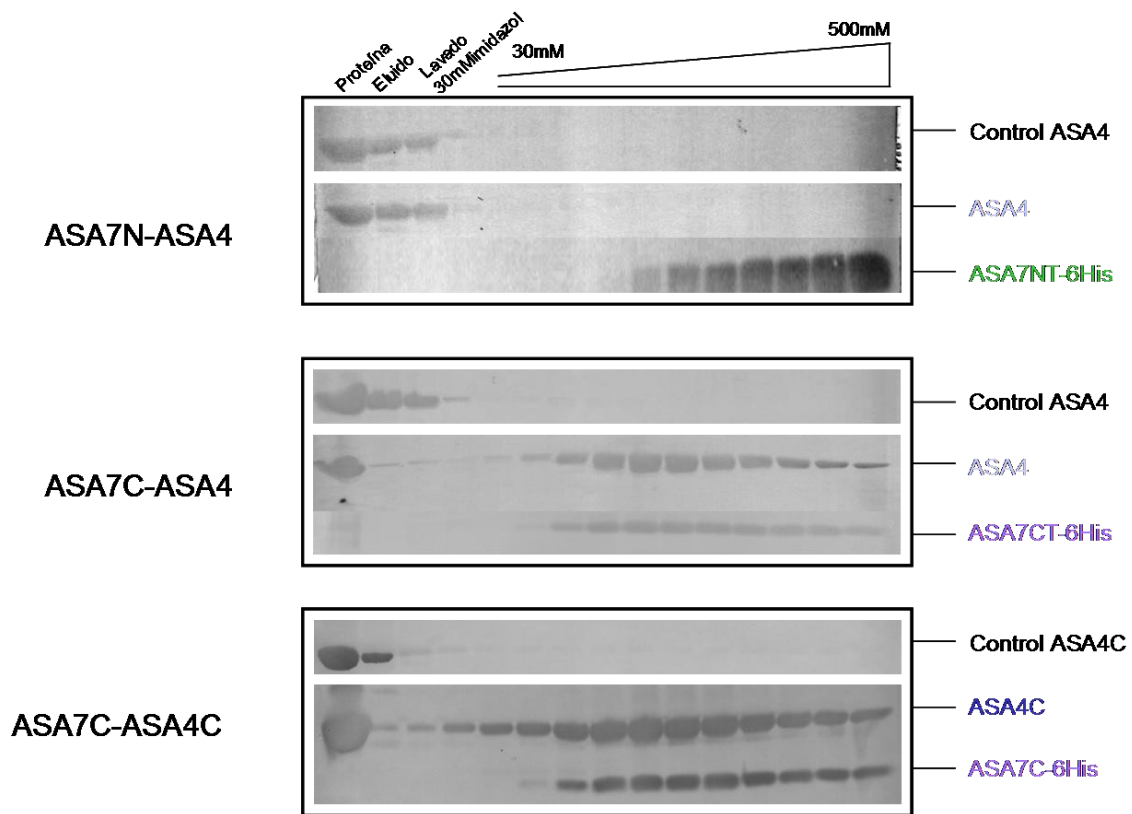


Figura 14. Co-purificación de los fragmentos ASA4 con los fragmentos de la subunidad ASA7. En la parte superior de los dos primeros paneles se observa el control del experimento donde sólo se purifica la proteína ASA4 sin etiqueta de histidinas. En la parte inferior de estos controles se muestra la co-purificación de la proteína ASA7N-6His o ASA7C con la proteína ASA4. En los carriles marcados como proteína, eluido y lavado con 30 mM de imidazol se detectaron únicamente a la proteína ASA4, mientras que en las fracciones del gradiente de imidazol se muestra que únicamente el fragmento ASA7C co-eluye con la proteína ASA4. No se observó alguna interacción de la proteína ASA4 con la proteína ASA7N. En el último panel se realizó la co-purificación de los fragmentos C-terminales de las proteínas ASA4 y ASA7, con su respectivo control, donde se observa una co-elución clara.

3.4.2. Co-purificación de las subunidades ASA2 y ASA7.

Otras de las subunidades que estarían interactuando para la formación del brazo periférico son las subunidades ASA2 y ASA7. Estudios de entrecruzamientos en la enzima pura, utilizando dos diferentes reactivos, demostraron su cercanía (Vazquez-Acevedo y cols. 2006, Cano Estrada y cols. 2010). Estudios de interacción por medio de co-purificación confirmaron este resultado. La proteína ASA7-6His se fijó a la columna y la proteína ASA2 que carece de etiqueta se eluyó a través de ella. Ambas proteínas interactuaron en el interior de la columna, formando un subcomplejo y co-eluyendo con un gradiente de 30 a 500 mM de imidazol (Figura 15). En el control la proteína ASA2 eluyó inmediatamente de la columna.

Se realizó el mismo experimento con los dos fragmentos de la proteína ASA7 para conocer cuál de ellos es el responsable de la interacción con la subunidad ASA2. Sin embargo, con ninguno de los dos fragmentos hubo una co-elución clara (Figura 15). A diferencia del control, la proteína ASA2 era capaz de retenerse en el interior de la columna cuando se encontraba unido en su interior cualquiera de los dos fragmentos de la proteína ASA7, pero no se observó co-elución entre ellas. Estos experimentos sugieren que tanto la región N-terminal (residuos 1-77) como la región C-terminal (residuos 74-176) de la proteína ASA7 son importantes para llevar a cabo la interacción con la subunidad ASA2.

Por otra parte, cabe señalar que la proteína ASA2 carece de ciertos aminoácidos tanto en su dominio N-terminal (7 residuos), como en su dominio C-terminal (43 residuos) que posiblemente hace que la interacción con la subunidad ASA7 sea débil.

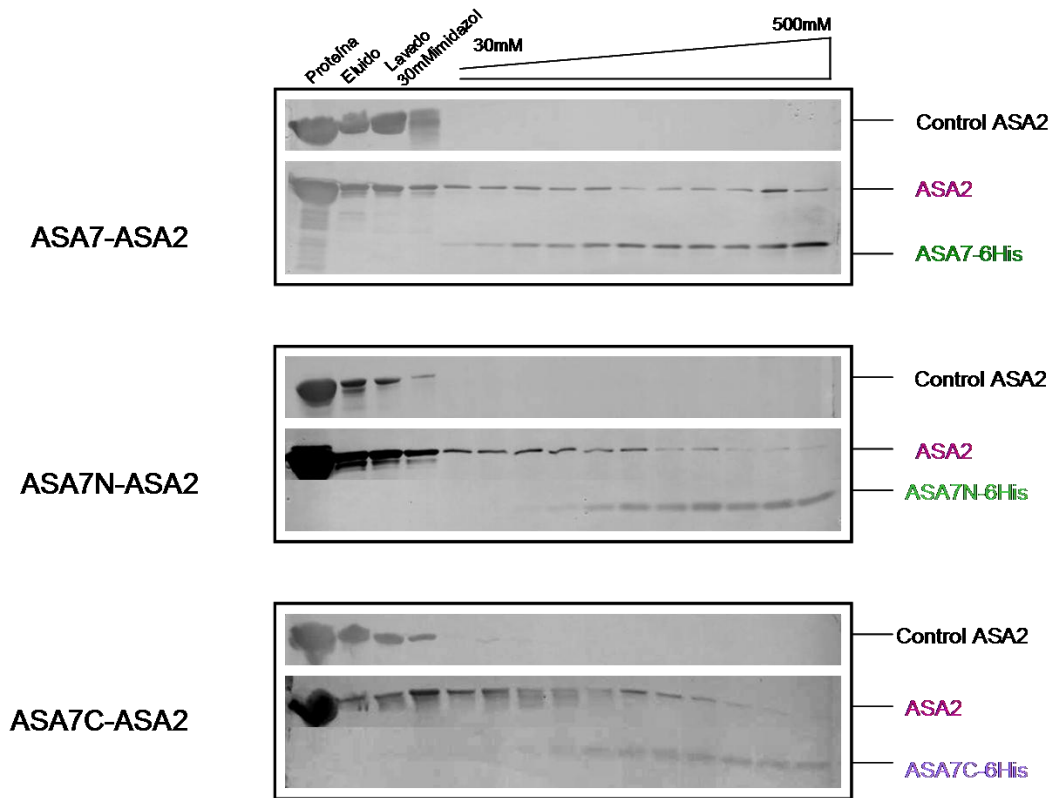


Figura 15. Co-purificación de las subunidades ASA2 y ASA7 con sus respectivos fragmentos. En la parte superior de cada panel se observa el control del experimento donde sólo se purifica la proteína ASA2 sin etiqueta de histidinas, en la parte inferior de cada control se muestra la co-purificación de la subunidad ASA7-6His, ASA7N o ASA7C con la proteína ASA2. En los carriles marcados como proteína, eluido y lavado con 30 mM de imidazol se detectó únicamente a la proteína ASA2, mientras que en las fracciones del gradiente de imidazol se muestra que la proteína ASA7 co-eluye solamente con las proteínas ASA2. No se observó una co-elución de la proteína ASA2 con los fragmentos de la proteína ASA7, pero a diferencia del control, la proteína ASA2 es capaz de retenerse en la columna sugiriendo una interacción débil de las proteínas.

3.4.3. Co-purificación de las subunidades ASA2 y ASA4.

La cercanía de las subunidades ASA2 y ASA7 fue uno de los resultados más contundentes en los estudios de entrecruzamiento realizados con el complejo enzimático puro, ya que se obtuvo con todos los reactivos utilizados. La formación de este subcomplejo se obtuvo por medio de estudios de co-purificación, pese a la carencia de 50 aminoácidos en la subunidad ASA2. La proteína ASA2 con etiqueta de 6His (ASA2-6His) se fijó a la columna y posteriormente se cargó a la proteína ASA4 que carece de etiqueta. Ambas proteínas interactuaron para formar un subcomplejo y eluir juntas con el gradiente de 30 a 500 mM de imidazol (Figura 16).

Para determinar que región de la subunidad ASA4 interactúa con la subunidad ASA2 se realizó el experimento manteniendo unida a la columna la proteína ASA2-6His y pasando por ella cada uno de los fragmentos de la subunidad ASA4. La proteína ASA4N eluyó inmediatamente de la columna, es decir, ésta no interactuó con la proteína ASA2-6His. Por el contrario, la proteína ASA4C sí interactuó con la subunidad ASA2-6His (Figura 16). En los controles de estos experimentos las proteínas sin etiqueta de histidina eluyeron inmediatamente de la columna, corroborando así la co-elución de la proteína ASA4 y del fragmento ASA4C con la proteína ASA2-6His. Por lo tanto, el dominio C-terminal de la subunidad ASA4 (residuos 107-294) también es la región responsable de la interacción con la subunidad ASA2 en la formación del brazo periférico.

Lamentablemente, estos tipo de experimentos utilizando la proteína recombinante de OSCP y OSCP trunca en los últimos 120 aminoácidos no se llevaron a cabo, quedando pendientes para experimentos posteriores de reconstitución *in vitro* del brazo periférico con esta subunidad e incluso con el dominio F₁ de la enzima.

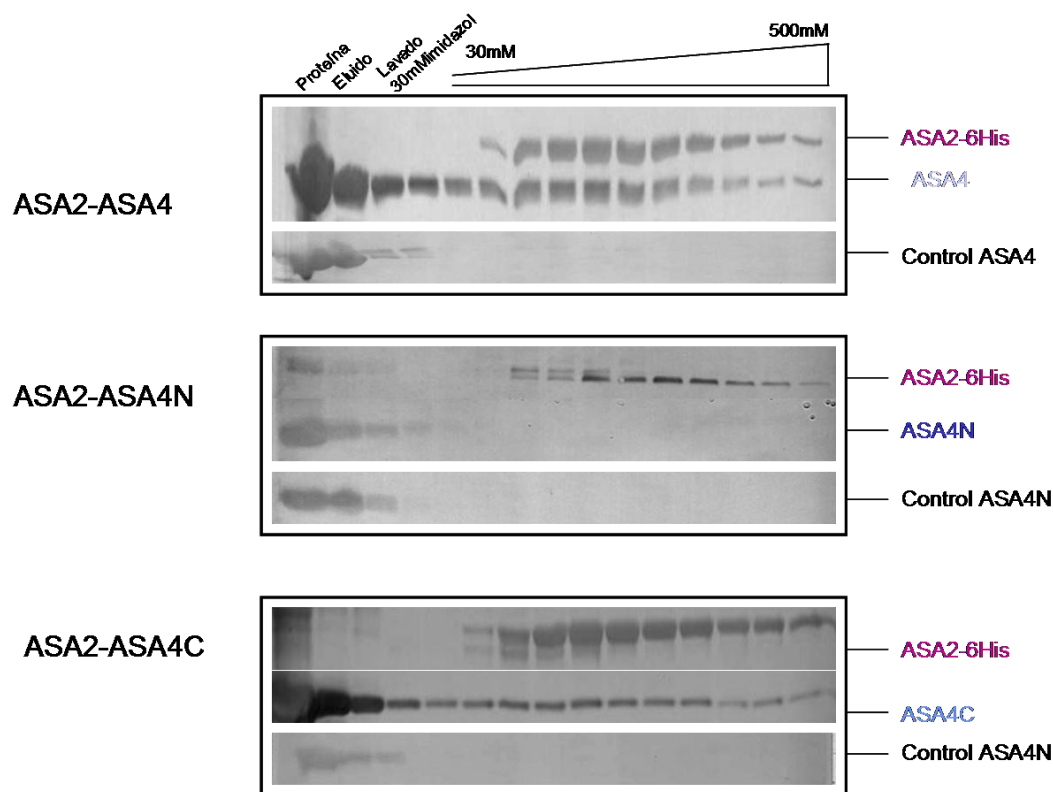


Figura 16. Co-purificación de las proteínas ASA2 y ASA4 con sus respectivos fragmentos. En la parte superior de cada panel se observa el control del experimento donde sólo se purifica la proteína ASA4, ASA4N o ASA4C sin etiqueta de histidinas, en la parte inferior de cada control se muestra la co-purificación de la subunidad ASA2-6His con la proteína ASA4, ASA4N o ASA4C. En los carriles marcados como proteína, eluido y lavado con 30 mM de imidazol se detectaron únicamente a la proteína ASA4, ASA4N o ASA4C, mientras que en las fracciones del gradiente de imidazol se muestra que la proteína ASA2-6His co-eluye solamente con las proteínas ASA4 y ASA4C. Se observa que la co-elución con la proteína ASA4N es prácticamente nula.

4. Modelo estructural de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 del alga *Polytomella sp.*

La estructura tridimensional de las proteínas es desconocida hasta el momento, además estas subunidades ASA no tienen similitud significativa con alguna otra proteína en la base de datos, haciendo más difícil la predicción de estructura terciaria. El modelaje molecular es una herramienta para obtener una aproximación de su estructura.

Robetta es un servidor de la Universidad de Washington que modela estructuras terciarias de proteínas (<http://robetta.bakerlab.org/>). Este servidor usa el programa Rosseta para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas. Generalmente, los programas de predicción de estructura se basan en la búsqueda de homólogos cuya estructura cristalográfica es conocida, pues se asume que el plegamiento de una proteína sería muy similar a su proteína homóloga. Sin embargo, este programa es capaz de predecir la estructura de una proteína totalmente nueva, es decir que no cuenta con homólogos significativos en la base de datos. El programa fracciona a la proteína y contrasta la secuencia de aminoácidos de cada fragmento contra una base de datos de estructuras resueltas. En cada caso, se utiliza una función para evaluar la compatibilidad de la secuencia a la estructura, obteniéndose así posibles modelos tridimensionales. Si la secuencia de aminoácidos de algún fragmento de la proteína no tienen compatibilidad con alguna estructura conocida, el programa hace el plegamiento de novo para esos fragmentos. Este servidor arroja como resultado 5 posibles modelos para la proteína. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades ASA2 y ASA4 fueron sometidas a este programa para la predicción de su estructura terciaria (Figura 17).

Por otra parte, el modelo estructural de la subunidad ASA7 se obtuvo del servidor Zhang Lab de la Universidad de Michigan, utilizando el programa Quark (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>). Este programa hace la predicción *ab initio* de la estructura terciaria de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos, es decir no utiliza como templado a ninguna estructura cristalográfica conocida. Los modelos obtenidos son construidos por fragmentos de 20 aminoácidos basándose en la conformación de mínima energía que adquieren. La desventaja de este programa es que sólo es posible modelar proteínas de 200 aminoácidos como máximo. El programa Quark propone 10 posibles conformaciones estructurales para la proteína.

Para elegir el mejor modelo de cada subunidad se tomó en cuenta que estas proteínas forman parte del brazo periférico de la enzima, por lo que podrían tener cierta similitud a nivel de estructura terciaria con las proteínas que forman el brazo periférico de las ATP sintasas mitocondriales ortodoxas. Se ha observado que las proteínas *b*, *d*, F_6 de bovino adquieren una estructura alargada dentro de la estructura del brazo periférico de la enzima, permitiendo la interacción entre ellas. Por lo tanto, se eligieron los modelos de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 que presentaban una conformación más elongada. (Figura 17).

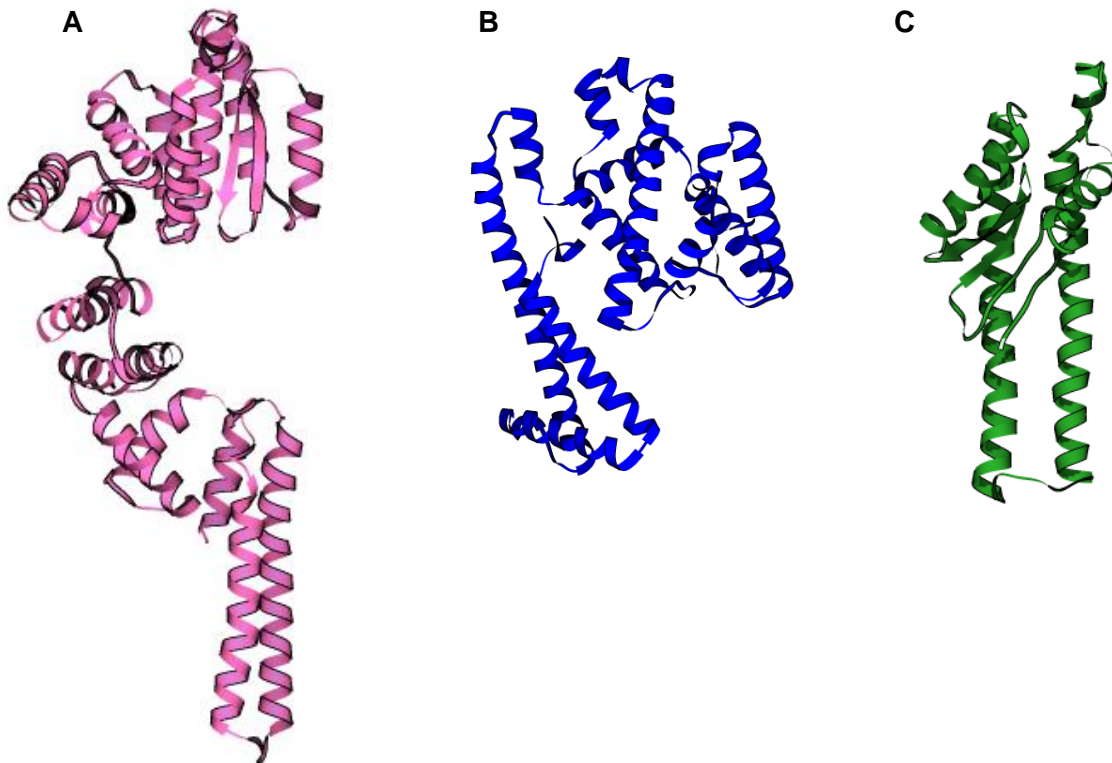


Figura 17. Modelo estructural de la subunidad ASA2, ASA4 y ASA7. **A)** Modelo estructural de la subunidad ASA2 hecho en el servidor Robetta. Esta subunidad carece de los primeros 7 y de los últimos 43 aminoácidos. Está formada de 407 y tiene una masa molecular de 38.5 kDa. **B)** Modelo estructural de la subunidad ASA4 hecho en el servidor Robetta. Está compuesta por 294 aminoácidos y tiene una masa molecular de 31.2 kDa. **C)** Modelo estructural de la subunidad ASA7 hecho en el servidor Zhag. Está compuesta de 176 aminoácidos y tiene una masa molecular de 19.5 kDa.

5. Estudio de anclaje con los modelos de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7.

Los estudios de anclaje son muy recurridos, sobretodo en el diseño de fármacos, para conocer la región probable de unión de un ligando (molécula pequeña) con su proteína receptora. Sin embargo, también se puede llevar acabo el anclaje proteína-proteína y conocer las regiones de posible interacción para la formación de un complejo.

Existen algunos servidores en el internet donde pueden llevarse acabo predicciones de este tipo. Vakser Lab de la Universidad de Kansas es uno de ellos. Este servidor utiliza el programa GRAMM (rango global de marcajes moleculares) para localizar las regiones intermoleculares de mínima energía más probables para la formación de un complejo. En este servidor (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/resources/gramm/grammx/>) se llevó acabo el estudio de anclaje para la interacción de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7. Primero se realizó entre las subunidades ASA4 y ASA7 restringiendo la posibilidad de interacción en la región C-terminal de ambas subunidades (residuos 107-294 de la subunidad ASA4 y residuos 74-176 de la subunidad ASA7).

Una vez obtenido el modelo estructural del subcomplejo ASA4-ASA7 se predijo el anclaje de éste con la subunidad ASA2. El modelo final del complejo debía de cumplir con el resultado de interacción observado en la proteína ASA2 con la región C-terminal de la proteína ASA4 (residuos 107-294) y entrar en contacto con aminoácidos presentes tanto en la región N-terminal (residuos 1-77) y C-terminal (residuos 73-176) de la subunidad ASA7. Además, de acuerdo a los experimentos de entrecruzamientos (Vázquez-Acevedo y *cols.* 2006), grupos aminos intermoleculares deben estar a una distancia no mayor de 12 Å; y los grupos sulfhidrilos presentes en la subunidad ASA4 deben de estar a una distancia no mayor de 16 Å de los grupos aminos de las subunidades ASA2 y ASA7.

El modelo estructural del complejo que mejor se ajustó a los resultados experimentales presenta una longitud de 135Å; en él la subunidad ASA2 interactuaría por medio de su región N-terminal tanto con la subunidad ASA4 como con la subunidad ASA7 (Figura 18).

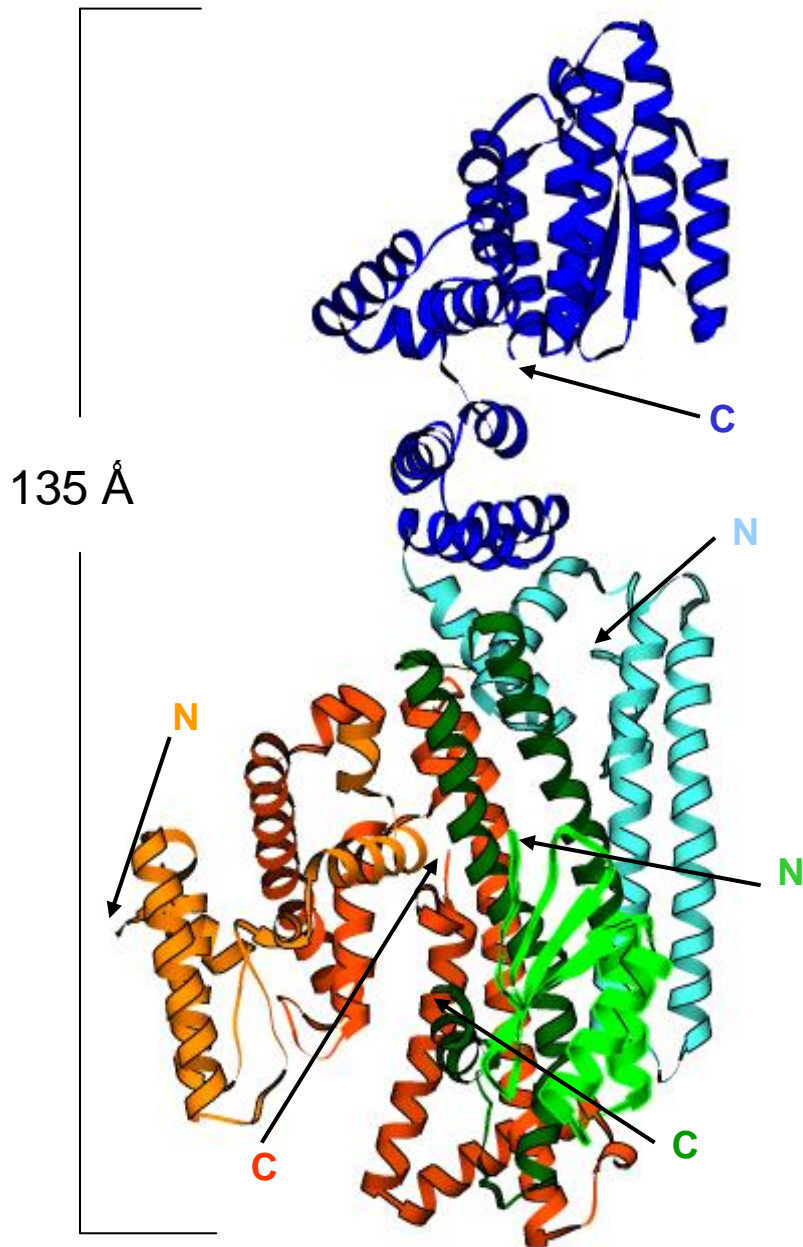


Figura 18. Modelo estructural del complejo ASA2, ASA4 y ASA7. Modelo obtenido por medio del anclaje proteína-proteína realizado en el servidor vakser lab (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/resources/gramm/grammx/>). Utilizando los modelos elegidos para las subunidades ASA2 (en azul), ASA4 (en naranja) y ASA7 (en amarillo). Este modelo cumple con los resultados de interacción obtenidos experimentalmente y tiene una longitud de 135 Å. Según este modelo estructural, la subunidad ASA2 interactuaría por medio del su región N-terminal con las subunidades ASA4 y ASA7.

6. Modelo tridimensional de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

Actualmente es posible encontrar numerosos estudios estructurales de la ATP sintasa. Dado que hasta el momento no se ha logrado la cristalización de la enzima completa, se ha recurrido a otras herramientas para conocer más acerca de su estructura, una de ellas es la obtención del modelo tridimensional.

Un modelo tridimensional del complejo enzimático de *Polytomella sp.* revelaría la estructura general que presenta esta enzima y aportaría información sobre el volumen que ocupan las subunidades ASA dentro del complejo. Por lo tanto, estudios de este tipo se llevaron a cabo en Upstate Medical University en Syracuse Nueva York, en el laboratorio del Dr. Stephan Wilkens. Para ello, se realizó un paso de purificación diferente utilizando un gradiente de glicerol en presencia del detergente digitonina, utilizando la enzima proveniente de la columna de intercambio iónico. La enzima obtenida en las fracciones del gradiente fue diluida y utilizada para la obtención de micrografías, empleando tinción negativa con acetato de uranilo. Se obtuvieron 9300 imágenes de la enzima que se agruparon en 59 clases de acuerdo a su orientación (Figura 19). Estas imágenes fueron alineadas y proyectadas sobre la estructura de alta resolución del hexámero $\alpha_3\beta_3$ de *Bacillus PS3* (1Sky.pdb) y del anillo de subunidades *c* de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 20). Siete subsecuentes proyecciones independientes al modelo cristalográfico fueron llevadas a cabo para el refinamiento del modelo tridimensional.

La mayoría de las imágenes obtenidas muestran a la enzima lateralmente, pues ésta tendía a inclinarse sobre la rejilla de carbón, muy pocas imágenes fueron obtenidas de la parte superior y/o inferior del complejo. Esta falta de información limitó la obtención de un modelo tridimensional completo. En el modelo obtenido, no fue posible la resolución total de los robustos brazos periféricos, la gran masa que se aprecia en la parte superior del complejo en las imágenes de microscopía electrónica no está presente en el modelo tridimensional (Figura 21). En contraste, la parte membranal fue resuelta completamente, es posible apreciar una gran masa y el nacimiento de los brazos periféricos en esta región, donde parecería que el brazo de un monómero se une al dominio F_1 del otro monómero. El arreglo de los monómeros forma un ángulo de 50° y éstos sólo se unen por la región membranal, pues los dominios F_1 de cada monómero están distantes uno del otro (Figura 21).

Con el modelo tridimensional obtenido fue posible hacer el alineamiento de la estructura cristalográfica utilizada en el primer alineamiento, así como la estructura cristalográfica del subcomplejo F_1C_{10} de *Saccharomyces cerevisiae* (1qo1.pdb), dejando al descubierto el volumen correspondiente al estator del complejo (Figura 22)

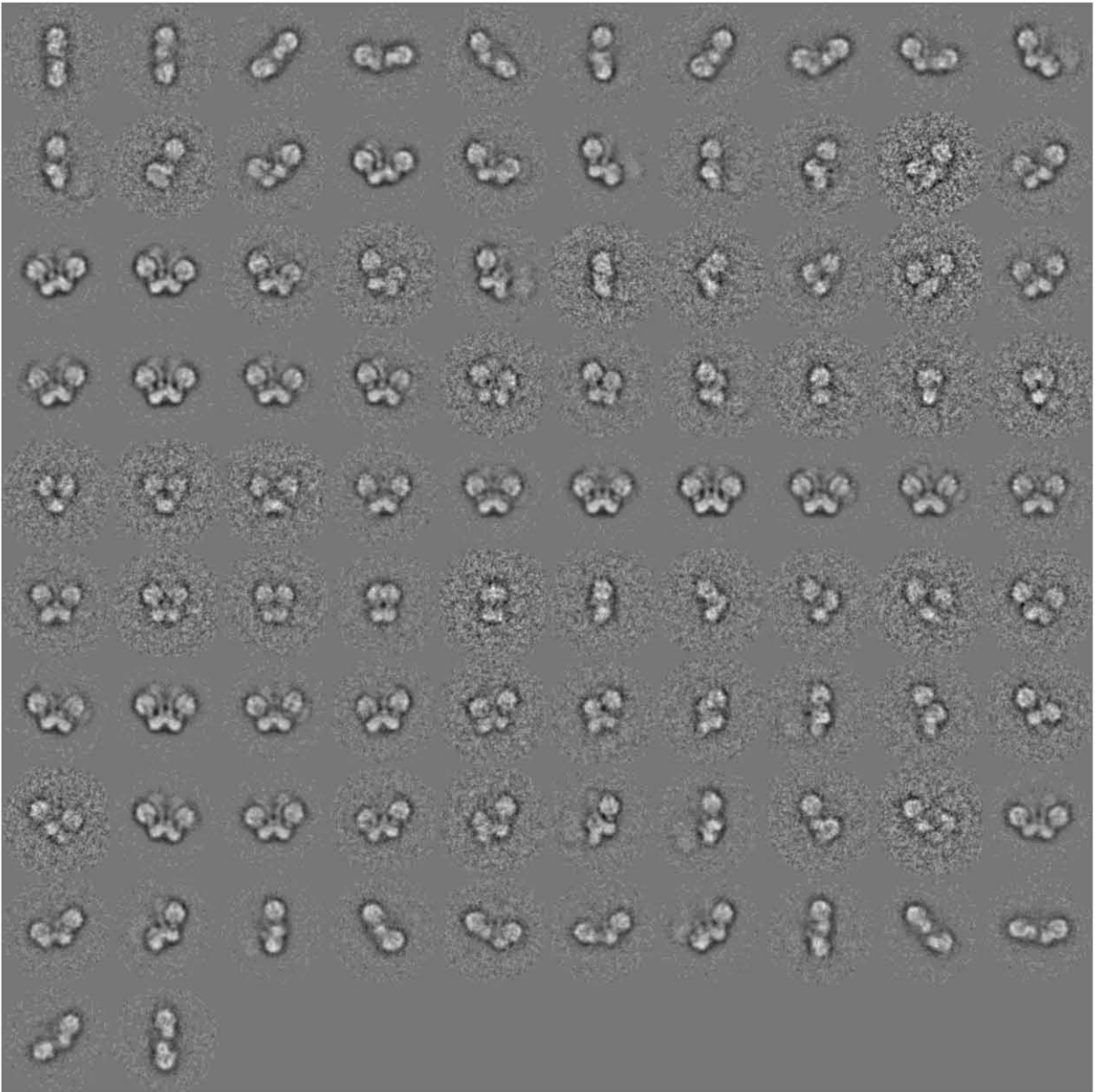


Figura 19. Promedio de moléculas obtenidas por microscopía electrónica del dímero de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* Se muestran las diferentes clases en las que fueron agrupadas las imágenes del dímero de ATP sintasa y que se utilizaron para la elaboración del modelo tridimensional.

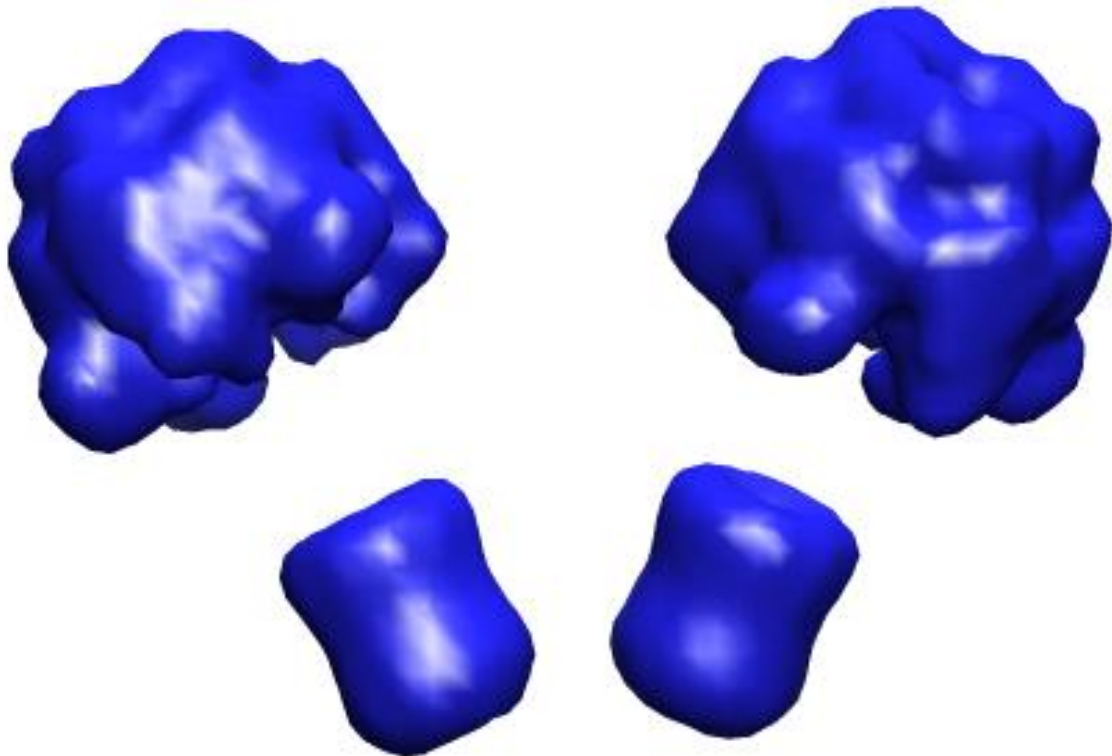
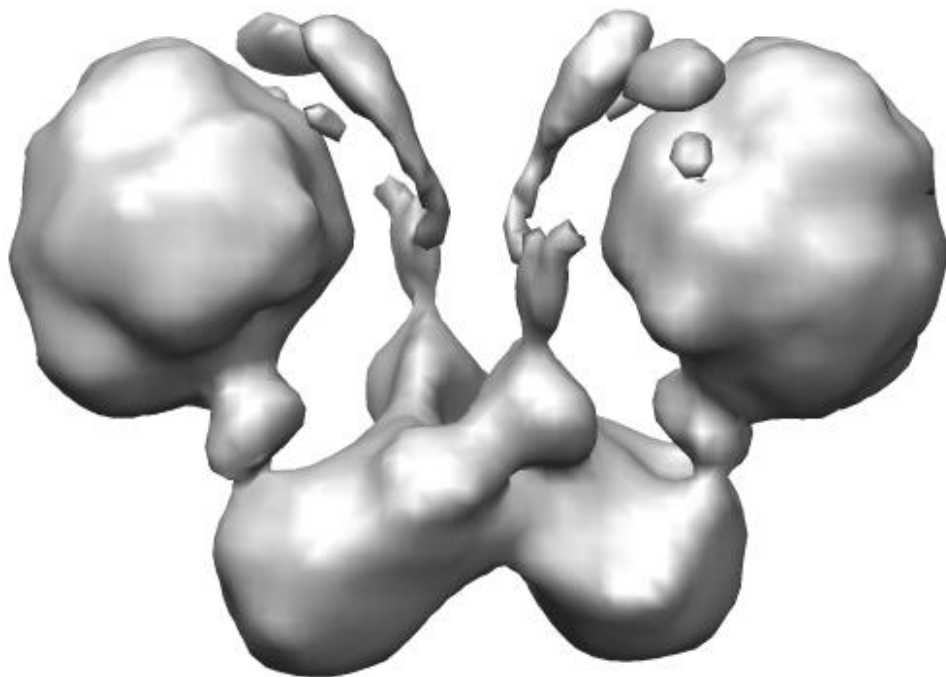


Figura 20. Modelo tridimensional del hexámero $\alpha_3\beta_3$ y del anillo de subunidades *c*. Este modelo tridimensional resultó de la proyección de las imágenes de microscopía electrónica del dímero de ATP sintasa de *Polytomella sp.* sobre la estructura de alta resolución del hexámero $\alpha_3\beta_3$ (1sky.pdb) y del anillo de subunidades de *c* de levadura. Sobre este modelo se realizó un nuevo paso de proyecciones de las imágenes obtenidas.

A



B

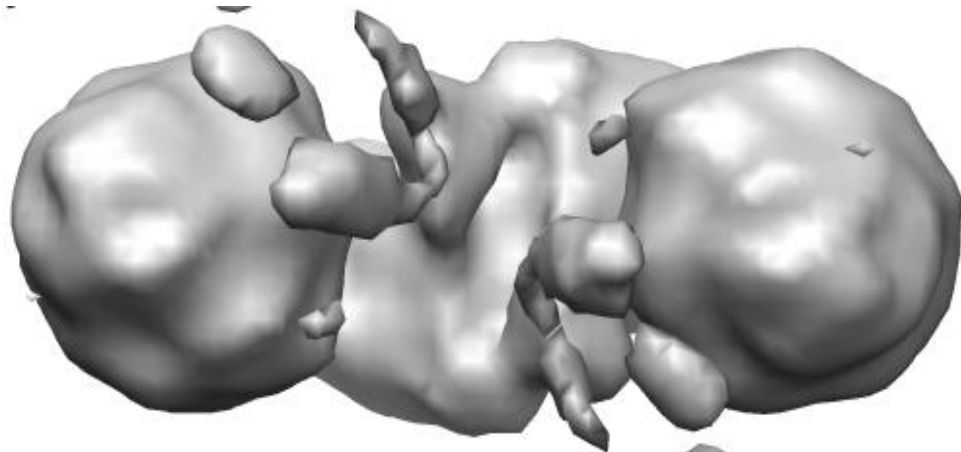


Figura 21. Modelo tridimensional del dímero de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* A) Vista lateral del modelo tridimensional. Se aprecia la presencia de unos brazos bastante robustos, que parecen emerger de la parte inferior de un monómero hasta la parte superior del otro monómero. **B)** Vista superior del modelo tridimensional. Se aprecia que el modelo no pudo ser resuelto completamente, debido a la carencia de suficientes micrografías de esta vista de la enzima.

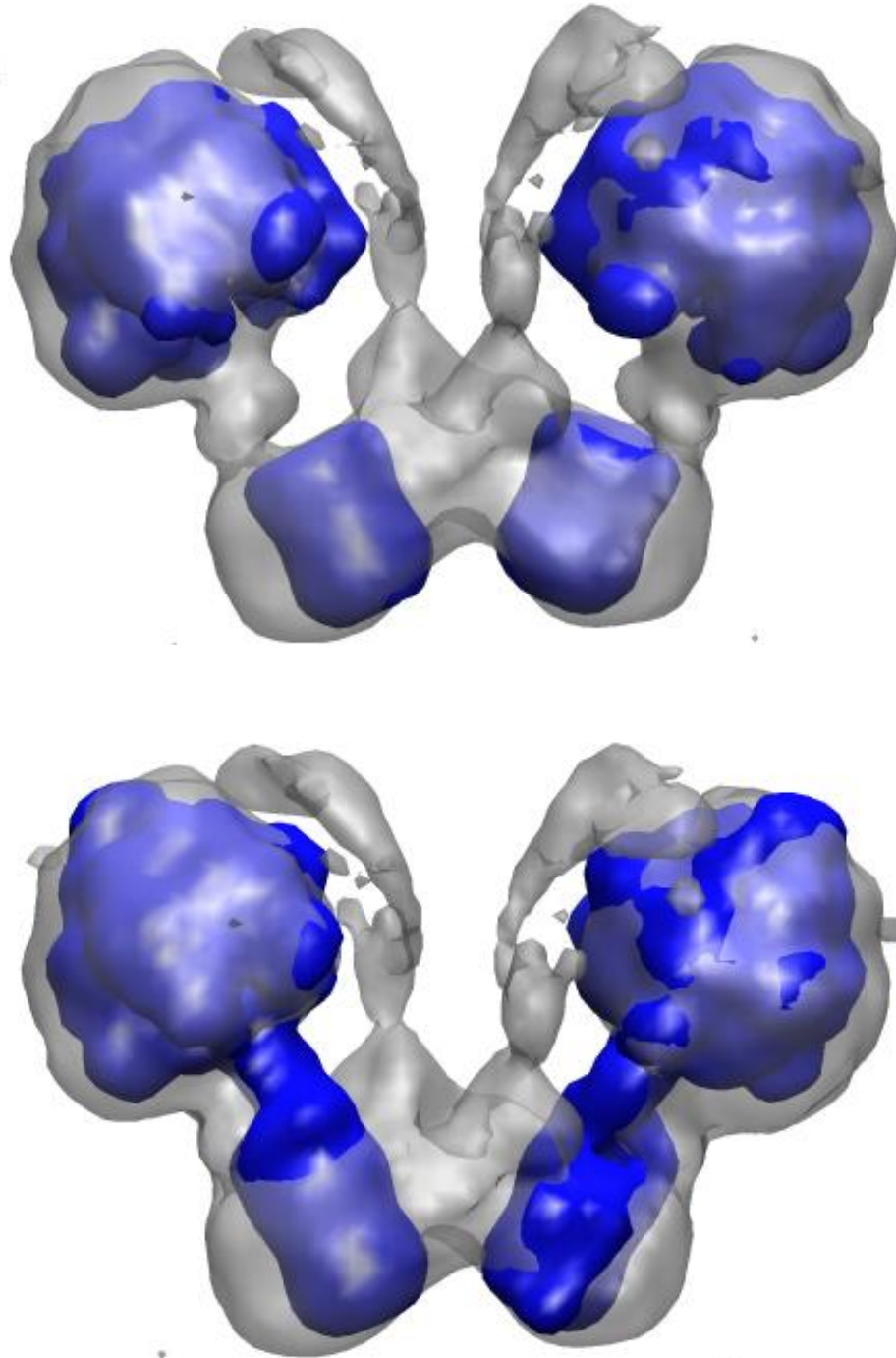


Figura 22. Alineamiento de estructuras cristalográficas sobre el modelo tridimensional del dímero de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* En ambos paneles se muestra el volumen que forma el estator de la enzima y que, por lo tanto, ocupan las nuevas subunidades ASA. A) Alineamiento de la estructura cristalográfica de hexámero $\alpha_3\beta_3$ de *Bacillus ps3* (1sky.pdb) y del anillo de subunidades c de levadura. B) Alineamiento de la estructura cristalográfica del subcomplejo F_1c_{10} de *Saccharomyces cerevisiae* (1qo1.pdb).

7. Sobreposición del modelo estructural del brazo periférico dentro del modelo 3D de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

Es común observar en estudios estructurales de la ATP sintasa y otros complejos enzimáticos la sobreposición de estructuras cristalográficas de sus subunidades dentro del modelo tridimensional del complejo.

En este trabajo también se hizo la sobreposición manual del modelo del arreglo de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 obtenido por el anclaje molecular, con el fin discernir si el modelo de la estructura terciaria de las subunidades, así como su arreglo estructural propuesto, pueden apegarse a lo que se esperaría en realidad.

Cabe señalar que la estructura tridimensional del brazo periférico no fue resuelta completamente, tampoco el modelo de la subunidad ASA2 está completo. Sin embargo, con la información disponible y asumiendo que el dominio C-terminal de la subunidad ASA2 se encuentra en el extremo opuesto a su dominio N-terminal, se proponen dos posibles escenarios para la sobreposición del complejo de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7, debido a que no fue posible conocer qué región de la subunidad ASA2 interactúa con la subunidad OSCP. La primera opción es consistente con el modelo propuesto del arreglo topológico de las subunidades ASA, se considera que la subunidad ASA2 podría estar interactuando por medio su dominio N-terminal con la subunidad OSCP; y las subunidades ASA4 y ASA7 se localizarían en la parte superior del complejo (Figura 23B), según el arreglo estructural de las subunidades propuesta por el anclaje. En la segunda opción, la subunidad ASA2 interactuaría con la subunidad OSCP por medio de su dominio C-terminal, tal y como ocurre con la subunidad *b* de la ATP sintasa de bovino. En este caso, las subunidades ASA4 y ASA7 se localizarían de manera periférica a la membrana (Figura 23A), según el arreglo estructural de las subunidades propuesto por el anclaje molecular. En este panorama la localización de la subunidad ASA1 se propone en la parte superior del complejo.

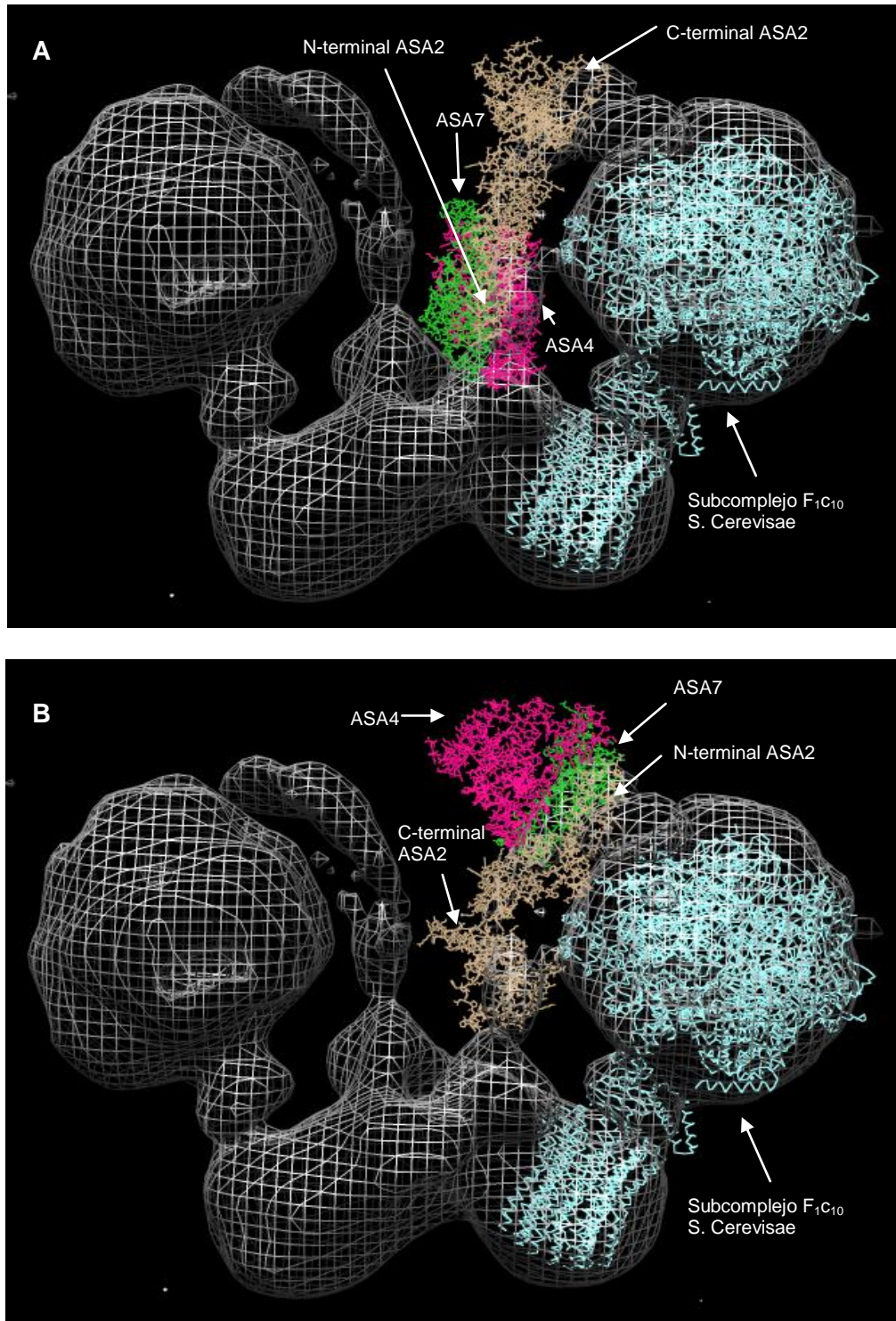


Figura 23. Sobreposición del complejo estructural del subcomplejo ASA2, ASA4 y ASA7 en el modelo 3D del complejo enzimático. A) Se muestra el arreglo del subcomplejo de tal forma que la interacción de la subunidad ASA2 con la subunidad OSCP sea por medio de su dominio C-terminal. **B)** Se muestra el arreglo del subcomplejo de tal forma que la subunidad ASA2 interactúe con la subunidad OSCP por medio de su dominio N-terminal.

Discusión

Se ha demostrado que la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas posee nueve subunidades atípicas, ASA1-ASA9, que sustituyen a las subunidades clásicas que componen al estator de la enzima mitocondrial ortodoxa, confiriéndole así una estructura característica. Los genes que codifican para las proteínas ASA1 a ASA9 se encontraron en el genoma del alga *Chlamydomonas reinhardtii* y del alga *Volvox carteri* (Cardol y cols. 2005, Prochnik y cols. 2010). Sin embargo, el genoma de *Polytomella sp.* no se encuentra secuenciado, por lo que la contraparte de estas proteínas fueron identificadas inicialmente por secuenciación de su región N-terminal (Vázquez-Acevedo y cols. 2006). En este trabajo, las secuencias completas de los componentes de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* fueron obtenidas por medio de PCR a partir de una genoteca del alga clonada en el fago λ -ZAPII. Todas las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos GenBank, aunque no todos los componentes de la ATP sintasa del alga se lograron amplificar exitosamente. Las subunidades ASA2 y ASA3 se obtuvieron parcialmente, mientras que para las subunidades ASA9 y ϵ fue necesaria su construcción a partir de la base de datos de EST's de *Polytomella parva* (Mallet y cols. 2006). Lo mismo sucedió con las subunidades ASA5 y *a*, aunque éstas se construyeron sólo parcialmente. La secuenciación de estas subunidades fue fundamental para realizar su caracterización *in silico*. Todas ellas tienen un alto porcentaje de similitud (arriba del 40%) con sus contrapartes de la ATP sintasa del alga *C. reinhardtii* y se predice una estructura secundaria similar en las subunidades ASA de ambas algas. Las subunidades ASA6, ASA8, ASA9, *a* y *c* predicen ser proteínas de membrana; su secuencia de aminoácidos predice dos, uno, uno, seis y dos cruces transmembranales respectivamente. Las subunidades ASA5 y OSCP presentan hidrofobicidad en su región N-terminal y para el resto de las subunidades que componen a la ATP sintasa de las algas clorofíceas se predicen proteínas totalmente solubles. Esta información fue fundamental para proponer un modelo estructural de la ATP sintasa.

El complejo enzimático de *Polytomella sp.* conserva el núcleo catalítico y el rotor de la enzima, por lo tanto presenta homólogos de las subunidades α , β , γ , δ , ϵ y *c*; de las subunidades que componen al estator de la enzima sólo se conservan las subunidades OSCP y *a*. Las subunidades catalíticas α y β comparten una similitud arriba del 60% con las subunidades catalíticas del complejo enzimático de bovino, siendo éstas las más conservadas, ya que las subunidades γ , δ , ϵ , OSCP y *c* comparten únicamente alrededor de un 30% de similitud. No obstante, la subunidad OSCP de *Polytomella sp.* conserva los residuos Lys28, Ala21, Ala25, los cuales son importantes en la interacción con la subunidad

α en la ATP sintasa del bovino (Carbajo y cols. 2007). Para obtener mayor información sobre la topología de un complejo es necesario estimar la estequiometría de las subunidades que lo componen. En la ATP sintasa es bien conocido que las subunidades catalíticas α y β , se conservan en una estequiometría de 3:3, formando un hetero-hexámero y que los componentes del tallo central, γ , δ y ϵ , se encuentran en una estequiometría de 1:1:1, mientras que la estequiometría de subunidad c varía según la especie. Por otra parte, gracias a la reconstitución *in vitro* del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial ortodoxa, tanto del bovino como de la levadura, fue posible calcular su estequiometría marcando radiactivamente a las subunidades que lo componen, b , d , F_6 y OSCP obteniendo una estequiometría 1:1:1:1 (Collison y cols. 1994, 1996, Bateson y cols. 1999). Hasta el momento, la ATP sintasa bacteriana es la única que presenta un brazo periférico formado por un dímero de subunidades b (Revington y cols. 1999, McLachlin y cols. 1997, Del Rizzo y cols. 2002).

En este trabajo la aproximación de la estequiometría se llevó a cabo marcando residuos de cisteína con agentes fluorescentes. La utilidad de estos reactivos en el estudio estructural de complejos ha sido probada en el receptor sensorial bacteriano (Falke y cols. 1988), en el estudio de la H^+ ATPasa de cloroplastos, (Snyder and Hammes 1985), así como en el marcaje de histonas para el estudio estructural del nucleosoma (Chung and Lewis 1986). Los datos obtenidos sugieren que las subunidades ASA4, ASA3 y ASA5 presentan una estequiometría de 1:1:1, respecto a la subunidad catalítica β . Se sugiere que el resto de las subunidades ASA tendrían la misma estequiometría, según el análisis de geles desnaturizantes teñidos con el colorante azul de Coomassie. Sin embargo, es importante llevar a cabo más estudios para confirmar esta hipótesis.

Estudios de entrecruzamiento con reactivos bifuncionales son una herramienta importante cuando se estudia la topología de complejos enzimáticos. Se han llevado a cabo en la caracterización del complejo mitocondrial bc_1 de bovino (González-Halphen y cols. 1988), así como en la ATP sintasa de bovino (Joshi y Burrows, 1990, Minauro-Sanmiguel y cols. 2002) y en la ATP sintasa de la levadura (Velours y Arselin, 2000). Estudios de este tipo con la ATP sintasa pura de *Polytomella sp.* llevaron a proponer que el brazo periférico de la enzima está formado por las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 (Cano-Estrada y cols. 2010), ya que se obtuvieron productos de entrecruzamiento contundentes con diferentes reactivos de las subunidades ASA2 + ASA4 y ASA2 + ASA7, incluso, se obtuvo un entrecruzamiento de las

tres subunidades, ASA2 + ASA4 + ASA7. Una segunda estrategia empleada para determinar interacción de subunidades de un complejo proteico es la disociación de éste para la formación de subcomplejos. En la generación de subcomplejos se asume que las interacciones proteína-proteína se conservan igual que en el complejo intacto. Siguiendo la técnica de disociación con detergente se logró obtener un subcomplejo entre la subunidad ASA2 y OSCP (Cano-Estrada y cols. 2010), confirmando que la subunidad ASA2 forma parte del brazo periférico de la enzima, junto con las subunidades ASA4 y ASA7. El subcomplejo formado por estas tres proteínas podría ser el equivalente estructural y funcional de la subunidad *b* de la ATP sintasa ortodoxa, siendo la proteína principal formadora del brazo periférico de la ATP sintasa de las algas clorofíceas. Pero, a diferencia de la subunidad *b*, la subunidad ASA2 está formada por 461 aminoácidos, que son más del doble de residuos que forman a la subunidad *b* de bovino (de 214 aminoácidos) y además es una proteína completamente hidrofílica, es decir carece del dominio membranal característico de la subunidad *b*.

El brazo periférico de la ATP sintasa de bovino se encuentra bien caracterizado, está compuesto por una sola copia de las subunidades *b*, *d*, F_6 y OSCP (Collison y cols. 1994, Dickson y cols. 2006, Rees y cols. 2009). Su masa molecular se estima en 75 kDa mientras y una longitud aproximada de 145Å. Por otra parte, la masa molecular de las subunidades ASA2, ASA4, ASA7 y OSCP es de aproximadamente 120 kDa. Esta diferencia en masa molecular puede apreciarse en imágenes de microscopía electrónica, donde la ATP sintasa de las algas clorofíceas presenta un brazo periférico mucho más robusto que el observado en la ATP sintasa de bovino o levadura.

Para detallar la interacción de estas subunidades y proponer un modelo estructural del brazo periférico de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* es indispensable investigar el ensamble *in vitro* de un posible estator, como se ha hecho en el estudio de la estructura del brazo periférico de la enzima de bovino (Collison y cols. 2004) y en el estudio del estator de la V-ATPasa de levadura (Oot y cols. 2010). Un enfoque más directo, sería la cristalización del complejo completo del alga.

Para el estudio de interacción *in vitro* de la subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 se realizaron experimentos de co-purificación. Se recurrió a la producción de cantidades abundantes de las proteínas involucradas mediante su expresión en la bacteria *Escherichia coli*. Se ha

observado que algunas proteínas sobrepresadas, en especial las proteínas que tienen propiedades hidrofóbicas, tienden a acumularse en cuerpos de inclusión de la bacteria. Ejemplo de esto son las subunidades OSCP y *b* del estator de la ATP sintasa de bovino que se purifican a partir de cuerpos de inclusión, debido a que presentan regiones hidrofóbicas. Por el contrario, la subunidad F6 y *d* son obtenidas de la región soluble después de la precipitación de los componentes de membrana y del ADN bacteriano (Collison y cols. 1994). Las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 fueron recuperadas de cuerpos de inclusión usando 6M de guanidina, a pesar de tratarse de proteínas hidrofílicas, pues parecen ser proteínas altamente inestables cuando están aisladas y que tienden fácilmente a la agregación. Las proteínas ASA2 y ASA4 se estabilizaron utilizando 0.1% de detergente durante su purificación, pero para la proteína ASA7 su estabilidad dependió de la presencia del resto de las proteínas recombinantes, sobretodo de la subunidad ASA4, pues se observó una fuerte interacción de ellas en los experimentos de co-purificación.

Los experimentos de co-purificación ratificaron la interacción observada previamente en estudios de entrecruzamientos entre las subunidades ASA2 + ASA4, ASA2 + ASA7, y ASA4 + ASA7 (Vázquez-Acevedo y cols. 2006, Cano Estrada 2008, Cano-Estrada y cols. 2010). El mismo experimento usando los fragmentos de las proteínas ha mostrado que el dominio C-terminal de la subunidad ASA4 es la región principal encargada de la interacción con las subunidades ASA2 y ASA7. Sin embargo, se predice que la región de la proteína ASA4 que tiende a formar hélices entrecruzadas, responsables de la interacción proteína-proteína, es el dominio N-terminal, por lo tanto se espera que esta región interactúe con alguna otra subunidad del complejo, probablemente sea con la proteína ASA1, pues esta subunidad también predice hélices entrecruzadas en su estructura. La región C-terminal de la subunidad ASA7 interactúa únicamente con la subunidad ASA4, entonces, la interacción entre ambas subunidades se lleva a cabo por medio de sus dominios C-terminales. Se observó que la interacción de la subunidad ASA7 con la subunidad ASA2 es más débil que la interacción con la subunidad ASA4. Esto probablemente se deba a la falta de varios aminoácidos en la proteína recombinante ASA2. El modelo del arreglo estructural de las subunidades propone que la región compuesta de los primeros 130 residuos de la proteína ASA2 participa en la interacción tanto con la subunidad ASA4 como con la subunidad ASA7, dejando libre su región C-terminal para interactuar con la subunidad OSCP, tal y como se lleva a cabo en la ATP sintasa de bovino con la subunidad *b* y la subunidad OSCP (Rees y cols. 2009) o en la ATP sintasa de bacterias con la subunidad *b* y la subunidad δ (Dmitriev y

cols. 1999, Dunn y cols. 1998). Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios de interacción *in vitro* de las proteínas recombinantes ASA2, OSCP y OSCP120 para comprobar esta hipótesis. Por otra parte, la fragmentación de la proteína ASA7 en dos regiones afectó la formación del subcomplejo con la proteína ASA2, revelando que ambos fragmentos contienen aminoácidos importantes para la interacción del complejo ASA2-ASA7.

Según el modelo estructural de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 hecho por estudios de anclaje de proteínas, la interacción de estas subunidades es a través de α -hélices. Dentro de esta estructura se detectaron los principales residuos involucrados en la formación del subcomplejo. En la interfase de ASA4-ASA7 destacan los aminoácidos ASA4_Lys107, ASA4_Lys291, ASA4_Ala224, ASA7_Phe133, ASA7_Val144, ASA7_Pro145. En la interfase de ASA2-ASA7 destacan los aminoácidos ASA2_Asp1, ASA2_Ser59, ASA2_Asn62 que interactúan con ASA7_Glu85, ASA7_Arg67, ASA7_Ser137 respectivamente. Todos ellos se encuentran conservados en las algas *C. reinhartii*, *Polytomella sp.* y *Volvox carteri* (ver anexo III). Finalmente en la interfase de ASA2-ASA4 destacan los aminoácidos ASA2_Ala58, ASA2_Val121, ASA4_Gly189, ASA4_Asn192. La predicción de estos aminoácidos resulta interesante para realizar en un futuro mutaciones específicas en ellos y corroborar su participación en la interacción de dichas subunidades. Cabe señalar que la ATP sintasa tiene una longitud de aproximadamente 150Å desde la superficie de la membrana hasta la parte más alta; mientras que el modelo propuesto presenta una longitud de aproximadamente 135Å; por lo que nuestro modelo puede encajar perfectamente en el brazo periférico de la enzima. Además, hay otras subunidades ASA formando parte del estator y que podrían alargar el estator lo necesario para tener la longitud apropiada.

En este trabajo se obtuvo un modelo tridimensional del dímero de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* En el modelo se puede observar la base de los brazos periféricos bastante robustos que emergen del dominio membranal, donde parece que el brazo periférico de un monómero se extiende hasta la parte más alta del otro monómero. De comprobarse esta estructura, la disociación de la enzima daría lugar a un monómero no funcional. Estudios bioquímicos previos demostraron que la forma dimerica es la estructura estable del complejo y que al disociarse en monómeros pierde su estabilidad, observándose una disminución en su actividad (Villavicencio-Queijeiro y cols. 2009). En las imágenes de microscopía electrónica se observa una masa considerable en la parte más alta del estator de la enzima (Dudkina y cols. 2005, Cano-Estrada y cols. 2010). Esta masa no fue resuelta en el modelo

tridimensional debido a la falta de suficientes imágenes y a la resolución de las mismas. Sin embargo, de acuerdo con el arreglo topológico de las subunidades (Cano-Estrada y cols. 2010) y al modelo estructural obtenido en este trabajo, se esperaría que esta masa estuviera formada por las subunidades ASA2 y ASA4, aunque no se descarta la posibilidad de que la subunidad ASA1 se encuentre en la parte superior de la enzima, como ha sido propuesto por otros autores (van Lis y cols. 2007, Dudkina y cols. 2006)

Por otra parte, el modelo tridimensional obtenido difiere de otro modelo tridimensional propuesto (Dudkina y cols. 2010). Este nuevo modelo presenta una menor densidad en la región membranal y por el contrario, presenta un mayor volumen en la región soluble, principalmente en la parte de interacción de la subunidad OSCP con el dominio F_1 de la enzima. El dominio F_1 también presenta interacciones con los brazos periféricos, que a su vez entran en contacto entre sí. Cabe mencionar que estos modelos fueron elaborados utilizando técnicas microscópicas diferentes, uno de ellos es por tinción negativa y el otro por criomicroscopía. Incluso, la técnica para aislar el dímero de la ATP sintasa también fue distinta, aunque dada la estabilidad del complejo este último factor no debería ser determinante. Por lo tanto, resulta necesario completar nuestro modelo propuesto para ratificar dicha estructura y observar las diferencias entre ambos modelos, sobretodo en la estructura de los brazos periféricos.

El modelo hecho del subcomplejo ASA2, ASA4 y ASA7 se ajustó a la densidad electrónica del modelo tridimensional de la ATP sintasa dimérica de *Polytomella sp.* Aunque la densidad del tallo periférico no está completamente resuelta, la masa molecular del complejo parece ajustarse bien en la masa de densidad electrónica esperada en el brazo periférico. Sin embargo, la falta de información sobre la región de interacción de la subunidad ASA2 con la subunidad OSCP y la falta de 43 aminoácidos en su región C-terminal, fueron limitantes para definir la orientación de este subcomplejo dentro del mapa de densidad electrónica.

Hasta el momento, existe suficiente evidencia experimental de la interacción de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 y de la interacción de la subunidad ASA2 con la subunidad OSCP. A su vez, se propone que la subunidad ASA1 juega también un papel importante en el estator de la enzima. Se ha demostrado su interacción con la subunidad ASA7, pero aún no hay evidencia experimental suficiente para conocer la posición de esta subunidad dentro del complejo. Sin embargo, al disociar con calor a la enzima se observa

que las primeras subunidades en desprenderse de la enzima son ASA2, ASA4, ASA7 y OSCP, sugiriendo que la localización de la subunidad ASA1 dentro del complejo es fundamental para su estabilidad estructural, ya que su interacción con el resto de subunidades (membranales o del núcleo catalítico) parece ser más fuerte.

Pese a las salvedades antes mencionadas, el modelo obtenido en este trabajo es el primer modelo tridimensional propuesto para la sección principal del brazo periférico de la ATP sintasa del alga clorofícea *Polytomella sp.*

.

.

CONCLUSIONES

La presencia de las subunidades ASA1 a 9 en la ATP sintasa mitocondrial es exclusiva del linaje de las algas clorofíceas. Homólogos de estas subunidades sólo se han encontrado en el complejo enzimático de las algas *Clhamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Polytomella parva* y *Polytomella sp.*, teniendo entre sí un porcentaje de similitud mayor al 50%. La ATP sintasa de las algas clorofíceas poseen una estructura atípica debido a la presencia de estas nuevas subunidades. La enzima presenta un estator muy robusto que le confiere una gran estabilidad. Actualmente, el origen evolutivo del brazo periférico de esta ATP sintasa mitocondrial aún es desconocido. Estos polipéptidos no presentan similitud con las subunidades clásicas que componen al estator del resto de las ATP sintasas mitocondriales ni con alguna otra proteína en la base de datos, complicando un poco más su estudio.

La investigación de la topología de estas subunidades es de gran interés para proponer un modelo estructural de la ATP sintasa. Se propuso que las subunidades ASA5, ASA6, ASA8, ASA9 forman parte del sector Fo según sus características hidrofóbicas predichas a partir de su secuencia de aminoácidos; mientras que las subunidades ASA1, ASA2, ASA3, ASA4 y ASA7 son proteínas hidrofílicas que están orientadas hacia la matriz mitocondrial formando parte esencial del brazo periférico de la enzima. Se comprobó que una sola copia de las subunidades ASA4, ASA3 y ASA5 está presente en el complejo enzimático y se sugirió que el resto de las subunidades ASA tiene la misma estequiometría.

En el modelo tridimensional preliminar del dímero de ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* se observa cómo es que sus brazos robustos se extienden desde el dominio Fo hasta la parte más alta del dominio F₁ y cómo éstos no entran en contacto, descartando su participación en la dimerización de la enzima. Por lo tanto, hasta el momento se ha sugerido que sólo las subunidades ASA6 y ASA9 podrían desempeñar este papel en el complejo.

Las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 interactúan para formar el brazo periférico de la ATP sintasa de las algas clorofíceas. Se sugiere que, a pesar de poseer un poco más del doble de residuos que las subunidades *b*, *d* y F₆ que forman el brazo periférico del bovino, su estructura secundaria es similar. Se requiere de un arreglo estructural elongado para unir ambos dominios de la enzima mediante la interacción de sus componentes. Al parecer, en la ATP sintasa de las algas clorofíceas, la proteína ASA2 se encarga de unir al estator con el dominio F₁ a través de su interacción con la subunidad OSCP, aunque los detalles de esta interacción son aún desconocidos. Se reveló que las subunidades ASA4 y ASA7 interactúan

por medio de sus dominios C-terminales. La interacción de las subunidad ASA4 con la subunidad ASA2 también es mediante su región C-terminal y parece no afectarse por la falta de aminoácidos tanto en la región N-terminal como en la región C-terminal de la proteína ASA2. Por el contrario, la interacción de la proteína ASA2 con la proteína ASA7 sí parece estar afectada por esta falta de aminoácidos. Además, tanto la región N-terminal como la región C-terminal de la subunidad ASA7 parecen contener aminoácidos importantes para la formación del subcomplejo ASA2-ASA7.

Con base en el arreglo estructural de los modelos de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 propuesto se planteó que la subunidad ASA2 interactúa por su región N-terminal con las subunidades ASA4 y ASA7, y que su región C-terminal esta disponible para interactuar con la subunidad OSCP. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la orientación del subcomplejo en la enzima sea diferente a la propuesta. Para descartar otras posibilidades es necesario realizar más experimentos de interacción, o bien obtener la estructura cristalográfica de estas subunidades. Pero, por el momento, los modelos son la única herramienta que se tienen para sugerir un posible plegamiento de las subunidades y así proponer una posible interacción.

El presente trabajo ha sido el primero en detallar la interacción de las subunidades que componen un brazo periférico atípico, cuyo arreglo estructural resulta novedoso; y que sin lugar a duda será el comienzo de muchos trabajos más sobre esta interesante enzima.

PERSPECTIVAS

Estudios recientes sobre la estructura de la ATP sintasa de las algas clorofíceas han ayudado a obtener un modelo topológico de esta enzima. Pero, aún faltan muchos detalles de la estructura por ser revelados y muchas preguntas por resolver.

Es indispensable conocer la estructura cristalográfica de las subunidades, dado que no existe algún homólogo de las proteínas en las bases de datos, resulta complicado saber si los modelos estructurales obtenidos de cada subunidad se apegan a las estructuras reales. En este estudio, nos percatamos que las proteínas aisladas de las subunidades ASA son inestables, por lo que su cristalización individual resulta complicada. Por esta razón se propone tratar de obtener la estructura cristalográfica de un subcomplejo, como ASA4-ASA7 cuya interacción observada fue bastante estable y además, inventigar cómo la subunidad ASA4 estabiliza a la proteína ASA7.

Por otra parte, el estudio de la interacción de subunidad OSCP con el brazo periférico de la enzima es fundamental para entender completamente cómo es el arreglo estructural. Es posible que la presencia de esta subunidad en la interacción de ASA2, ASA4 y ASA7 sea fundamental para estabilizar aun más al subcomplejo. Una vez obtenido éste, sería posible ampliar el estudio estequiométrico cuantificando las relaciones molares de las proteínas recombinantes dentro del subcomplejo y adicionalmente se podrían realizar estudios de reconstitución del brazo periférico con el dominio F_1 de la ATP sintasa.

También es necesario incluir en el estudio del estator de la enzima a la subunidad ASA1, pues parece jugar un papel muy importante. Estudios previos han sugerido que ASA1 interactúa con subunidades hidrofóbicas como ASA8, *a*, *c*, y por otra parte debido a su carácter hidrofílico, su interacción con la subunidad ASA7 y su gran masa molecular (compuesta de más de 600 aminoácidos) le han llevado a postularse como la proteína que se encuentra en la parte más alta del estator del complejo. Experimentos de interacción *in vitro* de esta subunidad serán fundamentales para entender que papel desempeña dentro del estor y proponer un arreglo estructural con el resto de las subunidades ASA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los amortiguadores utilizados en los métodos se encuentran descritos en el Anexo IV.

1. Purificación de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

Polytomella sp. (198.80, E.G. Pringsheim) se obtuvo de la colección de algas de la Universidad de Göttingen. Se incubaron las células en 2 litros de medio MAP (pH 7) durante 48 horas a 25°C sin agitación en condiciones aeróbicas. Al medio se le adiciona previamente 200 µg de vitaminas.

Las mitocondrias se obtuvieron por centrifugación diferencial utilizando amortiguador de mitocondrias. Se determinó la concentración de proteína de las mitocondrias por el método de Lowry (Peterson 1977). Posteriormente se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml con amortiguador de solubilización a una concentración final de 2 g de LM/g de proteína. El solubilizado se dejó en agitación por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 35 000 rpm por 20 minutos con el rotor 60Ti. El sobrenadante se dializó durante 2 horas en amortiguador de diálisis. El dializado se cargó a una columna de intercambio aniónico DEAE Biogel equilibrada con amortiguador de equilibrio. La ATP sintasa eluyó con un gradiente de 0 a 125 mM de cloruro de sodio en el amortiguador de equilibrio. Se concentraron las fracciones con ayuda de un ultra filtro Amicon utilizando una membrana YM100. Posteriormente el concentrado se cargó a un gradiente de glicerol del 15 al 40% en amortiguador de Lutter (Minauro-Sanmiguel y cols. 2005). La mezcla se ultracentrifugó durante 17 horas a 15 000 rpm en rotor SW-28 a 4°C. Finalmente, se concentraron las fracciones del gradiente que contenía la enzima pura.

2. Marcaje de los residuos de cisteína con reactivos fluorescentes.

Los residuos de cisteína de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* se marcaron con los reactivos fluorescentes fluoresceína 5-maleimida y 5-iodoacetoimido fluoresceína (Pierce) bajo condiciones desnaturizantes. Para llevar a cabo la reacción se desnaturizaron 200 µg de enzima pura con SDS (Dodecil sulfato de sodio) y DTT a concentraciones finales de 1% y 15 mM respectivamente, durante 30 minutos. Para la reacción con fluoresceína 5-maleimida, se eliminó previamente el DTT dializando la muestra dos veces a temperatura ambiente, usando una membrana con un corte de 3500 Da, contra 100 ml de amortiguador de diálisis. La enzima desnaturizada se incubó por dos horas a 4°C con los reactivos fluorescentes en una concentración diez veces mayor a la concentración molar estimada de los grupos tioles (1.4 mM concentración final). El exceso de reactivo se eliminó por centrifugación utilizando

una jeringa con resina Sephadex G50-fina, previamente equilibrada con amortiguador de equilibrio.

La proteína marcada se cargó a un gel de Tricina SDS-PAGE al 12% (Shägger and von Jagow 1987) en concentraciones crecientes de proteína (17.5, 24.5, 35, 42, 52.5 70 y 87.5 μg). Para obtener las subunidades de la ATP sintasa marcadas, el gel se analizó a 532 nm en Typhoon 9400 (GE Health care) y la intensidad de fluorescencia se cuantificó usando el programa McBiophotonics imagen. Finalmente se graficó la concentración de la proteína contra la intensidad de fluorescencia de las subunidades marcadas y se calculó la estequiometría de las subunidades correspondientes.

3. Estudio de microscopía electrónica.

Para realizar los estudios de microscopía electrónica se llevó a cabo un gradiente de glicerol sustituyendo el detergente LM por digitonina (0.2% concentración final). Se eligió una de las fracciones y la enzima pura se diluyó a una concentración final de entre 20 y 50 μg con amortiguador de dilución. Se cargaron 5 μl de esta mezcla a una celda de carbón para teñirse negativamente con acetato de uranilo 1% durante 1 minuto y posteriormente se dejó secar. La celda se examinó en un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM2100 operando en 200 kV. Las imágenes de la enzima se tomaron con un underfocus de 1.5 μm y un aumento electrónico de 40000x con una cámara F415-MP TVIPS con un sistema de procesamiento GmbH.

Las partículas individuales de la enzima se seleccionaron con el programa BOXER (del paquete EMAN) y posteriormente se analizaron con el paquete IMAGE-5 como describe Zhang *y cols.* 2008. En las imágenes se eliminaron frecuencias espaciales no deseadas (0.008 \AA^{-1} y 0.133 \AA^{-1}) y después se normalizaron. Posteriormente, estas imágenes se clasificaron de acuerdo a la orientación que presentaba cada una de ellas; y se generó una referencia inicial para arrancar el alineamiento múltiple de referencias. Esta alineación múltiple se repitió hasta que no se observó ninguna mejora en las imágenes.

Para comenzar la construcción del modelo tridimensional a partir de las imágenes de microscopía electrónica, se utilizaron dos moléculas de la estructura cristalográfica del subcomplejo $F_1\text{-c}$ de la ATP sintasa de levadura, PDB (banco de datos de proteínas) 1qo1 (Stock *y cols.* 1999), las cuales fueron arregladas con el programa Chimera para formar un

dímero de tal manera que su estructura encajara lo mejor posible en las proyecciones de la enzima de *Polytomella sp.* obtenida de análisis del alineamiento múltiple de referencias. Posteriormente se reemplazó el dominio F₁ por el hexámero $\alpha_3\beta_3$ de *Bacillus PS3*, PDB 1sky (Shirakihara y cols. 1997). Las proyecciones de este modelo sirvieron para alinear todas las imágenes obtenidas (aproximadamente 9300 imágenes). Estas imágenes alineadas se proyectaron con la alineación múltiple de referencias anteriores, obteniendo un nuevo modelo tridimensional inicial y mediante un proceso iterativo, este nuevo modelo sirvió como referencia para una segunda ronda de proyecciones. Después de siete rondas de refinamiento, el modelo tridimensional resultante se filtró a una resolución de 20 Å. La reconstrucción tridimensional se hizo asumiendo que el monómero de la enzima es simétrico.

4. Clonación de los genes de las subunidades ASA de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

4.1 Reacción en cadena de la polimerasa.

Los genes de las subunidades ASA se amplificaron por PCR a partir de una genoteca de *Polytomella sp.* clonada en el fago λ -ZAPII. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada subunidad (ver Anexo I). El volumen final de reacción fue de 50 μ L y contenía 2 mM de MgCl₂. (amortiguador de PCR), 200 nM de dNTP's (Deoxyribonucleotidos trifosfato), 10 ng de oligonucleótidos y aproximadamente 1 μ g de cDNA. Para todos los casos la temperatura de desnaturalización inicial fue de 94°C durante 10 minutos. Se realizaron 35 ciclos para amplificar los genes de todas las subunidades. Para cada ciclo se utilizó una temperatura de desnaturalización de 94°C, una temperatura de alineamiento de 55°C y una temperatura de elongación de 72°C. La duración de cada ciclo dependió del tamaño de la subunidad. En general, para genes mayores de 1000 y menores de 1500 pares de bases se utilizaron 2 minutos en cada paso (desnaturalización, alineamiento y elongación). Para genes mayores de 500 y menores de 1000 pares de bases se utilizó un minuto en cada paso y para genes menores de 500 pares de bases se utilizaron 30 segundos en cada paso (Tabla 4). Un último paso de elongación fue asignado a 72°C por 10 minutos. Para llevar a cabo la reacción se utilizó 0.5 μ l de la polimerasa Accuzyme (Bioline), la cual es a prueba de errores y deja extremos romos a los productos amplificados.

El producto de PCR fue separado en una electroforesis horizontal utilizando agarosa al 1%. El producto con el número de pares de bases esperado fue purificado con el kit QIAquick extracción en gel (Quiagen) siguiendo el protocolo del proveedor.

ASA2	1 221 pb
ASA3	501 pb
ASA4	885 pb
ASA4N	513 pb
ASA4C	564 pb
OSCP (ATP5)	608 pb
OSCP120	365 pb
ASA7	537 pb
ASA7N	231 pb
ASA7C	306 pb
Delta (ATP16)	621pb
ASA6	489 pb
ASA8	270 pb
c (ATP9)	396 pb

Tabla 4. Número de pares de bases esperados para cada gen y fragmentos de gen amplificados

4.2 Preparación de células competentes.

Se inoculó la cepa de *E.coli* (DH5 α o Codon plus) en 20 ml de medio LB con 10 mM de MgCl₂ y 10 mM de MgSO₄ (concentraciones finales). Este medio se incubó a 20°C a 200 rpm hasta que las células alcanzaron a una densidad óptica de 0.5 a 600 nm.

Se obtuvieron las células por centrifugación a 3500 rpm en un rotor Beckman JA 25.50 durante 10 minutos a 4°C. Éstas se resuspendieron en 5 ml de amortiguador TB estéril y se incubaron en hielo por un lapso de 10 minutos, después éstas se centrifugaron nuevamente a 3500 rpm en un rotor Beckman JA 25.50 durante 10 minutos. Esta operación se repitió 3 veces y en el último paso las células se resuspendieron en 2 mL de amortiguador TB agregando 140 μ l de DMSO (Dimetil sulfóxido) comercial. Las células se alicuotaron en tubos Eppendorff y se sumergieron en nitrógeno líquido antes de guardarlas a -20°C. Todo el procedimiento se llevó acabo en condiciones estériles.

4.3. Clonación en el vector pGEM T-easy.

El vector pGEM T-easy es un sistema de fácil clonación, pues presenta un extremo 3' de polimitinas incrementando la eficiencia de ligación. En la clonación exitosa se interrumpe el gen de la β -galactosidasa, lo que impide la degradación del compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, dando una coloración blanca a la colonia de bacterias. Por el contrario, cuando no se llevó a cabo la clonación del gen de interés, la colonia de bacterias presenta una coloración azul.

Para llevar a cabo la clonación de los genes de interés en el vector pGEM T-easy (Invitrogen) se adicionó una extensión en el extremo 3' de poli adenina a los productos de PCR. Esto se llevó a cabo a 72°C, en un volumen final de reacción de 50 μ L conteniendo 2 mM de $MgCl_2$ (amortiguador PCR), 100 ng de dNTP's y 0.5 μ L de Taq polimerasa (Invitrogen). El ADN se purificó con el sistema comercial Quiagen siguiendo las instrucciones del proveedor y se clonó en el vector pGEM T-easy (Invitrogen) siguiendo el protocolo de proveedor con modificaciones en la cantidad de inserto (4 μ L) y en la cantidad de vector (0.5 μ L).

Se transformaron células competentes de *E.coli* DH5 α con un choque térmico (42°C durante 2 minutos). Las células se crecieron en cajas con medio LB que contenía 100 mg/mL de ampicilina, 4 mg/ml de X-Gal y 1mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), durante 16 horas. Se seleccionaron y aislaron colonias bacterianas blancas, y se extrajo el ADN plasmídico por el método de fenol-cloroformo. Finalmente se secuenció el vector en la Unidad de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, usando los cebadores universales T7 y SP6, obteniendo en todos los casos un 100% de identidad con el gen de las subunidades de la ATP sintasa.

4.4. Extracción del ADN plásmidico por el método de fenol-cloroformo.

Se realizaron cultivos de las colonias seleccionadas en 3 mL de medio LB, conteniendo el antibiótico correspondiente; incubando a 37°C a 250 rpm durante toda la noche. Las células se colectaron en tubos Eppendorf centrifugando a la máxima velocidad de una centrifuga de mesa durante 1 minuto. Las células se resuspendieron en 200 μ l de amortiguador TE y se lisaron con 250 μ l de amortiguador de lisis, invirtiendo suavemente el tubo. Posteriormente se les añadió 350 μ l de amortiguador de neutralización y se incubaron durante 5 minutos en hielo. Pasado este tiempo, el lisado se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y al sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf nuevo, donde se le adicionó 250 μ l de una

mezcla de fenol-cloroformo (1:1). Se revolvió vigorosamente la mezcla (en vórtex) y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos. Se tomó el sobrenadante y se le añadió 650µl de isopropanol invirtiendo suavemente el tubo para precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó a 14000 rpm durante de 10 minutos y se desechó el sobrenadante. A la pastilla resultante se le añadió etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se removió el etanol y se dejó secar la pastilla a 50°C. Finalmente, la pastilla (que contiene el ADN plasmídico) se resuspendió en 35 µl de agua estéril. De éste ADN plasmídico se tomaron 7 µL (entre 150 y 200 ng) y se le adicionó amortiguador universal (10% del volumen final de la mezcla), 25 µg de RNAsa (Ribonucleasa) (fermentas) y aproximadamente 1 µl de enzimas de restricción (New England) equivalente a 10 unidades. Esta mezcla se llevó a un volumen final de 20 µl y se incubó a 37°C durante una hora. Después, se realizó una electroforesis horizontal, donde la mezcla se corre en un gel de agarosa al 1% para verificar que se haya liberado el gen del tamaño esperado.

5. Clonación de los genes de las subunidades de interés en vectores de expresión.

Los genes de interés, clonados previamente en el vector pGEM T-easy, fueron liberados por enzimas de restricción específicas (ver anexo I) para su clonación en los vectores de expresión pet28a y pet3a (Novagen).

Como primer paso se inoculó la cepa de *E.coli* DH5α que contiene el vector pGEM con los genes de interés, en 5 mL de cultivo LB que contiene 100 mg/ml de ampicilina. Por otra parte se inoculó la cepa de *E. coli* que contiene el vector pet28a y pet3a en 15 mL de medio LB con 50 mg/ml de Kanamicina. Ambos cultivos se incubaron toda la noche a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, se les extrajo el ADN plásmidico con el sistema comercial Wizard (Promega) siguiendo el protocolo del proveedor y se cortó con las enzimas de restricción correspondientes en un volumen de 50 µl finales que contiene amortiguador universal SDB (10% del volumen final de reacción), aproximadamente 1 µg de vector, y 2 µl de endonucleasas correspondientes (New England) equivalentes a 20 unidades. La reacción se llevo acabo a 37°C durante 2 horas. El gen y los vectores cortados se purificaron con el sistema comercial de Quiagen siguiendo las instrucciones del proveedor. El gen de interés se clonó utilizando el sistema comercial de T4 ADN ligasa de New England, en un volumen final de 20 µl, con aproximadamente 50 ng de vector (pet28a o pet3a), 10% del volumen final de amortiguador de ligación (amortiguador 10x) y 1 µl de ligasa. Se utilizó una relación de 3:1 (inserto: vector) siguiendo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} * \text{kb de inserto}}{\text{kb del vector}} * \frac{3}{1} = \text{ng de inserto}$$

La ligación se llevo a cabo a 16°C toda la noche. Se transformaron células de *E. coli* Codon Plus por choque térmico (42°C durante 2 min) y se crecieron toda la noche a 37°C en cajas con medio LB y 50 µg/mL de kanamicina. Se seleccionaron colonias para aislar el ADN plasmídico por el método de fenol cloroformo y se verificó que la ligación se llevara a cabo exitosamente. Finalmente, se hicieron gliceroles (15% de glicerol) con la colonia que tuviera el inserto del tamaño esperado.

6. Expresión de las subunidades.

La cepa de *E.coli* Codon Plus, que contiene a los vectores pet28a o pet3a clonados con el gen de interés, se cultivaron en 100 mL de medio LB con 50 µg/mL de kanamicina (concentración final), durante toda la noche. Posteriormente la cepa se indujo con una concentración final de 0.1 mM de IPTG. Después de una hora de incubación a 37°C se extrajeron las células mediante centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos en el rotor JA-25.50 Beckman.

Posteriormente las células se resuspendieron en amortiguador PBS y se rompieron mediante sonicación utilizando un Sonifier S250A. El proceso se llevó a cabo sonicando 2 minutos a una intensidad del 35% y con intervalos de un segundo; posteriormente, se dejó un descanso de un minuto. Este ciclo se repitió 5 veces en hielo. El lisado celular se fraccionó por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos en el rotor JA 25.50 Beckman. En la fase soluble se encuentran todas las proteínas solubles de la bacteria y en la fase insoluble se encuentra fracciones de membranas y proteínas precipitadas formando cuerpos de inclusión.

Se identificaron a las proteínas recombinantes en la fracción insoluble del lisado celular por medio de geles de Tricina-SDS-PAGE al 12% (Shägger and von Jagow 1987).

7. Purificación de las subunidades.

Los cuerpos de inclusión se lavaron 3 veces con amortiguador PBS con 1% de Tritón X-100, alternando con lavados de agua. Posteriormente, los cuerpos de inclusión se solubilizaron

incubando 30 minutos en amortiguador de solubilización a temperatura ambiente. El solubilizado se centrifugó a 12000 rpm en el rotor JA-25.50 Beckman. El sobrenadante se paso por un filtro de 0.45 μm de poro (Millipore) y se cargó a una columna His Trap 5 ml (GE Healthcare). La columna se lavó con 5 volúmenes del mismo amortiguador de lavado y se llevó a cabo un gradiente de 15 volúmenes de columna de 0 a 500 mM de imidazol en amortiguador de solubilización. La purificación se llevó a cabo con ayuda de FPLC (cromatografía de fase líquida de proteínas) ÄKTA UPC-900 con un flujo de 3 ml/min. El eluido se colectó en fracciones de 3 ml con un fraccionador Frac-920. El pico de elución se dializó para eliminar la guanidina del amortiguador utilizando una membrana con un corte de 3500 Da. Este dializado se cargó a una columna de intercambio iónico source 15Q de 1ml (GE Healthcare), previamente equilibrada con el amortiguador de diálisis. Se eluyó la proteína con un gradiente de 0 a 500 mM de NaCl en amortiguador de diálisis. Se utilizó un flujo de 1 ml/min, y la proteína se colectó en fracciones de 0.5 mL. El pico de elución donde eluyó la proteína de interés se concentró con ayuda de un filtro Centricón de 3500 Da de corte (Millipore). Adicionalmente, a las proteínas se les adicionó glicerol a una concentración final de 3% para estabilizarlas.

8. Dicroísmo circular.

Las proteínas puras se obtuvieron en amortiguador PBS y se diluyeron hasta una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ con amortiguador de dilución. 250 μl de esta mezcla fue puesta en una celda de cuarzo con 0.1 cm de paso de luz y fue escaneada en el espectrómetro de dicroísmo circular (Aviv 202) en un rango de longitud de onda de 260 a 295 nm. Para las subunidades ASA4 y sus respectivas proteínas truncas se utilizó una temperatura de 10°C. Para la proteína ASA2 se utilizó una temperatura de 25°C.

Los datos fueron analizados en el servidor Dicroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>) para calcular el porcentaje de estructura secundaria.

Se graficaron los espectros en unidades de elipticidad molar ($\text{deg cm}^2/\text{dmol}$) en función de la longitud de onda. La conversión de unidades de miligramos a elipticidad molar se hizo en el programa Aviv cdsd. Los datos también pueden ser graficados en unidades de $\Delta\epsilon$. La figura 24 muestra los espectros característicos de diferentes proteínas.

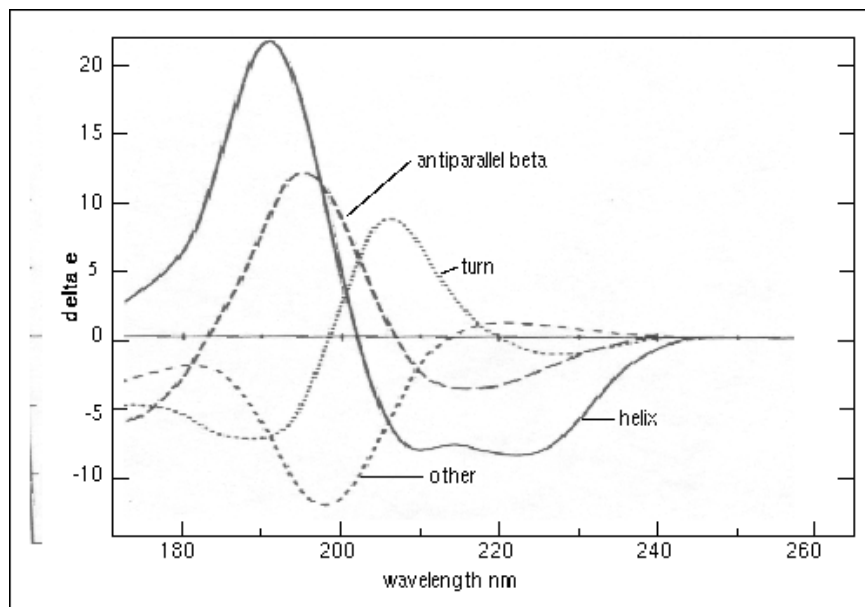


Figura 24. Espectros canónicos de plegamiento en α -hélices, hojas β , giro y de plegado aleatorio. (Tomada de Brahms & Brahms, 1980)

9. Co-purificación de las subunidades ASA.

El solubilizado de la proteína que contiene etiqueta de 6-Histidinas, se cargó a una columna His Trap FF-crude de 1ml (GE Healthcare). Se lavó la columna con 2 volúmenes de amortiguador de lavado1, posteriormente con otros 2 volúmenes de amortiguador de lavado 2 y finalmente con 2 volúmenes de amortiguador de lavado 3, esto con la finalidad de reducir gradualmente la concentración de guanidina e inducir el repliegado de la proteína dentro de la columna.

Por otra parte, el solubilizado de la proteína que no contiene etiqueta de histidinas se dializó contra amortiguador de diálisis durante 2 horas a 4°C. Un mililitro de este dializado se cargó a la columna donde se encuentra la proteína con etiqueta de 6-His previamente repliegada. La columna se incubó toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se lavó la columna con 20 volúmenes amortiguador de lavado 4. Se hace un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol de 15 volúmenes de columna con amortiguador de lavado 4 y ayuda del FPLC UPC-900, utilizando un flujo de 0.8 ml/min.

Una vez obtenidas las fracciones, aquellas que forman el máximo de elución se corrieron en un gel Tricina SDS-PAGE al 12% (Shägger and Von Jagow 1987), junto con una muestra de la proteína carente de etiqueta de histidinas que se cargó en la columna, una muestra del eluido de la columna y una muestra del lavado de la columna.

El gel se transfirió en una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda (Biorad) para realizar una inmunoréplica tipo western con los anticuerpos específicos contra cada proteína. Se bloqueó la membrana con 10% de leche (carente de ácidos grasos) en amortiguador TTBS toda la noche. Se lavó la membrana dos veces con TTBS y posteriormente se incubó durante dos horas con el anticuerpo primario en 1% de leche en amortiguador TTBS. Después se lavó nuevamente la membrana dos veces con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario (anticonejo) durante una hora en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Finalmente se lavó la membrana dos veces con amortiguador TTBS y se reveló la membrana con NBT (cloruro de nitroazul tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) en amortiguador de revelado. Una vez que aparecieron las bandas se lavó con agua y se dejó secar la membrana. Para revelar la presencia de otra proteína en una misma membrana, ésta se bloqueó nuevamente y se repitió el procedimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R. and Walker J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from b. *Nature* **370** : 621-628.

Alfonzo M, Kandrach M. A. and Racker E. (1981) Isolation, characterization, and reconstitution of a solubilized fraction containing the hydrophobic sector of the mitochondrial proton pump *J Bioenerg Biomembr.* **13** : 375-391.

Allen R. D. (1995). *Protoplasma* **189** : 1-8.

Antaramian A, Coria R, Ramírez J, González-Halphen D. (1996) The deduced primary structure of subunit I from the cytochrome c oxidase suggests that the genus *Polytomella* shares a common mitochondrial origin with *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta.* **1273** : 198–202.

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

Arai H., Terres G., Pink S. and Forgac M. (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* **263**: 8796-8802.

Arnold I., Pfeiffer K., Neupert W., Stuart R. A. and Shägger H. (1998) Yeast mitochondrial F₁-F_o-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO journal* **17** : 7170-7178.

Atteia A. (1994) Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *C R Acad Sci.* **317** : 11-9.

Atteia A, Dreyfus and G. and González-Halphen D (1997) Characterization of the α and β subunits of the F₀F₁-ATP synthase from the alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 275-284.

Bateson M., Devenish R. J., Nagley P. and Prescott M. (1999). Single copies of subunits d, Oligomycin-sensitivity conferring protein, and b are present in the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274** : 7462-7466.

Bianchet M.A. Hullihen J., Pedersen J.P. and Amzel L.M. (1998) The 2.8-Å structure of rat liver F₁-ATPase: Configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 11065-11070.

Boekema E. J., van Breemen J. F. L., Brisson A., Ubbink-Kok T., Konings W. N and Lolkema J. S. (1999) Connecting stalk in V-ATPase. *Nature* **401** : 37-38.

Bottcher, B., Bertsche, I., Reuter, R. and Graber, P. (2000). Direct visualisation of conformational changes in EF(0) F(1) by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **296** : 449–457.

Brahms, S. & Brahms, J. (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism *J. Mol. Biol.* **138** : 149-178.

Bulygin V.V., Duncan T. M. and Cross R.L. (2004) Subunit in *Escherichia coli* ATP Synthase and Implications for Enzyme Regulation. *J. Biol. Chem.* **279** : 35616–35621.

Cano Estrada A. , Vazquez-Acevedo M., Villavicencio-Queijeiro A., Figueroa-Martinez F., Miranda-Astudillo H., Cordeiro Y., Mignaca J.A., Foguel D., Cardol P., Lapaille M., Remacle C., Wilkens S. and Gonzalez-Halphen D. (2010) Subunits-Subunits interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella sp.* *Biochim Biophys. Acta.* **1797** : 1439-1448.

Cano Estrada A. (2008) Estudio topológico de la ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.* *Tesis de Maestría.*

Cano Estrada A. y Gonzalez Halphen D. (2011). La F₁-F_o ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB.* **30** : 98-108

Cain B. D. (2000) Mutagenic analysis of the F₀ stator subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32** : 365-371.

Carbajo R.J., Silvester J.A., Runswick M.J., Montgomery M.G., Walker J.E. and Neuhaus D. (2004) Solution structure of F₆ from the peripheral stalk region of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *J. Mol. Biol.* **342** : 593-603.

Carbajo R. J., Kellas F. A., Yang J.C., Runswick M. J., Montgomery M.G., Walker J.E. and Neuhaus D. (2007) How the N-terminal domain of the OSCP subunit of Bovine F₁F_o-ATP synthase interacts with the N-terminal region of an Alpha subunit. *J. Mol. Biol.* **368** : 310-318.

Cardol P, Gonzalez-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.

Chen C., Ko Y., Delannoy M., Ludtke S. J. Chiu W. and Pedersen P. L. (2004) Mitochondrial ATP synthasome: Three dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J. Bio. Chem.* **279** : 31761-31768.

Cherepanov D.A., Mulikidjanian A.Y. and Junge W. (1999) Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase. *FEBS Lett.* **449** : 1-6.

Chung D.G. and Lewis P.N. (1986). Internal architecture of the core nucleosome: fluorescence energy transfer studies at methionine-84 of histone H4. *Biochemistry* **25** : 5036.

Collinson I.R., Van Raaij M.J., Runswick M.J., Fearnley I.M., Skehel J.M., Orriss G.L., Miroux B. and Walker J.E. (1994) ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence. *J. Mol. Biol.* **242** : 408-421.

Collinson I.R., Skehel J. M., Fearnley I.M., Runswick M. J. and Walker J.E. (1996) The F₁F_o-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratios of the subunits in the stalk region linking the F₁ and F_o domains. *Biochemistry* **35** : 12640-12646.

Coskun U., Chaban Y. L., Lingl A., Müller V., Ruiz T., and Grüber G. (2004b). Three dimensional organization of the archaeal A1-ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö. *J. Biol. Chem.* **279**:38644-38648.

Couoh-Cardel S., Uribe-Carvajal S., Wilkens S. and García- Trejo J.J. (2010). Structure of dimeric F₁-F_o-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **285** : 36447-36455.

Del Rizzo P.A., Bi Y. and Dunn S.D. (2006) ATP synthase b subunit dimerization domain: A right-handed coiled coil with offset helices. *J. Mol. Biol.* **364** : 735–746.

Denda K., Konishi J., Oshima T., Date T. and Yoshida M. (1988). Molecular cloning of the β -subunit of a possible non-FoF₁ type ATP synthase from the acidothermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* **263** : 17251-17254.

Dickson V.K., Silvester J.A. Fearnley I. M., Leslie A. G.W. and Walker J.E. (2006) On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* **25** : 2911-2918.

Dmitriev O., Jones P.C., Jiang W. and Fillingame R.H. (1999) Structure of the membrane domain of subunit b of the *Escherichia coli* FoF₁ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274** : 15598-15604.

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.

Dudkina N.V., Oostergetel G.T., Lewejohan D., Braun H.P. and Boekema, E.J. (2010) Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta.* **1797** : 272-277.

Dunn S.D. and Chandler J. (1998) Characterization of a b₂ δ complex from *Escherichia Coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273** : 8646-8651.

Falke J.J., Dernburg A.F., Sternberg D.A., Zalkin N., Milligan D.L. and Koshland D.E. Jr. (1988). Structure of a bacterial sensory receptor. *J. Biol. Chem.* **263** : 14850-14858.

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.

Fillingame R.H., Jiang W. and Dmitriev O.Y. (2000) The oligomeric subunit C rotor in the Fo sector of ATP synthase: unresolved questions in our understanding of function. *J. Bioenerg Biomembr.* **32** : 433-439

Finbow M.E. and Harrison M.A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* **324** : 697-712.

Franzén L.G, 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.

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.

Gledhill J.R. and Walker, J.E. (2005) Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **386** : 591-598.

Gogarten J.P., Kibak H., Dittrich P., Taiz L., Bowman E.J., Bowman B.J., Manolson M.F., Poole R.J., Date T., Oshima T., Konishi J., Denda K. and Yoshida M. (1989) Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: Implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6661-6665.

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.

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

Grüber G., Wieczorek H., Harvey W.R. And Müller V. (2001) Structure-Function relationships of A-, F- and V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **204**:2597-2605.

Hausrath, A.C., Grüber, G., Matthews, B.W., and Capaldi, R.A. (1999) Structural features of the gamma subunit of the Escherichia coli F(1) ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** : 13697–13702.

Herrmann J.M. and Neupert W. (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**: 219-225.

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

Jiang W., Hermolin J. and Fillingame R. H. (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** : 4966-4971.

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

Kane P. M. (1995) Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**:379-384.

Ko, Y.H., Hullihen, J., Hong, S., and Pedersen, P.L. (2000) Mitochondrial F₀F₁ ATP synthase. Subunit regions on the F₁ motor shielded by F₀, Functional significance, and evidence for an involvement of the unique F₀ subunit F(6). *J. Biol. Chem.* **275** : 32931-32939.

Lapaille M., Escobar-Ramírez A., Degand H., Baurain D., Rodríguez-Salinas E. Coosemans N., Boutry M., González-Halphen D., Remacle C. and Cardol P. (2010). Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F₁F₀ ATP synthase and role of ASA7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol. Biol. and Evol.* **27** : 1630-1644.

Lau W.C., Baker L.A. and Rubinstein J.L. (2008) Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **382** : 1256-64.

Peterson G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83** : 346-56.

McLachlin D.T. and Dunn S.D., (1997) Dimerization interactions of the b subunit of the *Escherichia coli* F₁F_o-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272** : 21233-21239.

Melkonian M. and Surek B. (1995) Phylogeny of the Chlorophyta: congruence between ultrastructural and molecular evidence. *Bull Soc Zool Fr.* **120** : 191–208

Mellwig C. and Böttcher B. (2003) A unique resting position of the ATP-synthase from Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **278** :18544-18549.

Menz R.I., Leslie A.G. and Walker J.E. (2001) The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide. *FEBS Lett.* **494**:11-14.

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.

Minauro-Sanmiguel F., Bravo C. and García J.J. (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein IF1 with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J.Bioenerg. Biomembr.* **34** : 433-43

Minauro-Sanmiguel F., Wilkens S. and Garcia J.J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12356-12358.

Morales-Ríos E., de la Rosa Morales F., Mendoza-Hernández G., Rodríguez-Savala J.S., Celis H., Zarco-Zavala M. and García-Trejo J.J. (2010). A novel 11kDa inhibitory subunit in the F₁F_o ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha proteobacteria. *J. Biol Phys.* **34** : 197-212

Moreira D., Lopez-García P. and Rodriguez-Valera. F. (2001) New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** : 2211 – 2219.

Müller V. and Grüber G. (2003) ATP synthases: Structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol. Life Sci.* **60**:474-494.

Nelson N. and Taiz L. (1989) The evolution of H⁺-ATPase. *Trends. Biochem. Sci.* **14**:113-116.

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.* **6** : 1105-1116.

Oot R. and Wilkens S. (2010) Domain characterization and interaction of the yeast vacuolar ATPase subunit C with the peripheral stator stalk subunits E and G. *J. Biol. Chem.* **285** : 24654-24664.

Paumard P., Vaillier J., Coulary B., Schaeffer J., Soubannier V., Mueller D. M., Brethes D., di Rago J. P. and Velours J. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21** : 221-230.

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 Chlamydomonas algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem.* **276** : 11302–11309.

Poetsch A., Berzborn R. J., Heberle J., Link T. A., Dencher N. A., and Seelert H. (2007) Biophysics and Bioinformatics reveal structural differences of the two peripheral stalk subunits in chloroplast ATP synthase. *J. Biochem.* **141**: 411-420.

Pringsheim E.G. (1955) The genus *Polytomella*. *J. Protozool.* **2** : 137-145.

Pröschold T., Marin B., Schlosser 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.

Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769.

Rastogi V.K. and Girvin M.E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* **402** : 263-268.

Rees, D.M., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (2009) The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 21597–21601.

Revington M., McLachlin D.T., Shaw G. S., Dunn S. D. (1999) The dimerization domain of the b subunit of the *Escherichia coli* F1Fo-ATPase. *J. Biol.Chem.* **274** : 31094-31101.

Rubinstein J.L., Walker J.E. and Henderson R. (2003) Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* **22** : 6182-6192.

Rubinstein J.L., Dickson K., Runswick M.J. and Walker J.E. (2005) ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: location of subunit h in the peripheral stalk region. *J. Mol. Biol.* **345** : 513-520..

Seelert H., Poetsch A., Dencher N.A., Engel A., Stahlberg H. and Müller D.J. (2000) Structural biology: Proton powered turbine of a plant motor. *Nature* **405** : 418-419.

Shägger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kda. *Anal. Biochem.* **166** : 368-379.

Shirakihara Y., Leslie A.G. Abarahams J.P., Walker J.E., Ueda T., Semikimoto Y., Kamabara M., Saika K., Kagawa Y., Yoshida M. (1997). The crystal structure of the nucleotide free $\alpha\beta$ subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer. *Structure* **5** : 825-836.

Snyder B. and Hammes G.G. (1985). Structural organization of chloroplast coupling factor. *Biochem.* **24** : 2324-2331.

Strauss M., Hofhaus G., Schröder R.R. and Kühlbrandt W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* **27** : 1154-1160.

Stock D, Leslie A.G. and Walker J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase (1999). *Science* **286** : 1700-1705

Tsunoda S.P., Rodgers A.J.W., Aggeler R., Wilce M.J.C. Yoshida M. and Capaldi R.A (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** : 6560-6564.

van Lis R., Atteia A., Mendoza-Hernández G. and González-Halphen D. (2003). Identification of 21 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 FoF1-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., 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 Biomem* **38**: 271-282.

Velours J., Arselin de Chateaubodeau G. and Guerin B. (1987) Subunit 4 of ATP synthase F1Fo from yeast mitochondria. Purification, amino-acid composition and partial N-terminal sequence. *Eur. J. Biochem.* **164** : 579-584.

Velours J. and Arselin G. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* ATP Synthase. *J. Bioenerg and Biomem.* **32** : 383-389.

Vik S.B., Long J.C., Wada T. and Zhang D. (2000) A model for the structure of subunit a of Escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1458** : 457-466.

Villavicencio-Queijeiro A., Vázquez-Acevedo M, Cano-Estrada A., Zarco-Zavala M, Tuena de Gómez M., Mignaco J.A., Freire M.M, Scofano Helena M.& Foguel D., Cardol P. & Remacle C. and González-Halphen D. (2009) The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *polytomella* sp. is dimeric. *J Bioenerg Biomembr* **41** : 1–13.

von Ballmoos C., Appoldt Y., Brunner J., Granier T., Vasella A. and Dimroth P. (2002) Membrane topography of the coupling ion binding site in Na⁺-translocating F1F0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **277** : 3504-3510.

Xu T., Vasilyeva E. and Forgac M. (1999) Subunit interaction in the clathrin-coated vesicle V-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* **274** : 28909-28915.

Walker J.E., Saraste M., Runswick M. J. and Gay N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1** : 945-951.

Walker J.E., Runswick M.J. and Poulter L. (1987) ATP synthase from bovine mitochondria. The characterization and sequence analysis of the two membrane associated sub-units and of the corresponding cDNAs. *J. Mol. Biol.* **197** : 89-100.

Walker J. E. and Dickson V. K. (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757** : 2186-296.

Wilkins S., Vasilyeva E. and Forgac M. (1999) Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **274** : 31804-31810.

Wilkins S., Inue T. and Forgac M. (2004) Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase – Localization of subunit H by difference imaging and chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* **279** : 41942-41949.

Wilkins S. (2005) Rotary molecular motors. *Adv. Protein Chem.* **71** : 345-382.

ANEXO I:
CEBADORES

Todos los cebadores se diseñaron con base en la secuencia de ADN de los genes que codifican para la proteína de ATP sintasa del alga *Polytomella parva*, excepto la subunidad ASA4 en donde el cebador en sentido se diseñó con base a la secuencia de nucleótidos del gen ASA4 del alga *Chlamydomonas reinhardtii*; y de la subunidad ASA2, donde se recurrió a fragmentos de la proteína obtenidos por espectrometría de masas.

Se adicionaron sitios de corte específicos para las enzimas de restricción: BamHI (en lila), HindI (en verde) NdeI (en café), NheI (en amarillo), SacI (en azul marino), Sall (en azul claro), SphI (en morado), PstI (en rosa). También se adicionó una extensión de 3 pares de bases para proteger los sitios de restricción (en naranja).

El codón que codifican para terminar la transcripción se muestran en rojo.

ASA2

Para la proteína ASA2 se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de fragmentos de la proteína obtenidos por espectrometría de masas. La amplificación de la subunidad se obtuvo utilizando el cebador en sentido diseñado con el fragmento 2 de la proteína (DVADAAVALAYLGTR); y con el cebador antisentido diseñado con el fragmento 5 obtenido de la proteína (VREAQGYAVAVVPAN).

ASA2 en sentido

5'- CGC GGA TCC GCT AGC GAC GCT GCC GT(C/G/T) GC(C/G/T) CT(C/T) AC(C/T) TAC -
3'

ASA2 antisentido.

5'- GCG GTC GAC TCA (G/A/C)AC (G/A)GC GTA (G/A)CC CTG (G/A/C)GC CTC -3'

ASA4

ASA4 en sentido

5'- GCG GCA TGC CAT ATG GCT ACC GAG CCT GCT GTT TC -3'

ASA4 antisentido

5'- GCG CTG CAG GGA TCC TTA AGC AGC GAC CTT AGG GC -3'

ASA4N

Para obtener la amplificación de la región N-terminal del gen ASA4 se utilizó el cebador ASA4 en sentido y se diseñó el cebador antisentido.

ASA4N antisentido.

5'- GCG GTC GAC GGA TCC TTA CTT GGC CTT AGC CGC AAA -3'

ASA4C

Para obtener la amplificación de la región C-terminal del gen ASA4 se utilizó el cebador ASA4 antisentido y se diseño el cebador en sentido.

ASA4C en sentido

5'- GCG GCA TGC CATATG AAG TTT GGC CAG GAG ACC -3'

OSCP (con presecuencia)

OSCPpre en sentido

5'- GCG GGA TCC CAT ATG ATG TTG GCT CGC GTC GCT TCT -3'

OSCPpre antisentido

5'- GCG CTG CAG GTC GAC AAC GAA CTA ATT TAA ATA GAA AGA -3'

OSCP (proteína madura)

Para obtener la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína madura OSCP, se utilizó el cebador OSCPpre antisentido y se diseñó el cebador en sentido.

OSCP en sentido

5'- GCG GGA TCC CAT ATG GCT GCC CAG GCT GAG CTC AAG-3'

OSCP120

Para obtener la amplificación de la región N-terminal del gen OSCP se utilizó el cebador OSCP en sentido y se diseñó el cebador antisentido.

OSCP antisentido

5'- GCG CTG CAG GTC GAC CTA AAC CTC CTT CTT GTG AGC GAG -3'

ASA6

El oligonucleótido en sentido fue diseñado tomando en cuenta 18 pares de bases de la región 5'-UTR; y 15 pares de bases de la región 3'-UTR en el cebador antisentido

ASA6 en sentido

5'- **CGC GGA TCC CAT ATG** GCT TGA TCT TTC ATA AAG ATG -3'

ASA6 antisentido

5'- **CGC GAG CTC** ATA TTG GTC AAT CAT **TTA** AAG -3'

ASA7 (con presecuencia)

ASA7pre en sentido

5'- **GCA TGC** CAG CGT GTT GCT TCC GTT A -3'

ASA7pre antisentido

5'- **GCG CTG CAG GTC GAC CTA** TGC TTG GAG AGG AGG AAG -3'

ASA7 (proteína madura)

Para obtener la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína madura ASA7, se utilizó el cebador ASA7pre antisentido y se diseñó el cebador en sentido.

ASA7 en sentido

5'- **GCG GGA TCC CAT ATG** CTT ACC ACT TTT ACC TTC-3'

ASA7N

Para obtener la amplificación de la región N-terminal del gen ASA7 se utilizó el cebador ASA7 en sentido y se diseñó el cebador antisentido

ASA7N antisentido

5'- **GCG GTC GAC CTG CAG TTA** GTT CTG GAT AGA AGA GTG GAG -3'

ASA7C

Para obtener la amplificación de la región C-terminal del gen ASA7 se utilizó el cebador ASA7pre antisentido y se diseñó el cebador en sentido.

ASA7C en sentido

5'- **GCG GGA TCC CAT ATG** ATC CAG AAC TAC CTC CTT TCT -3'

Delta (ATP15)

El oligonuclótido en sentido fue diseñado tomando en cuenta 6 pares de bases de la región 5'-UTR; y 15 pares de bases de la región 3'-UTR en el cebador antisentido.

Delta en sentido

5'- GCG GGA TCC CAT ATG GAC ACT ATG TTT GGA CTC AAA-3'

Delta antisentido

5'- GCG AAG CTT TTT ATC TAA TTA CGC TTA AGC-3'

ASA8

ASA8 en sentido

5'- GCG GGA TCC GCT AGC ATG GTC CTC GGT GAG GTC TAC-3'

ASA8 antisentido

5'- GCG AAG CTT TAG TGA CCA CCA GCA GTG TAA G -3'

c(ATP9)

c en sentido

5'- GCG GGA TCC CAT ATG TCT GTC CAG AGG CTT TCT -3'

c antisentido

5'- GCG AAG CTT TGA GAA TAC AAA CAT TTA AGC -3'

ANEXO II:
SECUENCIAS REPORTADAS

Las presecuencias de las subunidades están representadas en rojo.

ASA2 (parcial)

Secuencia de nucleótidos - Genbank: GU014474

```
1 GACGCTGCCG TGGCCCTTAC CTACCTCCAG GTTAAGGCCA ACAGGAGGCT TTGGGGTAAG
61 GTTCTTGAGA AGGCGGGTGC CGCTCAGGAC TATGACGCTG CTTCCCTTAC CAACCTTCTT
121 TGGGCCATCA ACACCGGTGG TGTTGAGCAC TTCAAGACGG TCGCTGAGCT TGCCGGTCCC
181 GCCGTCTCTC TTCTCCCCTC TTTGAGCCCT GTTCAGCTTT CCATTGTTGT TGAGGCCCTT
241 GGTGGTGTG GTGTCAAGAA CTACGAGCTT TACAATAAGG CCTCCGCCGT CGTCGTCAGC
301 AAGATTGGTG AGTTCAAGCC CGCTGAGATT GCTCGTGTCC TTTACGGTGT CGCTTTCGGT
361 GGCGTCAATG ATGTCGCTCT CGCCAAGGCT GCCGGCAAGG TTTTGTGCTT CACTGAGGTC
421 GACAGCCGCA CTGCTGCCCA GGCTCTTTAT GCTCTTGCCA AGCTTGCCG TGCCGATAAG
481 GCTACTGTTG ATGCCCTCCT TAAGAGCTTC AAGAAGGGTA CTGAGTCTGC TTCCGATGCC
541 GCTGCTGCTT CTTTCGCCCT CGGCTCCCTC AGCTTTAAGG CTGAGAAGGC TATTGTTGAT
601 GCCCTTAAGG CCTCTGCTGG TGACCTCGCT CCCGCTCAAG CTGTTGAGGC CGCCTATGGT
661 CTTGCTCTCT CCGGTGCGAC TGATGCTGAG GCTTTTAAGG CCCTGTTTGG TGTCGTTGCC
721 CCTGCCATTG AGAAGGCCCC TGACGCTCTT GAGGTCTCTT CCCTTGCTCA GCTTCATGTC
781 GCTTCCACCA TCTCTGGTGC GAAGCTCCCT GCTGCTGTTG GTTCTTTCGT CGCCAAGGCT
841 TTCGGTCTTG CCGCCGATGC TGCCAGGCTT AAGCGCTCTT CTGCTGAATC TGCCCTCGTT
901 GCGGACGTTG CCGCTGCCAC TGCCGTTGCT TTCGGTGCCC AGTACCGCCC TGAAGTCGCG
961 TCTGCTGTTG CTAGCTATGT TAAGACTGCC CCTGATGGCT CCGTTCTTGA CATTGCCATC
1021 ACCAAGGGCG ACGCCAAGGT TCTTGTTTCCAG GCCGTTCCCT CCTCCCTTTT GACCTCCACC
1081 ACCCCTGCCA AGCCCCTTGG CCACGTAGCT GCTTACAGCA AGGTCCGTGA GGCCAGGGC
1141 TACGCCGTC
```

Secuencia de aminoácidos – Gen Bank: ADE92937

```
1 DAAVALTYLQ VKANRRLWGK VLEKAGAAQD YDAASLTNLL WAINTEGVEH FKTVAELAGP
61 AVSLLPSLSP VQLSIVVEAL GGAGVKNYEL YNKASAVVVS KIGEFKPAEI ARVLYGVAFG
121 GVNDVALAKA AGKVFASDEV DSRTAAQALY ALAKLGRADK ATVDALLKSF KKGTESASDA
181 AAASFALGSL SFKAEKAIKD ALKASAGDLA PAQAVEAAYG LALSATDAE AFKALFGVVA
241 PAIEKAPDAL EVSSLAQLHV ASTISGAKLP AAVGSFVAKA FGLAADAARL KRSSAESALV
301 ADVAAATAVA FGAQYRPEVA SAVASYVKTA PDGSVLDIAI TKGDAKVLVQ AVPSSLLTST
361 TPAKPLGHVA AYSKVREAQG YAV
```

ASA3 (parcial)

Primeros 167 a.a de 366

Secuencia de nucleótidos - Genbank: GU121441

```
1 ATGCGTCAGG CTAGTCGCCT TGCTTTGTCC ATTAGACAGG CTGGTAATGT CGAGGCTGCA
61 TCTGCAGTCC CTGCCATGAC CAGACAGTTC TCTGCCCCTG GATCTCATGA GCACCACGAG
121 ACTCCTCTTT CGAAGGTCAT GCCCACCGTC GTCTCCATCC CCCGCAAGGT TGCTGCCTT
181 GCCCTTGGTG CCACCAAGAA GGTTGTTTGT GGTGTTGGCT CCTCTGGTCC TTCCCAGAAC
241 CTTGTTAGCA CCTTTGCCAA TAAGGTCATT GTTGAGGAGA ACCTCGTCAA CGTTGCTGAG
301 ATCGATGTTT CTTTCTGGTC TTACTGGCTT TCCTCTGCTG GCTTCACCAG CAAGGATGCT
361 TTCGTTAAGT TTGCCGAGGC CGTTAAGCCG AAGGTTGCCG CTCTCTCTAC CTCTGACATC
421 ACTAACCTGA CTGTAGCTTT CAAGAGGGCC AACTACTACG ACAAGGATCT CTTTACCGGT
481 ATTGAGGCCA ACGTCTCCGC C
```

Secuencia de aminoácidos – GenBank: ADE93004

1 MRQASRLALS IRQAGNVEEA SAVPAMTRQF SAPGSHEHHE TPLSKVMPTV VSIPRKVACL
61 ALGATKKVVC GLASSGPSQN LVSTFANKVI VEENLVNVAE IDVPFWSYWL SSAGFTSKDA
121 FVKFAEAVKP KVAALSTSDI TNLTVAFKRA NYYDKDLFTG IEANVSA

ASA4 (proteína madura)**Secuencia de nucleótidos - Genbank: GQ168485**

1 GCTACCGAGC CTGCTGTTTC CAAGAAGGAG GTTCTTTACT TCCTTAGCAG CAAGGATGCT
61 GAGAGCTCTA CCGCTGTCAA GTCTTACCTT AAGAGCCTCT ACGCTGGAGC CCAGGTTGAG
121 GCCACCGAGA CTGATGCCTC TGAGCTTATC GCCCAGCTTG AAAAGAAGTA TCTTTCTGCT
181 CAGGTTGTTG AGCCTGGAGT TCATAACATT GCTCTTCCGC TTGGTGAGTC TGGCTCTGCC
241 CCTGTCAAGA GATACGCTGC TGAGCTCTTC AACCTTGGTG CCCAGGCTGG TTTTGAGTGC
301 CCCTTCATTG AGGTTAGCAA GAAGTTTGGC CAGGAGACCG CTA CTTCTGA GACCGTCAAG
361 GATGTCTTGA ACAAGACCAA GTCCTATGTT TCCGCCGATT ACAACGCTGC TCTCAATGAG
421 GTCCTTTCCT CAGTTGAGGC TGAGATTAAC GGCCCTGTTC TCTTCGACGG CAAGACCGAG
481 GGCTTCAAGA AGTTTGC GGC TAAGGCCAAG GCTGTCGCTG TCTCCAGGGG TCTTCCCCT
541 GACACCATCC TCGCCTACTG CGCCGGTTCC GCCAACGAGG ATGCTGCCGA CAAGGTTAGC
601 AAGGAATTCT TCACCTGGTT CGAATCCGCT TACACTGCTG ATGCCGCGGC TGAGGTCAAG
661 GCTATTGAAG CTGAGGCTGC TTCCATCCTC GATCGTCACC TCGCTAAGCC TGTTGCTCAG
721 ATTGCAAGG AGCAGGCCTC TGCCATGCTC TCCCTCCTCA AGAGGGCTGA GACTGCTAAG
781 GGTGCCAAGT GGGCTGAGAA GTACCTTGAG GATGTTAAGG CTGTTTCAAGT GTTCGATGCC
841 TCCGTCGCCG AGGCTCCCGC CTCTGGCCCT AAGGTCGCTG CTTAA

Secuencia de aminoácidos – GenBank: ACU87552

1 ATEPAVSKKE VLYFLSSKDA ESSTAVKSYL KSLYAGAQVE ATETDASELI AQLEKKYLSA
61 QVVEPGVHNI ALPLGESGSA PVKRYAAELF NLGAQAGFEC PFIEVSKKFG QETATSETVK
121 DVLNKTYSYV SADYNAALNE VLSSVEAEIN GPVLFDGKTE GFKKFAAKAK AVAVSRGLPA
181 DTILAYCAGS ANEDAADKVS KEFFTWFESE YTADAAAQEVK AIEAEAASIL DRHLAKPVAQ
241 IRKEQASAYA SLLKRAETAK GAKWAEKYLE DVKAVQWFDA SVAEAPASGP KVAA

OSCP (ATP5)**Secuencia de nucleótidos - GenBank: GQ422707**

1 ATGTTGGCTC GCGTCGCTTC TGTCGCCCTC CGTAGGGCTG AGGGCAAGAT TATGCCTCAG
61 ATGGTTAGGG CTCTCTCTGT CAGTGCCGCT TCCGCTGCCC AGGCTGAGCT CAAGCTCCCC
121 ACTGCTCCTC TTCAGCTCAG TGGCACCTCT GCCCAGATTG CCACTCTTCT CTGGCAGGTT
181 GCCGCCAAAG AGAACCAGCT CGACAAGGTT CAGGATGAGC TTTACCAGTT CATCGAGCTC
241 TTCAAGCAGC ACTCCGAGCT CCGCAGGCTC GCCACTGACC CCTTCGTCCC TACCCTCGTT
301 CGACTAAGA TCATTTCTTC CGTTCTCAAG GATTCTGGTG CCTCCGAGAT CACTAAGAAG
361 CTTTTGAGG CTCTTGCCGA CGAGGGTGCC CTTAGCGCTC TCCTTGAGGT CACTGTCAAC
421 TACGAGGAGT TGATGCTCGC TCACAAGAAG GAGGTTTACT GCACCGTTAT CACCGCTGAG
481 CCCCTTGACA AGCTCGAGCG TGTTGAGCTC ACCAAGAAGG CCGAGAAGTT CGTTGATGCT
541 GGCTTCAAGC TTGTTATGCA AGAGAAGATC GACAAGAAGC TCCTCGGTGG CTTGCTCATT
601 GAGTTCTCCG ACAGGCGTGT TGATATGTCC ACCGCCAAGA AGGTTGAGGA GTTCAACAAC
661 TTCGTCAACA AGCTCGTTCT TTCTATTTAA

Secuencia de aminoácidos - GenBank: ACU82824

1 MLARVASVAL RRAEGKIMPQ MVRALSVSAA SAAQAEKLP TAPLQLSGTS AQIATLLWQV
61 AAKENQLDKV QDELYQFIEL FKQHSELRRRL ATDPFVPTLV RTKIISSVLK DSGASEITTK
121 LFEALADEGA LSALLEVTVN YEELMLAHKK EVYCTVITAE PLDKLERVEL TKKAEEKFVDA
181 GFKLVMQEKI DKKLLGGFVI EFSDRRVDMS TAKKVVEEFNN FVNKLVLISI

ASA7**Secuencia de nucleótidos - GenBank: GQ427067**

1 ATGAGCTCTG TCCGCGCTGG TGTTGAGGCC GGTTCGAGGG ACCTTACCAC TTTTACCTTC
61 TCTGGTCTTC AGGATGCCCC TGTTGCTGCT CTTTCTGGGA GCATTAAGTT GAACGTTGCT
121 GCTAAGGCTG GCAAGGCTGA GGTCACCGTC GCTGCTGGCG CTGCCAAGGA TGCCACTCAG
181 GTTAGCGCTG CTGCCCTCAG GAAGCTTTC GGAAGCAAGA TTTCCCTTGC TGAGGTTGCC
241 AGGATTTCTG TTCTCCACTC TTCTATCCAG AACTACCTCC TTTCTCTTTC CAATGAGCGC
301 TACCAGCTCC TTTCTCAGTG GCCCGATTTT ACCACCATGT ACGGCAAGGA CTTCTACTAC
361 CGTGCCACC CTGAGGATCT TAAGAAGTTC TACGATGCCG CTGATGAGTA TTACAAGCTC
421 TATGAGACCG TCACCGAGTT CGATAGTCTC TCTGCCCTTG CCAGCCAGGT TGTTCCCAAC
481 TACGCTGCTC GTCGCCGTAG CACTGTTTAC CCCGCTATTG GCAGCACCGT CGCGGATGGT
541 GCCTTACCA ACTTCCTCCT CTCCAAGCAG TAA

Secuencia de aminoácidos – GenBank: ACU68928

1 MSSVRAGVEA GRRDLTTFTF SGLQDAPVAA LSGSIKLNVA AKAGKAEVTV AAGAACAATQ
61 VSAAALRKLS GSKISLAEVA RISVLHSSIQ NYLLSLSNER YQLLSQWPDF TTMYGKDFYY
121 RAHPEDLKKF YDAADEYYKL YETVTEFDSL SALASQVVPN YAARRRSTVH PAIGSTVADG
181 AFTNFLLSKQ

DELTA (ATP16)**Secuencia de Nucleótidos - GenBank: GU075869**

1 ATGTTTGGAC TCAAACGTGC CGTTACCGTG GGCAGGCGCT TTATCAGCAC CAGCGCTGCT
61 CGCATGGAGG CTGCTGCCCC CGCAGGTCCC AAGGAGTTCA CTGAGGTTTG GAATAAGAAG
121 GCTCCTTCCA CCCTTATTGT CCCTGAATTT CCTAGCAATT AACTGCGGT TAAGGCCGTT
181 GGTGAGGGTC AGGTTACCGG TGATGCTTTC CCCGTTAATT TTTATACCCC CCACAGCATT
241 CTTTCTCAGG CCCAGAAGGA TACCGTTGTC CTCCCCGGTG TTGACGGTTA CTTGCGGTGTG
301 AAGGCTTCTC ACGTTCCCAC TATTGCTCAG CTTAAGCCCG GCGTTGTTGA GCTCCACAGC
361 GGTGCTGAAT CTGAGAAATT CTTGCTTAGT GGTGGATTTG CCTTTGTTCA TCCCAATGGT
421 GTTACGATA TTTGCGTCCT TGAGGCCGCT ACCCTCGACC AGGTCGACCC TGCTGCCGTC
481 AAGAGTGCCC TCGCTGCTGC CTCTGCCGCT CAGCCCCTG ACGAGTTCGA GCAGGCTGCC
541 AACCGTGCCG CTATTGAGCT CTTACTCTGCT CTTGAGTCCG CTGTCGAGGC TAAGGCTTAA

Secuencia de aminoácidos - GenBank: ADE92943

1 MFGLKRAVTV GRRFISTSAA RMEAAAPAGP KEFTEVWNKK APSTLIVPEF PSNYTAVKAV
61 GEGQVHGDAF PVNFYTPHSI LSQAQKDTVV LPGVDGYFGV KASHVPTIAQ LKPGVVELHS
121 GAESEKFFVS GGFAFVHPNG VTDICVLEAA TLDQVDPAAV KSALAAASAA QPTDEFEQAA
181 NRAAIELYSA LESAVEAKA

ASA6

Secuencia de nucleótidos - GenBank: GU112182

```
1 ATGATGCTCA GGACTCTTAC TCGCAGCTCT GCTGTTGCTG GCCAGGCTGT TCGTCTGTTC
61 AAGACCTCCG CTGCTGCCGC GGAAGGCAAC TCTGTTGCTG GCATTATTAA GAGCGTCAAC
121 GAGACCAGTG GTGCCAACCT CCTTAGCAGT CTCAAGACTA TCAAAGCCCA GGCTGCTCCT
181 ATCTACCCTG CCGCTGCCTC TTCCACTGGT TATTCTACCC AGGCCAAGAT TGCCCTCTTC
241 GGTGCTCTCT CTTGGATTCT TTACAGGGCT GATGGCCAGT CTAAGGCCCA TGAGTGGATT
301 GTCGACCTTA ACCTGAATGT TCTTCAGGCT GCTTGGTTGA TCAGCTTCAG CAGCCTCATC
361 CCCTTCAGGG CTGTTTATTT TGCTTTCCGC GGCATGGCCC CCGCCACCGC CTCTACTCTT
421 AACGGCCTTA AGACCTTCAG CTCCATCAGC CTTTAA
```

Secuencia de aminoácidos – GenBank: ADE93002

```
1 MMLRTLTRSS AVAGQAVRLF KTSAAAAEEN SVAGIIKSVN ETSGANLLSS LKTIKAQAAP
61 IYPAAASSTG YSTQAKIALF GALSWILYRA DGQSKAHEWI VDLNLSLQAWLISFSSLI
121 PFRVYFAFR GMAPATASTL NGLKTFSSIS L
```

ASA8

Secuencia de nucleótidos - GenBank: GQ443453

```
1 ATGGTCCTCG GTGAGGTCTA CCTTAAGGAT ATTCTCCGCA CTCCCCCAC CGGGGCGATT
61 CCCGCGAATG TCCCCCATCC TTTTCAGACG AGCTTCTACA CCTATGCCAC CAAGAAGTTG
121 ATTCCCCGCC ACTGGTACCT CCTTGGTGGT TTCACCTTCA CCATCACTCT CTACGGTATC
181 CTCGATGGCC TTAGGGACAG TGGCAAGAAG AAGGCCTATG ACGAGGCCAT CCATGCCGGA
241 AAGACCCTT ACACTGCTGG TGGTCACTAA
```

Secuencia de aminoácidos – GenBank: ADH59420

```
1 MVLGEVYLKD ILRTPPTGAI PANVPHPFQT SFYTYATKKL IPRHWYLLGG FTFTITLYGI
61 LDGLRDSGKK KAYDEAIHAG KTPYTAGGH
```

c (ATP9)

Secuencia de nucleótidos - GenBank: GU075868

```
1 ATGTCTGTCC AGAGGCTTTC TCTCGGTGCC GCCCGCTGCC TCAGCGCTGG TGTGCTCGC
61 GTTCAGGCCA GCCAGGCTCT CGTTGCCAG AAGGCTGTTG CCGTCGCTCC CACCCGTGCC
121 CAGGCTGCCC CCGCTGAGGT TGCCAGGTT CGCTCCATGA GCGTCTCGC TGCCCTAAG
181 ATGGTTGGTG CCGGTTGCGC CACCATTGCC CTTGCCGGTG TCGGTGCCGG TCTCGGTGTT
241 ATGTTTCGGCT CCCTTATCAA CGGTGCCGCC CGCAACCCCA ACATTGCCAA GCAGCTTGTT
301 GGTTATGCTC TCCTCGGTTT CGCTCTTACT GAGTCTATCG CTCTTTTCTC CCTCCTCGTT
361 GTTTTCTTA TCCTCTTCGC TTAA
```

Secuencia de aminoácidos – GenBank: ADE92942

```
1 MSVQRLSLGA ARCLSAGVAR VQASQALVAQ KAVAVAPTRA QAAPAEVAQV RMSVLAASK
61 MVGAGCATIA LAGVGAGLGV MFGSLINGAA RNPNIKQLV GYALLGFALT ESIALFSLLV
121 VFLILFA
```

Secuencias construidas a partir de EST's de *polytomella parva*.

ASA5 (Parcial)

Faltan 14 primeros aminoácidos

Secuencia de nucleótidos - GenBank: BK006876

```
1 GCTGTTGTGG CCTCCTGGGT GCTTTGGCAC TTGGACACCC AGCTCCTCCC CACCATCATG
61 AGAGAGCACA AGCTCCATGC TTGCTGGGCT GCCGCTGCCA AGAGGTACAA TGAGAAGCTT
121 TTCAAGCTTA ACCCCTCTTA CGACAGGGTC CTCTCCCTCC CTGCTGTCTC TAAGAACCAG
181 GTCCTTGAGA ATGTCTTCCA CACTGCCCTT AAGGCTCCCG TTGAGCATCT TGAGAAGATG
241 GTCTCTGCGA ATAGCAAGGT CTACGATGCG TTGAACCTCC AAAGCAAGAG GGTTCCTATT
301 TGGCAAGTCA AGCCTGCTCT TTTTAA
```

Secuencia de aminoácidos - GenBank: DAA33941

```
1 AVVASWVLWH LDTQLLPTIM REHKLHACWA AAKRYNEKL FKLNPSYDRV LSLPAVSKNQ
61 VLENVFHTAP KAPVEHLEKM VSANSKVYDA LNLQSKRVLI WQVKPALF
```

ASA9

Secuencia de nucleótidos - GenBank: BK006898

```
1 ATGGCTGTCA CTAGTTTCCT TGGCAAGGCT TTTGAGAAGT ATTTCTATGA CTTCTCTGCC
61 TATGAGCAGT TTGGCCTTAA CAGGTTCCCTC TCTTCCAAGG GCCAATACGT TGCTTTGAGG
121 CACGTTGGCT TCGTCATGGT TGGCGTCAAC GTTCTCCTCG CTGCTAACTT CCCCTTTAAC
181 CCTCCTTTCC CTACTATTGG AATGTGCCCC GCTGGTTGGG AGGGTACCTG GGTTTGCCAA
241 GCGGACAAGG CCAAGGCCTT GGAGATGTAC AAGGAGTGGA AGAAGTCCAA CTAA
```

Secuencia de aminoácidos - GenBank: DAA33943

```
1 MAVTSFLGKA FEKYFYDFSA YEQFGLNRFL SSKGQYVALR HVGFMVGVN VLLAANFPFN
61 PPFPTIGMCP AGWEGTWVCQ ADKAKALEMY KEWKKS
```

**Anexo III:
Alineamiento de las subunidades ASA2, ASA4,
ASA7 y OSCP**

ASA2

Identidad(*): 34.75 % 39.71%
Similitud fuerte(:): 19.07% 21.53%
Similitud débil (.): 14.41% 15.79%
Diferencias: 31.78% 22.97%

```

          10          20          30          40          50          60
          |          |          |          |          |          |
ASA2_Vc   APAVQVPGVSGDAAGVLSSEIALLSPEAPSTGKDVADAAVALAYLGARGNRRLLWGKVLEK
ASA2_Cr   ATATFVPGVSGDASGVVSAVDALMSHDSAATGKDVADAAVALAYLGRGNRRVWGKVLEK
ASA2_Ps   -----DVPAILKEIDSLVSREAVS-AKEVSDAAVALTYLQVKANRRLLWGKVLEK
          * . . . . . : : : * * : : : . * : : * * * * * * * * * * . : . * * : * * * * * * * *
          70          80          90          100         110         120
          |          |          |          |          |          |
ASA2_Vc   AASLGPSLDGPSLIVNLSWALSAAVNEHTRTLAELAGPLAANLKS IKPSEVSYVVEALGKA
ASA2_Cr   AAST--PLDGPLANLSWALSAAVNDHTRTLAELAGPLAASLKSLSPAQVSFAVEAVGKS
ASA2_Ps   AGAAQ-DYDAASLTNLLWAINTEGVEHFKTVAELAGPAVSLPSLSPVQLSIVVEALGGA
          * . :      * . . * . * * * : . . . . . * * : * : * * * * * * . : * * * : * * : * * * * :
          130         140         150         160         170         180
          |          |          |          |          |          |
ASA2_Vc   GIADVVELFATVADLSESKSAELSAADLARLLWGFSGAGVQDGKLVKVASAGLVAKAGELG
ASA2_Cr   GAADVVELFAAVTELAARTADFKAADLARLLWGFAGAGVQDGKLVKAASAGLVAKAAELG
ASA2_Ps   GVKNYELYNKASAVVSKIIEFKPAEIRVLYGVAFGGVNDVALAKAA--GKVFASTEVD
          * : * * : . : : : : : . . . . . * : * * * * * * * . . * * * * * * * * * * : * : .
          190         200         210         220         230         240
          |          |          |          |          |          |
ASA2_Vc   GREAAQALWGLAALRRVPAALLGVLSKALKGGVDAPADAAAAAWALATLAVKADAATVR
ASA2_Cr   GREAAQALWGLAALRRVPAALAGALTKALKAGVEAPADAAAAAWALATLAVKADAGTVK
ASA2_Ps   SRTAAQALYALAKLGRA-DKATVDALLKSFKKGTESASDAAAASFALGSLSFKAEKAIVD
          . * * * * * : . * * * * * * * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * : . *
          250         260         270         280         290         300
          |          |          |          |          |          |
ASA2_Vc   ALADKAKAGAGDLSAAQAVQGGWGLAMLGDKDGAA--ALLGAATAVVQKDPAAALSPSALA
ASA2_Cr   ALADKAKAGVADLSAAQAVQGGWGLAMLGDKDGAA--ALLGAAAAVVQKDPPTSLSPSALA
ASA2_Ps   AL----KASAGDLAPAQAVEAAYGLALSGATDAEAFKALFGVVAPAIEKAPDALEVSSLA
          * *      * * . . . * * : * * * * * : * * . * . * * * * * . . . . . * * : * . * * * *
          310         320         330         340         350         360
          |          |          |          |          |          |
ASA2_Vc   LLYAGSVAAGVTGLPAQVTDFAAKGFGLAVEHSRHRVGAATAFYKEVAEAVAYATGARH
ASA2_Cr   LLHAGAVVSG-AGLPNPVSDFAAKGFGLAVEHGRHSRSSAAAFAHAELAEAVAYASGARH
ASA2_Ps   QLHVASTISG-AKLPAAVGSFVAKAFGLAADAARLKRSSAESALVADVAATAVAVFGAQY
          * : . . . . . : * : * * * * * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

          370      380      390      400      410      420
          |        |        |        |        |        |
ASA2_Vc  RPDVAAKVESYAVAAPDGSTLDV VVPLDANTKLAVIGVESELLSTAG--GVLGGSLAAVR
ASA2_Cr  RPDVASKVASFVSSGPDGSTLDV VVPADANTKLAVLGVEAEALASSG--AVLGGSLAAAR
ASA2_Ps  RPEVASAVASVYKTA PDGSVLDIAITKG-DAKVLVQAVPSSLTSTTPAKPLGHVAAYSK
          *:***: * *:. :.*****.***:.. . :*: * .* :. *::: ** * :
          430      440      450      460      470
          |        |        |        |        |
ASA2_Vc  VREAQGFKVALVPQAGWPAGAPLQARAQAVLVAIKASVPSLSSTVDKLA KGL
ASA2_Cr  VREAQGFKVAVVPQTEFPTGAPLKQRAAAVLGAIKKAVPGLSAMADKLSREL
ASA2_Ps  VREAQGYAV-----
          *****: *

```

ASA4

Identidad(*): 37.08%
Similitud fuerte(:): 19.66%
Similitud debil (.): 7.87%
Diferencias: 35.39%

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
ASA4_Vc   VAGAAPSKKDVLYNLSNPDPAEASVKAYLTSLYKGAKLESSTADGSLELTSKIEKKYKA
ASA4_Cr   ATGAAPSKKDVLYNLSNPDPAEASVKAYLTSLYKGAKLEPTTADDSLELTSKIEKKYKA
ASA4_Ps   ATEPAVSKKEVLYFLSSKDAESSTAVKSYLKSLYAGAQVEATETDAS-ELIAQLEKKYLS
          .: .* **::*** ** . *:::***:***:*** **::*: .: * * ** :::***: .
          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
ASA4_Vc   AAIVEYGLQNISVPLGYSSNIAPVKRYAAELRTLKKGAGFEDPATEVSKRLADTAATAD
ASA4_Cr   AAIVEYGLQTIISVPLGYSKSDLAPVKRYAAELRSLAKQAGFEDPATEVSKRLGATAATAD
ASA4_Ps   AQVVEPGVHNIALPLGESGS--APVKRYAAELFNLGAQAGFECPIEVSKKFGQETATSE
          * :** *:::*.:::*** * * ***** * .: :**** * *****:.. :***:
          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
ASA4_Vc   SVKELLTKSQSLMSPELYAALLEAVQQIENSTNSTLTLDGGSPPGYKEFAKKVETSAGGSL
ASA4_Cr   SVKELLSKNQSLMSADLYAALSEAVQQVENATNATLTLDGASPAYKQFAAKVE-----
ASA4_Ps   TVKDVLNKTKSIVSADYNAALNEVLSSVEAEINGPVLFDGKTEGFKKFAAKAK-----
          :***:*.:.:* :*.: *** *:::*. *..: ** : :.*** ** .:
          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
ASA4_Vc   RIRTTKLVWQGHGQKELDTSMYEGRSPCKFAWAEVQLQRSAQGVOFGKLTNWAIAAAHGI
ASA4_Cr   -----A-----IAKAHGI
ASA4_Ps   -----AVAVSRGL
          :* :***:
          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
ASA4_Vc   PAKLLVDVKKG----VTDDAVVKEYARYQQHAAVKDAIAELEALKADATLLDKHLGKSA
ASA4_Cr   PAKLLVDVKKGADEATSDALAKEYARWQQHAAVKDAIAELEALKAEATAVLDKHLGKTA
ASA4_Ps   PADTILAYCAGSANEDAADKVSKEFFTWFESAYTADAAAEVKAIIEAAASILDRHLAKPV
          ** . :. * : * : ** : : : * . ** **:::***:***:***:***:***:***:
          310     320     330     340     350
          |      |      |      |      |
ASA4_Vc   EQVRREQAAALAAAVKKAEEAKGAPWAVQFLEDVKRVWFDAEIAENPAVGPKVAA
ASA4_Cr   EQVRSEQAAVLAALAAIKKAEEAKGAPWAAAFLEDVKVQWFDACVAENPAVGPKVTA
ASA4_Ps   AQIRKEQASAYASLLKRAETAKGAKWAEKYLEVDKAVQWFDASVAEAPASGPKVA-
          *:* **::. * : :***:***:*** ** :***** *::***:.* ** **:::

```

ASA7

Identidad(*): 44.02%
Similitud fuerte(:): 20.65%
Similitud debil (.): 20.65%
Diferencias: 14.67%

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ASA7_Vc  LSTLVEKFTFGSPVDGPTSSLSGNSIKISAKASAKGVDVSVSAGAGSAKASYASSDLRKVA
ASA7_Cr  LSTLVEKFTFGSAADGPTASLSGNSVKLTVKSGKGVVSVSAGAGSAKVSYAPSDLRKVA
ASA7_Ps  ----LTTFTFSGLQDAPVAALSGSIKLNVAAKAGKAEVTVAAAGAAKAATQVSAALRKLS
          : .***. . * . * . : * . : . : * . : . . . . . : * . : * . : * . : * . :
          |      |      |      |      |      |
ASA7_Vc  AKPLVLQDVTRISTAHSFMSYLLSLTHERYSVLASWPDFTKAYGKDYRYRAHPDDLRFK
ASA7_Cr  ASSLVLQDVSRISTAHSAFMNYLLTLTHERYSVLATWPDFTKAYGKDYRYRAHPDDLRFK
ASA7_Ps  GSKISLAEVARISVLHSSIQNYLLSLSNERYQLLSQWPDFTTMYGKDFYRAHPEDLKKF
          . . : * : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . :
          |      |      |      |      |      |
ASA7_Vc  YSMVDEFHRMWDVVTEFGSLSGLAGQLVPGYRVRRHNTVHPALGPATADGAVVQFLLAHA
ASA7_Cr  YSMVDEFHRMWDVVTEFGSLSGLASQLVPGYRVRRHNTVHPALGPATADGAVVQFLLAHA
ASA7_Ps  YDAADEYYKLYETVTEFDLSALASQVVPNYAARRRSTVHPAIGSTVADGAFNTNLLSKQ
          * . . * . : : : : : . * . * . * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . :
          |      |      |      |      |      |
ASA7_Vc  EVRE
ASA7_Cr  K---
ASA7_Ps  ----
```

OSCP

Identidad(*): 61.39%
Similitud fuerte(:): 17.82%
Similitud debil (.): 7.92%
Diferencias: 12.87%

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
OSCP_Vc  AKSAPKTDYKLPVAPLQLSGTSGAIATLAWQVAAKENILTKVQDELYQLVEVFKTYPEIR
OSCP_Cr  AKTAPKAEMKLPVAPLQLSGTSGAIATLAWQVAAKENVLAKVQDELYQLVEVFKSHPEIR
OSCP_Ps  ----AQAECLKLPTAPLQLSGTSAQIATLLWQVAAKENQLDKVQDELYQFIELFKQHSELR
          .:::  **.*.*****.  ****  *****  *  *****:.*:*  .:.*
          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
OSCP_Vc  RLATDPFLPSAFRQKVVRDMFATKEVSEVTKRLMEALAEENSLSAIVQVTLAYEELMLAH
OSCP_Cr  RLATDPFLPDARFRKVVVRDMFATKDVTEVTKRLVEALAEENSLSAIVQVTLAYEELMLAH
OSCP_Ps  RLATDPFVPTLVRTKIISVVLKDSGASEITKKLFEALADEGALSALLEVTVNYEELMLAH
          *****:*  .*  *::  .::  .  .:.*:*.*.*****.*.:*****:.*:*  *****
          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
OSCP_Vc  KKEVHCTVVTAQPLDDAERAVFTKQAQAFVEPGFKLVMKEKVDRKLLGGFVLEFEDRLVD
OSCP_Cr  KKEVHCTVVTAQPLDDAERAVFTKQAQAFVDPGFKLVMKEKVDRKLLGGFVLEFEDRLVD
OSCP_Ps  KKEVYCTVITAEPLDKLERVELTKKAQKQVFDAGFKLVMQEKIDKLLGGFVIEFSDRRVD
          *****:*:*:*:*.*.  **  .:.*:*  *:*.*.*****:*:*:*.*.*****:*:*.*  **
          190     200
          |      |
OSCP_Vc  MSKAKKLEEFNNLVTKLENDLK
OSCP_Cr  MSQAKKLEEFNNLVTKLENDLK
OSCP_Ps  MSTAKKVVEEFNNFVNKLVLSI-
          **  ***:*:*:*:*.*.  .:

```

Identidad(*): 27.92%
 Similitud fuerte(:): 27.41%
 Similitud débil (.): 14.21%
 Diferencias: 30.46%

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
OSCP_Ps   AQAELKLP TAPLQ LSGTSAQ IATLLWQVAAKENQLDKVQDELYQFIELFKQHSELRRLAT
OSCP_bovino ---FAKLVRPPVQIYGI EGRYATALYSAASKQNKLEQVEKELLRVGQILKEP-KMAASLL
          * * . * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
OSCP_Ps   DPFVPTLVRTKIISSVLKDSGASEITKKLFEALADEGALSALLEVTVNYESLMLAHKKEV
OSCP_bovino NPYVKRSVKVKSLSDMTAKEKFSPLTSNLINLLAENGRLTNTPAVISAFSTMMSVHRGEV
          : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
OSCP_Ps   YCTVITAEPLDKLERVELTKKA EK FVDAGFKLVMQEKIDKLLGGFVIEFSDRRVDMSTA
OSCP_bovino PCTVTTASALDEATLTELKTVLKSFLSKGQVLKLEVKIDPSIMGGMIVRIGEKYVDMSAK
          * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
          190
          |
OSCP_Ps   KKVEEFNNFVNKLVLSI
OSCP_bovino TKIQKLSRAMREIL---
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * :
  
```

**ANEXO IV:
AMORTIGUADORES**

1. Purificación de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.*

Medio MAP

Beijerincks 100X	10.0 ml/2L
Elementos traza	2.0 ml /2L
Fosfato de K 1M	2.0ml/2L
Mes	15.6 g /2L
Acetato	8.0 g/2L

Vitaminas

Tiamina B1	2 mg/10ml
Cianocobalamina	0.1 mg/10mL
Filtrar la solución	

Solución de Beijerincks

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

Elementos Traza

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

Amortiguador de mitocondrias.

0.3M sacarosa	126.65 g/L
4 mM KEDTA	4 g/L
20 mM Tris pH7.4	2.43 g/L

Amortiguador de solubilización

50 mM de Tris-HCl pH 8.0	1.513g/250ml
--------------------------	--------------

1 mM de MgSO ₄	0.061g/250ml
1 mM PMSF.	200 µL de solución stocke 1M/250 ml
50 µg/ml TLCK.	1.25 ml de solución stocke 10 mgml ⁻¹ /250 ml
100 mM de NaCl	1.46 g/250 ml

Amortiguador de diálisis

50 mM Tris-HCl pH 8.0	12.11 g/2L
1 mM MgSO ₄	0.492 g/2L

Amortiguador de equilibrio de la columna de DEAE biogel A

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

Amortiguador de Lutter

20 mM Tris-HCl pH 7.5	1.21 g/500 ml
1 mM EDTA-Na	0.186 g/500 ml
10 mM Succinato	0.590 g/500 ml
35 mM NaCl	1.02 g/500 ml
2 mM ATP	0.55 g/500 ml
LM	0.1 mg/ml

2. Marcaje con reactivos fluorescentes

Amortiguador de diálisis

20 mM Tris-HCl pH7.5	0.605 g/250 ml
8 mM EDTA	0.74g/250 ml
1% SDS	25 ml de un solución al 10%

Amortiguador de equilibrio

20 mM Tris-HCl pH7.5	0.24 g/100 ml
8 mM EDTA	0.29 g/100 ml

3. Estudios de microscopía electrónica

Amortiguador de dilución

50 mM Tris pH 8.0	0.605 g/100 ml
1 mM EDTA	0.037g/100 ml
10% de glicerol	10 ml/100 ml
0.02% de digitonina	

4. Preparación de células competentes

Medio LB

Bactotripton	1 g/100 ml
Extracto de levadura	0.5 g/100 ml
NaCl	1 g/100 ml

Amortiguador TB

Pipes pH 6.7	0.3 g/100 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.22 g/100 ml
KCl	1.86 g/100 ml
MnCl ₂	1.09 g/100 ml
Ajustar el pH con KOH	

5. Extracción de ADN plasmídico por el método de fenol-cloroformo

Amortiguador TE

25 mM Tris-HCl pH 8.0	0.302 g/100 ml
25 mM EDTA pH8.0	0.925 g/100 ml

Amortiguador de lisis

0.2 M NaOH	0.04 g/50 ml
1% SDS	5 ml de SDS 10%/50 ml

Amortiguador de neutralización

3 M CH ₃ CO ₂ K pH 4.8	
Ajustar el pH con ácido acético.	

6. Clonación de los genes de las subunidades ASA en el vector pGEM-T easy.

Agarosa 1%

5g. de agarosa en 500ml de amortiguador TAE 1X.

Amortiguador TAE.

40 mM Tris-HCl pH 8	4.86 g/L
1 mM EDTA	1.37 g/L
0.115% Ácido acético	1.15 ml/L

Medio LB sólido

Bactotripton	5 g/500 ml
Extracto de levadura	2.5 g/500 ml
NaCl	5 g/500 ml
Agar	10 g/500 ml
Ampicilina	50 mg/500 ml

7. Clonación de los genes de las subunidades de interés en vectores de expresión.

Amortiguador universal SDB 10X

1 mM Tris-Acetato pH 8.3	3.30 ml/10 ml
5 M Acetato de Potasio	1.25 ml/10 ml
1 M Aceto de Magnesio	4 ml/10 ml
0.1M Spermidina	4 ml/10 ml
0.1M Ditioeritriol	0.50 ml/10 ml

Medio LB sólido

Bactotripton	5 g/500 ml
Extracto de levadura	2.5 g/500 ml
NaCl	5 g/500 ml
Agar	10 g/500 ml
Kanamicina	25 mg/500 ml

8. Expresión de las subunidades.

Amortiguador PBS

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
---	---------------

500 mM NaCl	2.92 g/100 ml
-------------	---------------

9. Purificación de las subunidades.

Amortiguador PBS

50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
500 mM NaCl	2.92 g/100 ml
1% Tritón X-100	1 ml/100 ml

Amortiguador de solubilización

50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
500 mM NaCl	2.92 g/100 ml
6 M Guanidina	53 g/100 ml

Amortiguador de lavado

50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
500 mM NaCl	2.92 g/100 ml
6 M Guanidina	53 g/100 ml
30 mM de imidazol	0.20 g/100 ml

Amortiguador de elución

50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
500 mM NaCl	2.92 g/100 ml
6 M Guanidina	53 g/100 ml
500 mM Imidazol	3.4 g/100 ml

Amortiguador de dialisis

50 mM de Tris pH 8.0	3.027 g/500 ml
1 mM EDTA	0.186 g/500 ml

10. Dicroísmo circular

Amortiguador de dilución

50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH7.8	0.69 g/100ml
100 mM NaCl	0.58 g/100ml
3% de glicerol	3 ml/100 ml

11. Co-purificación de las subunidades ASA.

Amortiguador de solubilización

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
6 M de guanidina	53 g/100 ml

Amortiguador de lavado 1

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
0.05% tween 20	50 µl/100 ml
3 M guanidina	26.5 g/100 ml

Amortiguador de lavado 2

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
0.05% tween 20	50 µl/100 ml
1 M guanidina	9 g/100 ml

Amortiguador de lavado 3

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
0.05% tween 20	50 µl/100 ml
0.3 M guanidina	3 g/100 ml

Amortiguador de diálisis

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
0.05% tween 20	50 µl/100 ml

Amortiguador de lavado 4

50 mM NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
0.05% tween 20	50 µl/100 ml
30 mM de imidazol	0.20 g/100 ml

Amortiguador de elución

50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH7.8	0.69 g/100 ml
100 mM NaCl	0.58 g/100 ml
0.05% tween 20	50 µl/100 ml
500 mM Imidazol	3.4 g/100 ml

Amortiguador de transferencia

50 mM Tris-HCl pH 8.3	5.8 g/L
40 mM Glicina	2.9 g/L
20% Et-OH	200 ml/L

Amortiguador TTBS

20 mM Tris-HCl pH 7.5	7.26 g/3 L
0.5 M NaCl	87.66 g/3 L
0.05% Tween 20	500 µl/3 L

Amortiguador de revelado

100 mM NaHCO ₃ pH 9.8	0.84g/100ml
1 mM MgCl	0.00952g/100ml
Solución 15 mM de NBT	1ml/100ml
Solución 15 mM de BCIP	1ml/100ml

Solución 15 mM de NBT

60 mg en 2.8 ml de DMF (Dimetilformamida) y 1.2 ml de agua

Solución BCIP 15mM

30 mg en 4 ml de agua

12. Amotiguadores para geles Tricina SDS-PAGE**Acilamida**

30% Acilamida	150 g/500 ml
0.98% Bis-acilamida	4.8 g/500 ml

Amortiguador electroforético

5 M Tris-HCl	181.7 g/500 ml
1 N HCl	40.3 ml/500 ml
0.3% SDS	1.5 g/500 ml

Solución 79.5% de Glicerol

79.5 ml de glicerol en 100 ml de agua.

Amortiguador anódo

0.2 M Tris-HCl pH 7.0	72 g/3 L
-----------------------	----------

Amortiguador de cátodo

0.1M Tris-HCl	36.3 g/3 L
0.1M Tricina	53.8 g/3 L
0.1% SDS	3 g/3 L

Mezcla para geles de 1.5mm

	10%	12%	14%	16%
Acrilamida-Bis acrilamida	2.5 ml	3 ml	3.5 ml	4 ml
Amortiguador electroforético	4 ml	3.5 ml	3 ml	2.5 ml
Glicerol 79.5%	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
APS (Persulfato de Amonio)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED (Tetrametiletilenodiamina)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

**ANEXO V:
ARTÍCULOS PUBLICADOS**

The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric

Alexa Villavicencio-Queijeiro · Miriam Vázquez-Acevedo · Araceli Cano-Estrada · Mariel Zarco-Zavala · Marietta Tuena de Gómez · Julio A. Mignaco · Monica M. Freire · Helena M. Scofano · Debora Foguel · Pierre Cardol · Claire Remacle · Diego González-Halphen

Received: 1 February 2009 / Accepted: 5 February 2009 / Published online: 26 February 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract Mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase of chlorophycean algae is a stable dimeric complex of 1,600 kDa. It lacks the classic subunits that constitute the peripheral stator-stalk and the orthodox polypeptides involved in the dimerization of the complex. Instead, it contains nine polypeptides of unknown evolutionary origin named ASA1 to ASA9. The isolated enzyme exhibited a very low ATPase activity (0.03 Units/mg), that increased upon heat treatment, due to the release of the F_1 sector. Oligomycin was found to stabilize the dimeric structure of the enzyme, providing partial resistance to heat dissociation.

Alexa Villavicencio-Queijeiro and Miriam Vázquez-Acevedo have contributed equally to this work.

A. Villavicencio-Queijeiro · M. Vázquez-Acevedo ·
A. Cano-Estrada · M. Zarco-Zavala · M. Tuena de Gómez ·
D. González-Halphen
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México D.F., Mexico

J. A. Mignaco · M. M. Freire · H. M. Scofano · D. Foguel
Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brazil

P. Cardol · C. Remacle
Genetics of Microorganisms, Institute of Plant Biology,
University of Liège,
Liège, Belgium

D. González-Halphen (✉)
Departamento de Genética Molecular,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM,
Apartado Postal 70-600, Delegación Coyoacán,
04510 México D.F., México
e-mail: dhalphen@ifc.unam.mx

Incubation in the presence of low concentrations of several non-ionic detergents increased the oligomycin-sensitive ATPase activity up to 7.0–9.0 Units/mg. Incubation with 3% (*w/v*) taurodeoxycholate monomerized the enzyme. The monomeric form of the enzyme exhibited diminished activity in the presence of detergents and diminished oligomycin sensitivity. Cross-linking experiments carried out with the dimeric and monomeric forms of the ATP synthase suggested the participation of the ASA6 subunit in the dimerization of the enzyme. The dimeric enzyme was more resistant to heat treatment, high hydrostatic pressures, and protease digestion than the monomeric enzyme, which was readily disrupted by these treatments. We conclude that the fully-active algal mitochondrial ATP synthase is a stable catalytically active dimer; the monomeric form is less active and less stable. Monomer-monomer interactions could be mediated by the membrane-bound subunits ASA6 and ASA9, and may be further stabilized by other polypeptides such as ASA1 and ASA5.

Keywords Mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase ·
Dimeric complex V · Monomeric complex V ·
Chlorophycean algae · *Chlamydomonas reinhardtii* ·
Polytomella sp. · ASA subunits

Introduction

Mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase (complex V), a key participant in oxidative phosphorylation, is a heteromultimeric protein complex embedded in the inner membrane. The enzyme is a proton-driven molecular motor that utilizes the electrochemical gradient generated by the respiratory

chain to synthesize ATP. Two of the best characterized ATP synthases, the beef heart enzyme and rat liver are comprised of at least 15 subunit types, i.e., α , β , γ , δ , ϵ , a , b , c , d , e , f , g , F_6 , A6L, and OSCP. They may also bind one or more regulatory peptides, e.g., IF1 and factor b, under certain physiological conditions (Golden and Pedersen 1998; Ko et al. 2000; Walker and Dickson 2006; Hong and Pedersen 2008).

The mitochondrial ATP synthase from chlorophycean algae, like the one from *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp., is a dimer of 1,600 kDa (van Lis et al. 2003; van Lis et al. 2005; Dudkina et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006; van Lis et al. 2007). Electron microscopy studies evidenced the unique dimeric structure of the algal enzyme (Dudkina et al. 2005; Dudkina et al. 2006). The structure exhibits two robust peripheral stalks, not evident in the dimers of bovine or yeast ATP synthases (Minauro-Sanmiguel et al. 2005; Dudkina et al. 2006). In addition, the algal enzyme differs strongly in its polypeptide composition from the mitochondrial ATP synthases of the vast majority of eukaryotes. It only contains the eight orthodox subunits α , β , γ , δ , ϵ , a (ATP6), c (ATP9), and OSCP, and in addition, it has nine atypical polypeptides of unknown evolutionary origin named ASA1 to ASA9 (Cardol et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006). Subunits ASA1 to ASA9 are thought to substitute for subunits b , d , e , f , g , IF1, A6L, and F_6 , which in the conventional enzymes are involved in the formation of the peripheral stalk (b , d , f , A6L, and F_6), in the dimerization of the complex (e and g), and in the regulation of the enzyme activity (IF1). Therefore, some of the ASA subunits are thought to be the building blocks of a distinct peripheral stalk, others may participate in the dimerization of the complex, and others may have a yet unknown regulatory function (Vázquez-Acevedo et al. 2006; van Lis et al. 2007).

In this work, we explored the ATP hydrolytic activity of the mitochondrial ATP synthase purified from *Polytomella* sp. The isolated enzyme exhibited a very low ATPase activity that increased upon heat treatment, due to its dissociation and the concomitant release of the F_1 sector. Oligomycin was found to stabilize the dimeric structure of the enzyme, providing partial resistance to heat dissociation. Incubation in the presence of several non-ionic detergents increased the ATPase activity up to 7.0–9.0 Units/mg. The detergent-activated enzyme is fully sensitive to oligomycin and is readily inactivated by heat treatment. It was previously shown that upon incubation at 60°C for short periods of time the mitochondrial ATP synthase purified from *Polytomella* sp. dissociated into monomers, and subsequently disassembled into F_1 moieties and free polypeptides (Vázquez-Acevedo et al. 2006).

The role of monomeric versus dimeric forms of ATP synthases remains obscure. Here, it was found that

incubation with 3% taurodeoxycholate (TDOC) in ice for 30 min also monomerized the algal ATP synthase, a process that was occasionally accompanied by the partial release of some of the small, membrane-bound subunits. Once the algal ATP synthase was obtained in a predominant monomeric form, the properties of the monomeric and dimeric enzymes were compared. The effects of heat treatment, high hydrostatic pressure, and protease digestion upon the monomeric and dimeric forms of the enzyme were assayed. While the dimeric enzyme was relatively resistant to different treatments, the monomeric enzyme was found to be extremely prone to dissociation. The data suggest that the fully functional form of the enzyme is dimeric, and that the monomeric form represents a labile form of the enzyme with diminished ATPase activity and diminished oligomycin sensitivity. The data also suggest that monomer-monomer interactions are mainly mediated by several small, membrane-bound subunits (ASA6 and ASA9) that may be further stabilized by larger polypeptides like ASA1 and ASA5.

Materials and methods

Algal strains and growth conditions *Polytomella* sp. (198.80, E.G. Pringsheim) was grown as previously described (van Lis et al. 2005).

Detergents Octaethylene-glycoldodecyl ether ($C_{12}E_8$) and n-dodecanoyl sucrose were obtained from Calbiochem. Lauryldimethylamine oxide (LDAO) was from Millmaster Onyx International (New Jersey, USA). Octanoyl-N-methylglucamide and Decanoyl-N-methylglucamide were obtained from Boehringer Mannheim. The rest of the utilized detergents were from Sigma.

Polytomella ATP synthase purification The procedure previously described was followed (Vázquez-Acevedo et al. 2006).

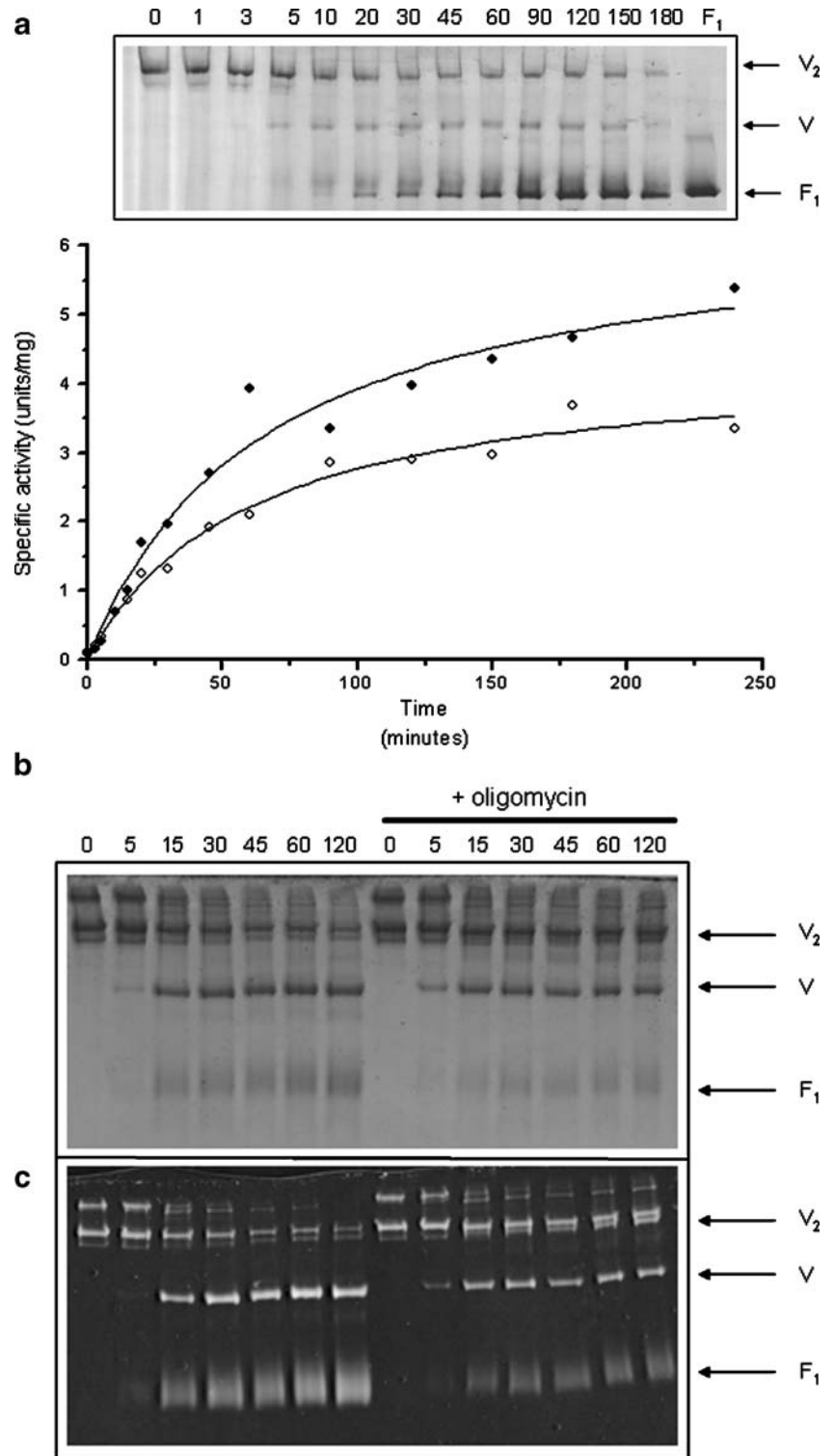
Protein analysis Proteins were solubilized in the presence of n-dodecyl- β -maltoside and subjected to BN-PAGE (Schägger 1994). BN-PAGE was usually carried out in 4%–12% acrylamide gradient gels. Denaturing SDS-Tricine-PAGE was carried out as in Schägger (1994). Protein concentrations were estimated according to Markwell et al. (1978). Cross-linking experiments were carried out with the water-insoluble, homo-bifunctional, thiol-cleavable reagent dithiobis(succinimidyl)propionate (DSP). The enzyme, in its dimeric or monomeric form (3 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 of n-dodecyl- β -maltoside, in the

presence of 0.2 mM DSP, for 30 min, at 4 °C. The reaction was stopped by the addition of 25 mM Tris (pH 8.0) (final concentration). The sample (120 µg of protein) was subjected to SDS- Tricine-PAGE [7% (w/v) acrylamide] in non-reducing conditions. The lanes of interest were cut and incubated for 1 h 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-SDS-Tricine-PAGE [12% (w/v) acrylamide].

Chymotrypsin cleavage experiments were carried out at room temperature in a 1:100 ratio (mg protein of protease: mg protein ATP synthase), in a buffer containing 20 mM

Fig. 1 Heat activation and effect of oligomycin upon the heat-induced dissociation of the ATP synthase from *Polytomella sp.* Panel A) ATPase activity of the purified algal ATP synthase as a function of time at 45 °C. Filled rhomboids, activity in the absence of oligomycin; open rhomboids, activity in the presence of oligomycin. The ATPase assay medium did not contain any added detergent. Inset: BN-PAGE showing samples retrieved from the time course of incubation at 45 °C. Numbers indicate time in minutes. Lane marked as F₁ was loaded with the algal enzyme incubated at 60 °C for 2 min. V₂ denotes the dimer, V the monomer, and F₁ the F₁ sector. Panel B) BN-PAGE showing samples retrieved from a time course of incubation (in minutes) of the algal ATP synthase at 37 °C in the absence and presence of oligomycin (preincubation for 30 min with 40 µg/ml). The positions of dimeric (V₂) and monomeric (V) complex V and of the F₁ subcomplex are indicated. 50 µg of protein were loaded in each lane. Panel C) In-gel ATPase activity staining of the gel shown in Panel B. Additional oligomycin was not added to the medium during the in-gel ATPase activity assay. 50 µg of protein were loaded in each lane. Dimer (V₂), monomer (V); F₁ sector (F₁)



Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ATP, 1 mM sodium EDTA and 0.1 mg/ml lauryl maltoside (LM). Protease cleavage was stopped by the addition of 1 mM phenylmethanesulphonyl-fluoride (PMSF) and 1 mM N α -Tosyl-Lys-chloromethylketone HCl (TLCK) final concentrations.

ATPase activity measurements ATPase activity was measured spectrophotometrically following the oxidation of NADH at 340 nm, using the ATP regenerating system described by Pullman et al. (1960) with modifications. The assay medium contained 3 mM MgSO₄, 30 mM K₂SO₄, 25 mM Tris-sulfate (pH 7.4), 3 mM sodium ATP, 3 units of pyruvate kinase, 4.5 units of lactate dehydrogenase, 1.5 mM of phosphoenol pyruvate, and 0.3 mM NADH. Where indicated, detergents at different concentrations were added. ATPase activity is expressed in Units/mg (μ moles ATP hydrolyzed min⁻¹ mg protein⁻¹). Usually, assays were carried out with 20 μ g of protein. To assay oligomycin sensitivity, samples were preincubated 30 min in the presence of 10 μ g/ml oligomycin. The inhibitor was also added to the assay medium at the same final concentration to attain maximal inhibition (98%). Preincubation alone in the presence of the inhibitor resulted only in a 50% loss of activity. DMSO was used as vehicle when adding the inhibitor.

In-gel ATPase activity ATPase activity was visualized after BN-PAGE (Zerbetto et al. 1997; Wittig and Schagger 2005). The gels were incubated for 3 h in a buffer containing 270 mM glycine and 35 mM Tris-HCl (pH 8.4). Then, the following reagents were added: 8 mM ATP, 14 mM MgSO₄, and 0.2% Pb(NO₃)₂ until the white precipitates of lead phosphate were visible. The reaction was stopped by adding 50% methanol.

Compression of the algal mitochondrial ATP synthase Experiments were carried out in the high pressure pump previously described (Souza et al. 2004) at a constant temperature of 25 °C. Samples of the dimeric or monomeric algal ATP synthase (100 μ g of protein) were compressed for 15 min at the indicated pressures. All samples (1 mg/ml of protein) were compressed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ATP, 1 mM sodium EDTA and 0.1 mg/ml LM.

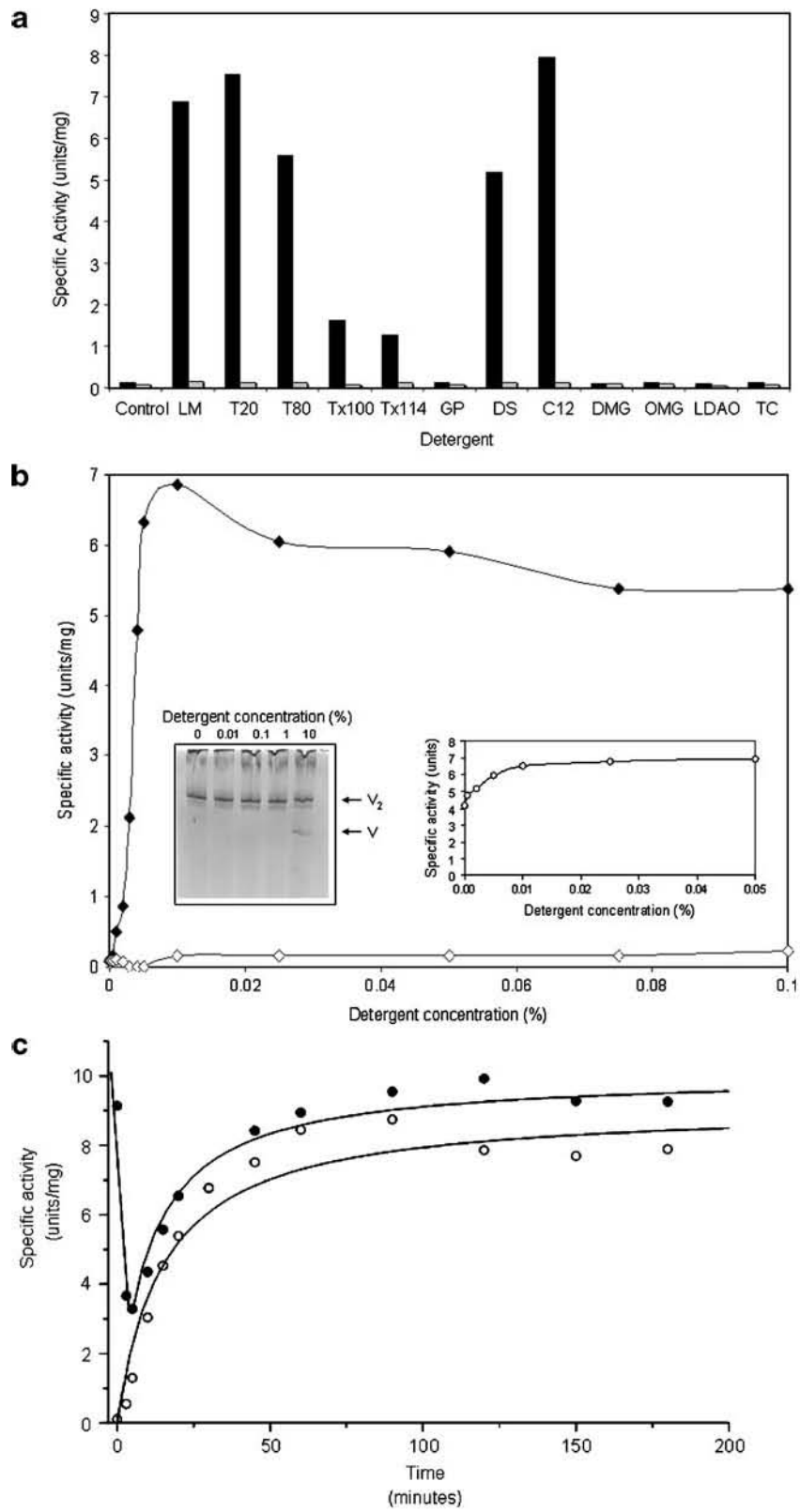
Results

The mitochondrial ATP synthase from *Polytomella sp.*, as isolated, exhibits a very low ATPase activity that increases upon heat treatment The algal enzyme, as obtained from the glycerol gradient centrifugation step (Vázquez-Acevedo

et al. 2006), exhibits a very low ATPase activity, of 0.03 to 0.07 Units/mg, in the absence of detergent in the assay medium. The hydrolytic activity of the enzyme increased by heat treatment. Incubation at 45 °C activated the enzyme as a function of time accompanied by a concomitant loss of oligomycin sensitivity (Fig. 1A). In order to explore the changes in the oligomeric state of the complex, samples retrieved from a time-course of thermal activation were subjected to BN-PAGE. The electrophoretic pattern revealed that during the time of heating there was a progressive diminution of the dimeric enzyme that paralleled accumulation of the monomeric species and F₁ subcomplexes. Therefore, heat activation and loss of oligomycin sensitivity seem to be due to the progressive release of free, active F₁ sector. BN-PAGE electrophoretic patterns and in-gel ATPase activity staining also revealed that the enzyme monomerizes as a function of time when it is incubated at 36 °C; and oligomycin partially prevented the heat-induced dissociation of the dimeric enzyme (Fig. 1B). Both the dimers and monomers were catalytically active, as shown in-gel ATPase activity staining (Fig. 1C). To allow the expression of the in-gel ATP hydrolytic activity, no oligomycin was added to the in-gel activity assay medium.

The algal mitochondrial ATPase is also activated by non-ionic detergents We explored if there are other conditions in which the enzyme may be activated without being

Fig. 2 Effect of detergents on the ATPase activity of the ATP synthase from *Polytomella sp.* Panel A) ATPase activity at 25 °C of the algal enzyme in the presence of various detergents (black bars). Detergents were added to the ATPase activity assay medium at a final concentration of 0.01% (w/v). Control: no detergent added; LM, lauryl maltoside; T20, Tween 20; T80, Tween 80; Tx100, Triton X100; Tx114, Triton X114; GP, n-octyl- β -D-glucopyranoside; DS, n-dodecanoyl sucrose; C₁₂, octaethylene glycol monododecyl ether; DMG, decanoyl-N-methylglucamide; OMG, octanoyl-N-methylglucamide, LDAO, lauryldimethylamine oxide, and TC, taurodeoxycholate. To assay oligomycin sensitivity (gray bars), samples were preincubated 30 min in the presence of 10 μ g/ml oligomycin. The inhibitor was also added to the assay medium at a final concentration of 5 μ g/ml. Panel B) Effect of increasing concentrations of LM in the assay medium on the ATPase activity of the enzyme. Filled rhomboids, activity in the absence of oligomycin; open rhomboids, activity in the presence of oligomycin. Left side inset : BN-PAGE electrophoretic pattern of the dimeric algal ATP synthase (V₂) incubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of LM; 60 μ g of protein were loaded in each lane. Only at concentrations as high as 10% LM, the appearance of a discrete band of the monomeric form (V) was observed. Right side inset : effect of increasing concentrations of LM in the assay medium on the ATP hydrolysis of the F₁ subcomplex. The F₁ sector was prepared by incubating the algal ATP synthase for two minutes at 60 °C. The assayed ATP hydrolytic activity was completely insensitive to oligomycin. Panel C) ATP hydrolytic activity of the purified algal ATP synthase as a function of time at 45 °C. The ATPase assay medium contained 0.01% LM. Filled rhomboids, activity in the absence of oligomycin; open rhomboids, activity in the presence of oligomycin



dissociated. To this end, different detergents were added to the ATPase activity assay medium. Some non-ionic detergents induced a large increase in the ATPase activity of the complex (Fig. 2A). The detergent-activated enzymes were fully sensitive to oligomycin. The non-ionic detergents dodecyl- β -D-maltopyranoside (lauryl maltoside, LM), octaethylene glycol monododecyl ether ($C_{12}E_8$), Tween 20, Tween 80, and n-dodecanoyl sucrose strongly activated the enzyme. In contrast, Triton X100 and Triton X114 induced a modest activating effect, while n-octyl- β -D-glucopyranoside, octanoyl-N-methylglucamide decanoyl-N-methylglucamide, lauryldimethylamine oxide (LDAO) and sodium taurodeoxycholate had no noticeable effect on the activity (Fig. 2A). The activation by LM was further explored. Figure 2B shows titration curves with increasing concentrations of LM in the assay medium in the absence and presence of oligomycin. Maximal activations were observed at concentrations of 0.01% (*w/v*) of LM (7.0 Units/mg). The detergent-activated enzyme was fully sensitive to oligomycin (Fig. 2B). The activation of the enzyme induced by detergents was not due to dissociation of the algal ATP synthase, since increasing detergent concentrations (up to 1%) did not disrupt the dimeric enzyme, as judged by BNE-PAGE (Fig. 2B, inset). Only when the enzyme was incubated in ice for 30 min in the presence of very high concentrations of detergent (10% LM), the appearance of a discrete population of monomeric forms of the enzyme became evident (Fig. 2B, inset). LM also activated the ATP hydrolytic activity of the F_1 sector. The F_1 sector was prepared by heating the dimeric enzyme for 2 min at 60 °C. In these conditions, the algal F_1Fo -ATP synthase is disrupted, giving rise to an active F_1 subcomplex that exhibits a relatively high ATPase activity (around 4.0 Units/mg). Increasing concentrations of LM to the ATPase assay medium further increased this activity up to values around 7.0 Units/mg (Fig. 2B, inset).

When the algal enzyme was incubated at 45 °C for increasing periods of time and its activity measured in the presence of detergent in the assay medium (LM 0.01%), a different pattern of activation was observed (Fig. 2C). In a first phase, the original activity, which was fully sensitive to oligomycin, decreased sharply during the first minutes, simultaneous to a discrete loss in oligomycin sensitivity. In a second phase, the ATPase activity of the enzyme increased as a function of time; this was accompanied by a parallel loss of oligomycin sensitivity (Fig. 2C). We attribute this second phase to the progressive disassembly of the F_1Fo -ATP synthase complexes and the consequent release of free, active, oligomycin-insensitive F_1 sectors.

Taurodeoxycholate monomerizes the algal mitochondrial ATP synthase When the dimeric enzyme is incubated at relatively high temperatures (i.e., 60 °C) for brief periods of

time, it dissociates into its monomers, and subsequently, into F_1 moieties and free independent subunits (Vázquez-Acevedo et al. 2006). We searched for conditions, other than heat treatment, that induce dissociation of the enzyme into stable monomers. The incubation of the enzyme with sodium taurodeoxycholate (TDOC), the hydrophilic, bile salt-related anionic detergent, induced a concentration-dependent dissociation of the enzyme into monomers (Fig. 3A); at relatively high concentrations of TDOC, F_1 was released, and the amount of free, dissociated subunits increased. Treatment with TDOC has the advantage over heat treatment in that it allows for a more precise control of the dissociation process, and in consequence, it is possible to work with a population of enzymes in which the monomeric form predominates, albeit in coexistence with undissociated dimers and free F_1 moieties (Fig. 3B). A concentration of 3% (*w/v*) taurodeoxycholate was chosen for all further experiments. The mixture of ATP synthases generated by treatment with 3% TDOC will be referred to as the monomeric form of the enzyme, although it actually represents a population with 50% monomers and 50% of a mixture of dimers, F_1 sectors and free subunits (Fig. 3B). TDOC-induced monomerization was irreversible, since treatment with the detergent, followed by extensive dialysis in the presence of 0.1% LM, did not restore the dimeric form of the complex (data not shown). The 3%-TDOC-treated enzyme exhibited an ATPase activity of 0.6 Units/mg in the absence of detergent in the assay medium, and increased in the presence of 0.01% LM to 2.0–4.0 Units/mg. In addition, the monomer was only partially sensitive to oligomycin (45% inhibition). The contrasting behavior between the dimeric and monomeric forms of the enzyme could also be observed by BNE-PAGE followed by in-gel ATPase activity staining (Fig. 3C). Both the dimer and the monomer exhibited in-gel ATP hydrolysis activity, however, the dimer was more sensitive to oligomycin than the monomer.

Neither heat treatment nor TDOC-induced monomerization elicited major changes in the subunit composition of the enzyme. The polypeptide patterns of the dimer and the monomer in SDS-Tricine-PAGE were essentially the same (data not shown). In some experiments, partial loss of the small, membrane bound subunits ASA6 and/or ASA9 was observed.

Crosslinking experiments suggest that subunit ASA6 may be involved in monomer-monomer interactions In order to identify possible close-neighbor interactions between the *Polytomella* ATP synthase subunits, the dimeric enzyme was incubated with dithiobis(succinimidyl)propionate (DSP) a homobifunctional, thiol-cleavable and membrane permeable crosslinker that has a spacer arm of 12 Å. The cross-link products were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. A first-dimension SDS-PAGE was run in the absence of

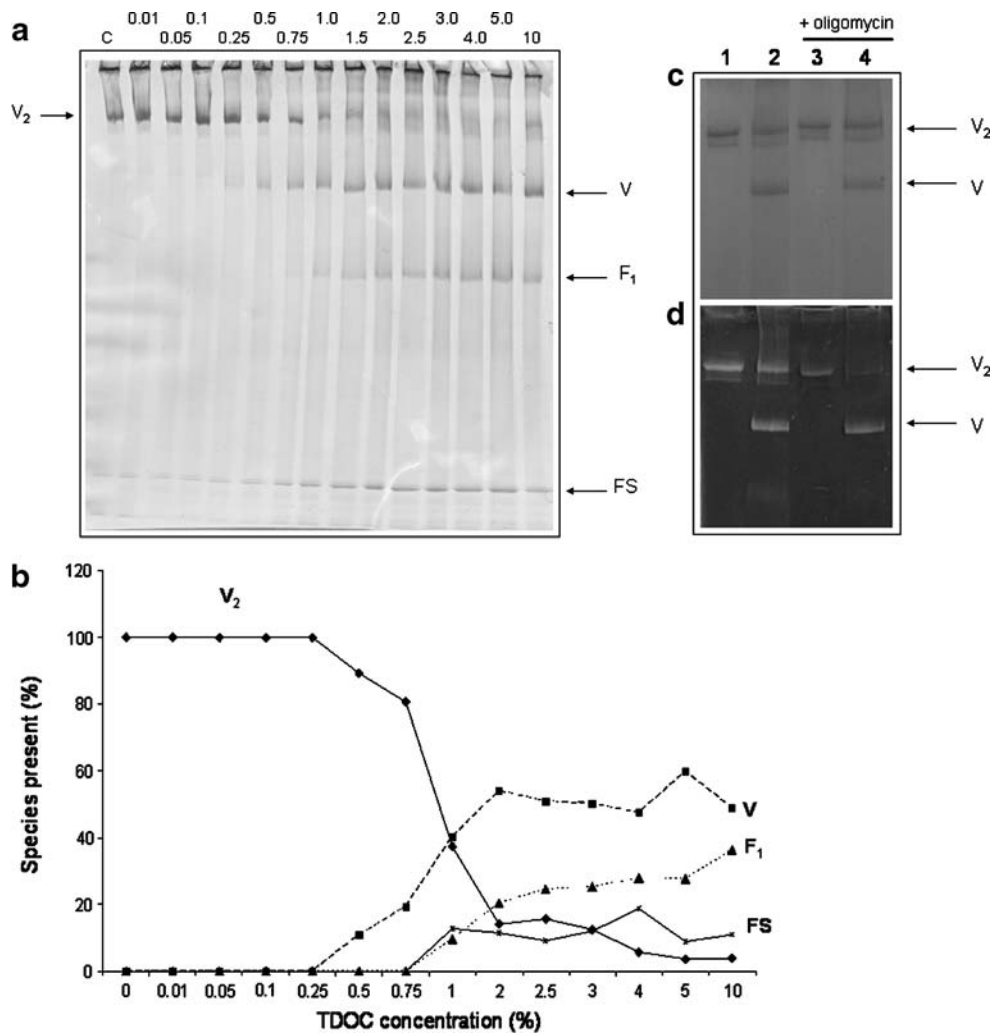


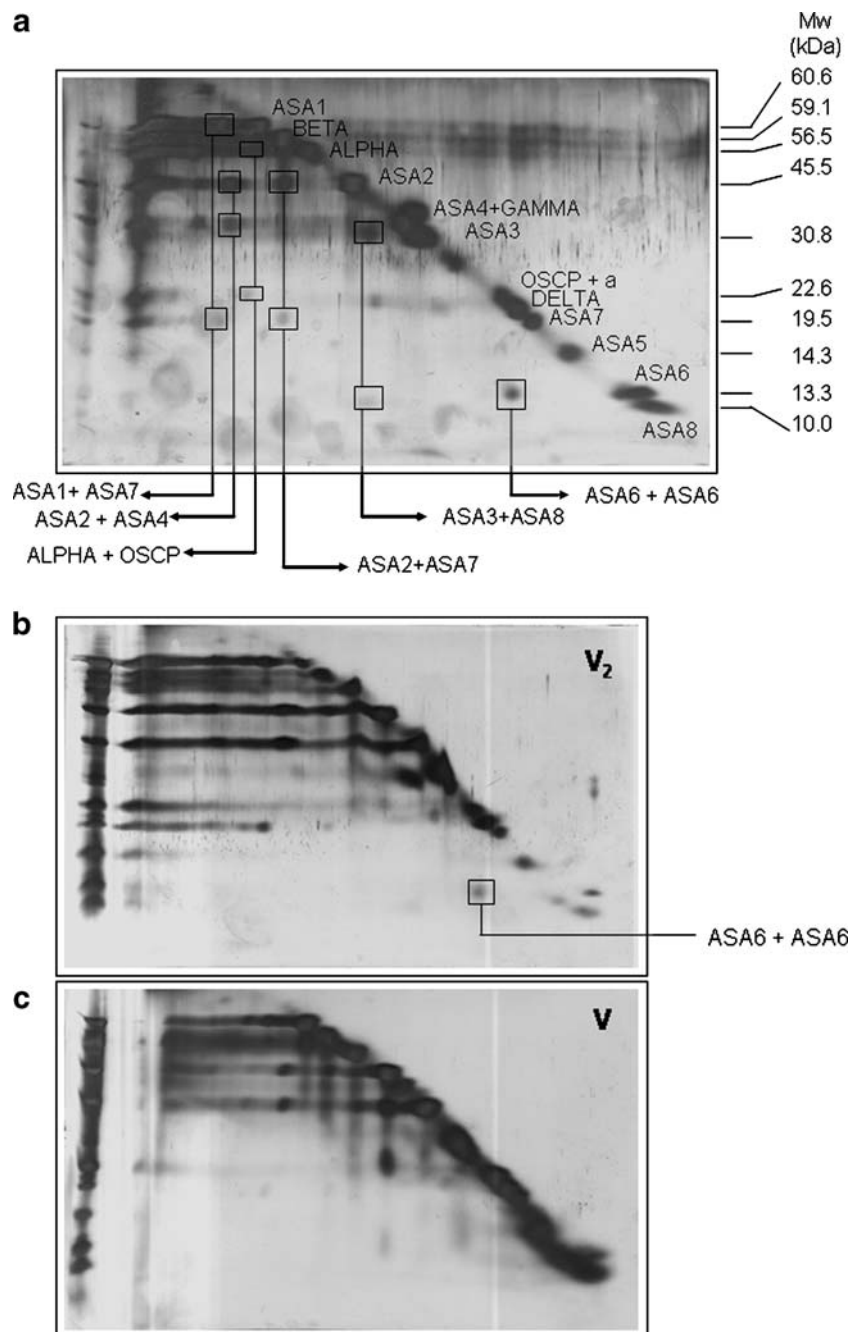
Fig. 3 Effect of increasing TDOC concentration on the oligomeric state of the ATP synthase from *Polytomella* sp. Panel A) BN-PAGE of purified ATP synthase samples incubated in the presence of TDOC at increasing concentrations (% w/v) in ice, for 30 min; 100 μg of protein were loaded in each lane. The control lane in the absence of the detergent is labelled C. Dimer (V₂), monomer (V); F₁ sector (F₁), Free subunits (FS). Panel B) Quantitation of the oligomeric forms of the algal ATP synthase as a function of TDOC concentration. Data were taken from the densitometric analysis of the gel shown in panel A. Curves denote the % of the different forms of the enzyme; 100% is the

sum of all species detected. Dimers (V₂, filled rhomboids), monomers (V, filled squares), F₁ sectors (F₁, filled triangles) and free, dissociated subunits (FS, crosses). Panel C) BN-PAGE of dimeric and monomeric forms of the enzyme. Lanes 1 and 3 were loaded with the dimer (V₂), lanes 2 and 4 with the monomer (V) prepared by incubation with 3% TDOC in ice for 30 min. The samples of lanes 3 and 4 were preincubated with oligomycin (10 μg/ml). 50 μg of protein were loaded in each lane. Panel D) In-gel ATPase activity staining of the samples shown in panel C

a reducing agent. Subsequently, a lane of the gel was incubated with DTT, in order to cleave the cross-link products, which were then resolved in 2D-Tricine-SDS gels. The major cross-linked products in the algal ATP synthase are shown in Fig. 4A. Of particular significance was the presence of a polypeptide spot with an apparent molecular mass of 26 kDa that was identified as a ASA6-ASA6 cross-linked product. The presence of the ASA6-ASA6 cross-linked product was observed in several different experiments carried out with the dimer (Fig. 4B). In contrast, no ASA6-ASA6 cross-linked

product could be observed when the reaction with the bifunctional reagent was carried out with the monomeric enzyme (Fig. 4C). The rest of the cross-linked products were formed in both the dimeric and the monomeric enzyme. Therefore, it is evident that the ASA6-ASA6 cross-linked product is formed between ASA6 subunits of two monomers that are in close vicinity in the intact, dimeric ATP synthase. This confirms that the interaction between ASA6 subunits, as originally suggested by van Lis et al. (2007), may contribute to the stability of the dimeric enzyme.

Fig. 4 Second dimensional analysis of the *Polytomella* ATP synthase subunits cross-linked with DSP. Panel A) *Polytomella* ATP synthase treated with the bifunctional reagent was resolved by SDS-Tricine-PAGE in non-reducing conditions (100 µg of protein). The 1D gel was then incubated in the presence of DTT to cleave the cross-linked products and subjected to 2D-SDS-Tricine-PAGE and silver staining. Panel A shows the original 2D gel. The identified cross-linked subunits that were released by DTT treatment and ran out of the diagonal, are indicated by boxes and connecting lines. Pure ATP synthase was used as molecular mass marker, and the apparent molecular masses (in kDa) are shown on the right hand side. Panels B and C) comparative 2D-SDS-Tricine-PAGE showing the ASA6-ASA6 cross-link product generated by DSP on the dimer (V_2) and the absence of such cross-link product when the experiment was carried out with the monomeric form of the enzyme (V)

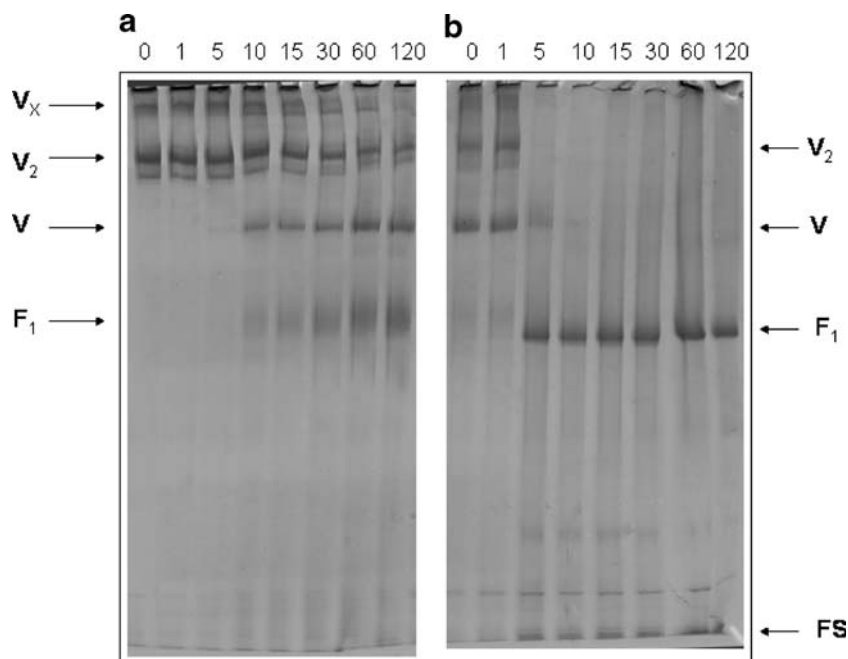


Properties of the dimeric and monomeric mitochondrial ATP synthase of Polytomella sp. The dimeric and monomeric forms of the enzyme were subjected to different treatments: high temperature, high hydrostatic pressures, and proteolysis. While the dimeric enzyme was relatively stable to incubation for up to 1 h at 36 °C, the monomer rapidly dissociated and liberated F_1 moieties under the same conditions (Fig. 5). Thus, the thermostability of the dimer is higher than that of the monomer. A higher oligomeric form of the enzyme (V_x) was observed in certain preparations

(Fig. 5). This high molecular species (possibly tetramers) migrate into the gel when the acrylamide gradients are slightly modified.

In a further characterization of the algal ATP synthase, the enzyme was subjected to high hydrostatic pressures, a method that is used to disrupt subunit interactions within oligomers (Silva et al. 1996). The algal ATP synthase was resistant to pressures up to 1,600 bar for 15 min. Treatment at higher hydrostatic pressures, 2,000 bar or more, disrupted the dimers into its polypeptide components

Fig. 5 Effect of a time course of incubation at 36 °C for the dimeric and monomeric forms of the algal ATP synthase. Panel A) Time course of incubation (in minutes) at 36 °C of the dimeric form of the enzyme (50 µg of protein in each lane). Panel B) Time course of incubation (in minutes) at 36 °C of the monomeric form of the enzyme (50 µg of protein per lane). Dimer (V_2), monomer (V); F_1 sector (F_1); free subunits (FS). V_x denotes oligomeric forms of the enzyme, probably tetramers



(Fig. 6A). In contrast, the monomeric enzyme released F_1 moieties at barely 200 bar, and completely dissociated into free subunits at 1,200 bar (Fig. 6B).

The dimeric and monomeric forms of the enzyme were also subjected to proteolytic degradation with chymotrypsin. The time course of cleavage of the dimeric and monomeric enzymes was followed by BN-PAGE (Fig. 7A, B). The dimeric enzyme was resistant to proteolytic degradation for as long as 1 h. In contrast, the monomeric form of the enzyme was degraded much faster, and F_1 moieties were released. The time course of cleavage was also followed by SDS-PAGE (Fig. 7C, D). When the pattern of digestion of individual subunits was examined, it was found that in the dimeric enzyme, the only proteolytically cleaved subunit was ASA3, although there were minor cleavages of the α and β subunits. When the monomeric enzyme was incubated in the presence of the protease, the cleavage of additional subunits was evident. Several of the small, membrane-bound subunits ASA6, ASA8 and ASA9, were rapidly degraded. In addition, the largest subunit, ASA1, was also rapidly cleaved. Subunit ASA5 exhibited a time course of cleavage similar to the one of ASA1. Therefore, it would appear that in the monomer, the accessibility of the external protease at various defined subunits is much higher than in the dimer.

Discussion

ATPase activity of Polytomella mitochondrial ATP synthase Our preparations of *Polytomella* mitochondrial ATP

synthase exhibit a very low ATPase activity that readily increases when incubated at relatively high temperatures. The enzyme can also be activated by non-ionic detergents. LM in the activity assay medium increased the ATPase activity of the enzyme. This is noteworthy, since LM was in contact with the enzyme throughout the purification procedure. The isolated enzyme contained detergent at a 0.1 (w/w) detergent/protein ratio. In this regard it may be mechanistically relevant that the 200-fold activation was achieved when LM was added to the ATPase activity assay cuvette at a 5.0 (w/w) detergent/protein ratio. This 50-fold increase in the detergent/protein ratio may explain the strong activation of the ATPase. The excess detergent may either induce a conformational change in the enzyme, or alternatively, it may release a yet undetermined inhibitory factor, analogous to the regulatory protein IF₁ in the bovine enzyme (Gledhill et al. 2007). Activation of the ATP hydrolytic activity of other ATP synthases has been described. The detergent LDAO stimulated 5 to 6-fold *Escherichia coli* ECF₁ and ECF₁-Fo ATPase activities in a concentration-dependent manner. The detergent effect was attributed to a release of the inhibitory action of subunit ϵ on subunit β (Löttscher et al. 1984). LDAO also activated ATP hydrolysis of the mitochondrial F₁Fo-ATP synthase, probably due to the release of the inhibitor protein IF₁ (Vázquez-Laslop and Dreyfus 1986). The mechanism by which LM stimulates the ATP hydrolytic activity of the algal mitochondrial ATP synthase remains to be ascertained, since an orthodox inhibitor protein does not seem to be present in the isolated enzyme. Also, a homolog of the gene encoding the bovine ATPase inhibitor protein IF₁

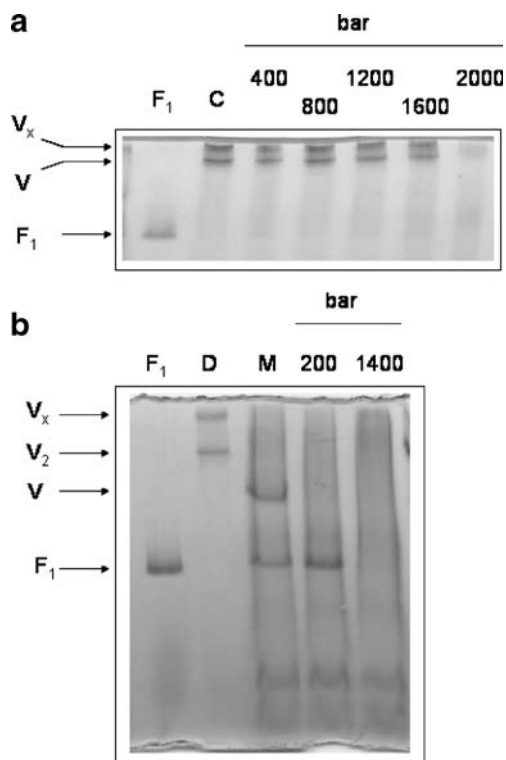


Fig. 6 Effect of high hydrostatic pressures upon the dimeric and monomeric forms of the algal ATP synthase. Panel A) Incubation of the dimeric algal ATP synthase at high hydrostatic pressures. Lane F₁ shows the F₁ sector generated by heating the ATP synthase for 2 min at 60 °C; lane C, uncompressed, intact, dimeric ATP synthase. The five following lanes show the enzyme subjected for 30 min to increasing high hydrostatic pressures (in bars). Panel B) Incubation of the monomeric algal ATP synthase at high hydrostatic pressures. Lane F₁ shows the F₁ sector generated by heating the ATP synthase for 2 min at 60 °C; lane D, intact, dimeric ATP synthase; Lane M, monomeric form of the enzyme. The two following lanes show the monomeric enzyme subjected for 15 min to increasing high hydrostatic pressures (in bars). The oligomeric (V_x), dimeric (V₂), and monomeric (V) forms of the enzyme are indicated, as well as the F₁ sector. 50 µg of protein were loaded in each lane

could not be identified in the genome of the closely-related green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Cardol et al. 2005). LM activates the hydrolytic activity of the ATP synthase of *Polytomella* sp. possibly exerting a conformational change upon subunits α , β , γ , δ , or ϵ . It was previously proposed that the C-terminal extensions of the chlorophycean ATP synthase β subunits, originally described by Franzén and Falk (1992), could function similarly to the inhibitor protein IF₁ (Atteia et al. 1997). The possible regulatory role of these extensions remains to be explored.

ATPase activity of *Polytomella* mitochondrial ATP synthase and oligomycin sensitivity Oligomycin is a classical inhibitor of proton translocation in F₁F_o-ATPase (Slater 1967; Tzagoloff 1970). Sensitivity to oligomycin is related to the

structural integrity of the enzyme. If F₁ is detached from F_o, although ATP hydrolysis may take place, its sensitivity to oligomycin is lost. The inhibitor interacts with subunits *a* and *c* of the F_o sector (John and Nagley 1986; Galanis et al. 1989). Oligomycin was found to be a potent inhibitor of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella*, when it was preincubated with the enzyme and also added in the assay medium. In these conditions, oligomycin inhibited more than 98% of the detergent-stimulated ATPase activity of the complex. The high sensitivity of the algal ATP synthase to oligomycin, suggests that the increase in ATP activity by non-ionic detergents does not involve dissociation of the dimer, indeed, sensitivity to oligomycin was lost when dissociation of the enzyme was induced by heat treatment. This process was accompanied by monomerization and eventual disruption of the ATP synthase into F₁ sectors and free subunits (Fig. 1A). Oligomycin also seems to partially prevent the heat-induced dissociation of the dimeric algal ATP synthase, providing some ligand-induced thermostability to the complex (Fig. 1B). In this regard, it is noted that binding of ligands may confer thermostability to ATP synthases, i.e., the binding of Mg²⁺-ADP to the F₁F_o-type ATP synthase from the thermophilic *Bacillus* PS3 (Villaverde et al. 1997).

On the dimeric nature of mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae *In vivo*, mitochondrial ATP synthases are thought to form oligomeric structures that determine the shaping of the mitochondrial cristae (Arnold et al. 1998; Arselin et al. 2004; Minauro-Sanmiguel et al. 2005; Strauss et al. 2008; Zick et al. 2009). These F₁F_o-ATP synthase supracomplexes microdomains may ensure mitochondria with an optimal bioenergetic function (Bornhövd et al. 2006). When solubilized, the oligomeric associations are disrupted and the ATP synthase usually monomerizes. This monomerization seems to be accompanied by the loss of small polypeptides (Meyer et al. 2007). In fact, LM-solubilized complex V from different mitochondrial sources, usually migrates in BN-PAGE as monomers of 550–600 kDa (Schägger 1994; Jänsch et al. 1996; Arnold et al. 1998; Horvath et al. 2000; Eubel et al. 2004). Milder solubilization conditions, i.e. in the presence of digitonin, are required to observe dimeric complex V (Schägger 2001; Paumard et al. 2002; Minauro-Sanmiguel et al. 2005), and higher oligomeric forms, such as trimers and tetramers (Krause et al. 2005) in BN-PAGE. In the presence of LM, complex V from chlorophycean algae (i.e., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Polytomella* sp., *Scenedesmus obliquus*, etc.) migrates with an apparent molecular mass of 1,600 kDa in BN-PAGE (van Lis et al. 2003; van Lis et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006). The migration properties of algal ATP synthase in BN-PAGE already suggested that it is a remarkable stable dimer. In certain preparations, the presence of oligomeric forms of the enzyme (V_x), possibly tetrameric forms, were

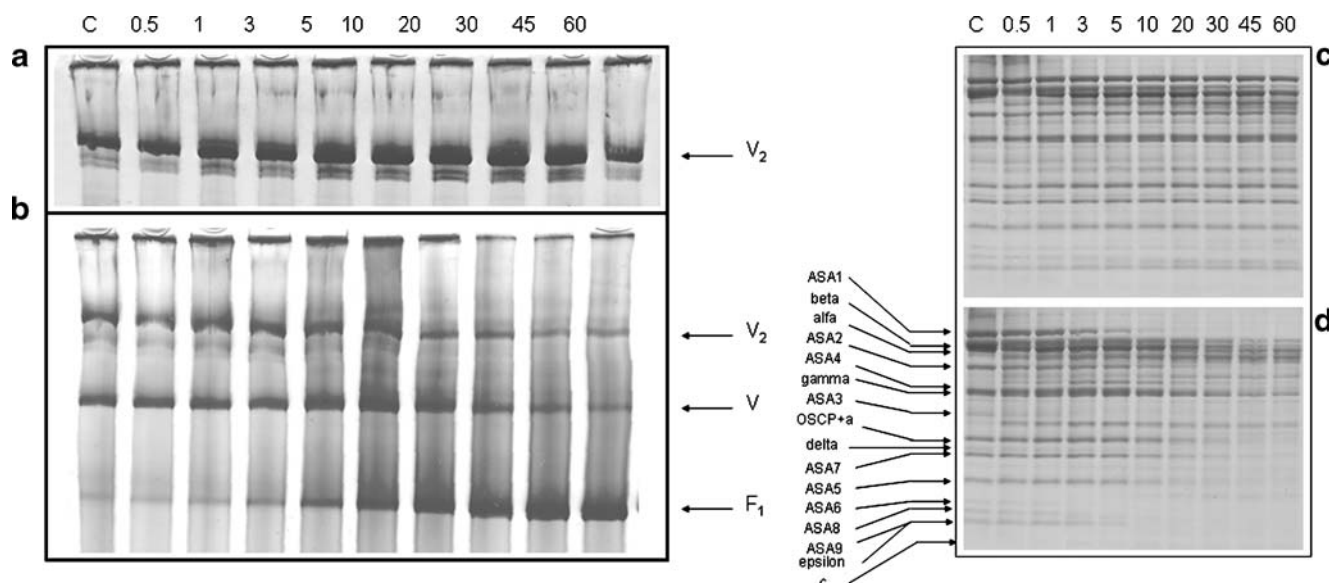


Fig. 7 Effect of a time course of incubation with chymotrypsin on the dimeric and monomeric forms of the algal ATP synthase. Panels A and B) BN-PAGE of a time course of incubation (in minutes) of the dimeric (Panel A) and monomeric (Panel B) forms of the enzyme with chymotrypsin (1:100 w/w ratio protease/enzyme). Panel C and D) SDS-Tricine-PAGE electrophoretic patterns of a time course of

incubation (in minutes) of the dimeric (Panel C) and monomeric (Panel D) forms of the enzyme with chymotrypsin (1:100 w/w ratio protease/enzyme). Protease digestions were carried out at room temperature for the indicated times (in minutes). 100 μ g of protein were loaded in each lane

also evident (see for example, Fig. 6). In this work, we found that treatment of the algal complex V with 3% TDOC allowed the formation of stable monomers. The monomeric form of the enzyme and the dimer exhibited the same polypeptide composition as judged by SDS-Tricine-PAGE, although some times monomerization was accompanied by a partial loss of the small, membrane bound polypeptides ASA6 and ASA9. van Lis et al. (2007) also observed that incubation of *Polytomella* sp. mitochondria at 55 °C brought about monomerization of the mitochondrial ATP synthase in BN-PAGE. In their conditions, monomerization was accompanied by the loss of subunits ASA6 and ASA9, which suggested that these subunits participate in enzyme dimerization. Here, the participation of ASA6 in the dimerization of the enzyme was also demonstrated by the cross-link experiments. Cross-linking by bifunctional reagents has been traditionally used to explore close-vicinity of polypeptides in oligomeric complexes (González-Halphen 1988). While an ASA6-ASA6 cross-link product readily formed when the dimeric ATP synthase was incubated with DSP, no cross-link product was obtained with the monomeric form of the enzyme. Thus, subunit ASA6 seems to be instrumental in maintaining the dimeric conformation of the algal ATP synthase. It is important to note that subunit ASA6 shows no sequence similarity to the orthodox subunits *e* and *g*, which are thought to mediate dimerization of the yeast ATP synthase (Arnold et al. 1998; Brunner et al. 2002). The

sequence of ASA6 also lacks a GXXXG motif, involved in the dimerization of the yeast *e* subunits (Yao et al. 2008).

The dimeric and monomeric forms of the algal ATP synthase were subjected to different treatments in order to gain insight into their stability. The dimer was more resistant than the monomeric form to heat treatment, high hydrostatic pressures, and protease degradation.

The effects of high hydrostatic pressure on the mammalian mitochondrial ATP synthase have been studied before (Penniston 1971; Dreyfus et al. 1988). While the F₁ portion lost activity upon compression-decompression (unless protected by 30% glycerol), the beef heart F₁F₀-ATP synthase complex was resistant to pressures up to 1,700 bar, and retained activity upon decompression (Dreyfus et al. 1988). The algal F₁F₀-ATP synthase retained its dimeric conformation after compression at 1,600 bar and decompression, whereas the monomeric form of the enzyme readily dissociated when subjected to the relatively low pressures of 200 bar.

When the dimer was subjected to chymotrypsin degradation, it was found that the ASA3 subunit was cleaved, along with some of the α and β subunits. ASA3 subunit is known to be susceptible to protease cleavage; in the purified enzyme it usually exhibits a degraded N-terminus (Vázquez-Acevedo et al. 2006). In contrast, the monomeric form of the enzyme has more exposed subunits to protease degradation, such as the small membrane-bound polypeptides

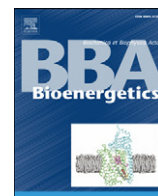
ASA6 to ASA9, and other subunits like ASA1 and ASA5. Altogether, the data suggest that the algal ATP synthase forms stable dimers, less susceptible to be monomerized by detergents than the mitochondrial ATP synthases from various species, including mammals, yeast and plants. It is likely that the robust dimeric nature of the algal complex may be relevant *in vivo*, and could be related to the tightly regulated ATPase activity of the enzyme or/and to maintain the highly structured tubular cristae typical of *Polytomella* mitochondria (Dudkina et al. 2006). Therefore, the data indicate that the fully-active form of the algal ATPase is the structurally stable dimer, and that the monomeric form of the enzyme is a less active, unstable complex.

Acknowledgments We thank Prof. Armando Gómez-Puyou for his critical review of the paper. This research was supported by grants 56619 from CONACyT (Mexico) IN217108 from DGAPA, UNAM (Mexico), CNPq and FAPERJ (Brazil), and by grants from the Belgian FRFC (2.4587.04, 2.4582.05 and F.4735.06). PC is postdoctoral fellow of the FRS-FNRS (Belgium).

References

- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schägger H (1998) Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17:7170–7178
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brèthes D, Velours J (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 279:40392–40399
- Attea A, Dreyfus G, 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
- Bornhövd C, Vogel F, Neupert W, Reichert AS (2006) Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F₁F₀-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem* 281:13990–13998
- Brunner S, Everard-Gigot V, Stuart RA (2002) Su e of the yeast F₁F₀-ATP synthase forms homodimers. *J Biol Chem* 277:48484–48489
- Cardol P, González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C (2005) The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol* 137:447–459
- Dreyfus G, Guimaraes-Motta H, Silva JL (1988) Effect of hydrostatic pressure on the mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* 27:6704–6710
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (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
- Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* 580:3427–3432
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* 134:1450–1459
- Franzén LG, 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
- Galanis M, Mattoon JR, Nagley P (1989) Amino acid substitutions in mitochondrial ATP synthase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to venturicidin or ossamycin resistance. *FEBS Lett* 249:333–336
- Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2007) How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15671–15676
- Golden TR, Pedersen PL (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
- González-Halphen D, Lindorfer MA, Capaldi RA (1988) Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochemistry* 27:7021–7031
- Hong S, Pedersen PL (2008) ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:590–641
- Horvath A, Kingan TG, Maslov DA (2000) Detection of the mitochondrially encoded cytochrome c oxidase subunit I in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. Evidence for translation of unedited mRNA in the kinetoplast. *J Biol Chem* 275:17160–17165
- Jansch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *The Plant Journal* 9:357–368
- John UP, Nagley P (1986) Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 6 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin resistance. *FEBS Lett* 207:79–83
- Ko YH, Hüllihen J, Hong S, Pedersen PL (2000) Mitochondrial F(0)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F₁ motor shielded by F(0), Functional significance, evidence for an involvement of the unique F(0) subunit F(6). *J Biol Chem* 275:32931–32939
- Krause F, Reifschneider NH, Gotom S, Dencher NA (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 329:583–590
- Lötscher HR, deJong C, Capaldi RA (1984) Interconversion of high and low adenosinetriphosphatase activity forms of *Escherichia coli* F₁ by the detergent lauryldimethylamine oxide. *Biochemistry* 23:4140–4143
- Markwell MAK, Hass SM, Biber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206–210
- Meyer B, Wittig I, Trifilieff E, Karas M, Schägger H (2007) Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* 10:1690–1699
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García JJ (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 102:12356–12358
- Paumard P, Arselin G, Vaillier J, Chaignepain S, Bathany K, Schmitter JM, Brèthes D, Velours J (2002) Two ATP synthases can be linked through subunits *i* in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 41:10390–10396
- Penniston JT (1971) High hydrostatic pressure and enzymic activity: inhibition of multimeric enzymes by dissociation. *Arch Biochem Biophys* 142:322–332
- Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.

- I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 235:3322–3329
- Schägger H (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52:119–128
- Schägger H, in: von Jagow G, Schägger H, (Eds.) (1994) *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic, San Diego, pp. 59–79
- Silva JL, Foguel D, Da Poian AT, Prevelige PE (1996) The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Curr Opin Struct Biol* 6:166–175
- Slater EC (1967) Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. *Methods Enzymol* 10:48–57
- Souza MO, Creczynski-Pasa TB, Scofano HM, Gräber P, Mignaco JA (2004) High hydrostatic pressure perturbs the interactions between CF(0)F(1) subunits and induces a dual effect on activity. *Int J Biochem Cell Biol* 36:920–930
- Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27:1154–1160
- Tzagoloff A (1970) Assembly of the mitochondrial membrane system. 3. Function and synthesis of the oligomycin sensitivity-conferring protein of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 245:1545–1551
- van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, 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, 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, Atteia A (2007) New insights into the unique structure of the FoF₁-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, Remacle C, González-Halphen D (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg Biomembr* 38:271–282
- Vázquez-Laslop N, Dreyfus G (1986) Mitochondrial H⁺-ATPase activation by an amine oxide detergent. *J Biol Chem* 261:7807–7810
- Villaverde J, Cladera J, Padrós E, Rigaud J-L, Duñach M (1997) Effect of Nucleotides on the Thermal Stability and on the Deuterium Kinetics of the Thermophilic F₀F₁ ATP Synthase. *Eur J Biochem* 244:441–448
- Walker JE, Dickson VK (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1757:286–296
- Wittig I, Schägger H (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5:4338–4346
- Yao H, Stuart RA, Cai S, Sem DS (2008) Structural characterization of the transmembrane domain from subunit e of yeast F₁F₀-ATP synthase: a helical GXXXG motif located just under the micelle surface. *Biochemistry* 47:1910–1917
- Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 18:2059–2064
- Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biophys Biochim Acta* 1793:5–19



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 OSCP r, 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-pyridyldithio)-propionate (SPDP; Pierce) and its water-soluble analog sulfo-succinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-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 1
Sequences 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

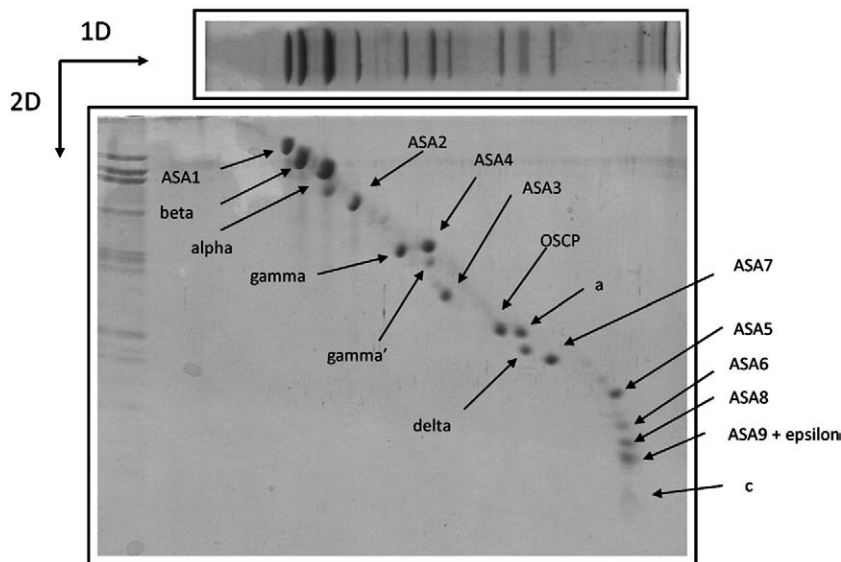


Fig. 1. 2D resolution of the polypeptides that constitute the mitochondrial *Polytomella* F_1F_0 -ATP synthase. *Polytomella* ATP synthase (100 μ g of protein) were resolved in a glycine-SDS-PAGE system (10% acrylamide). The 1D gel was then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained 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 ± 0.243 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 $\sim q = 0.013 \text{ \AA}^{-1}$ (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 = $3 \times R_g^{-2}$),

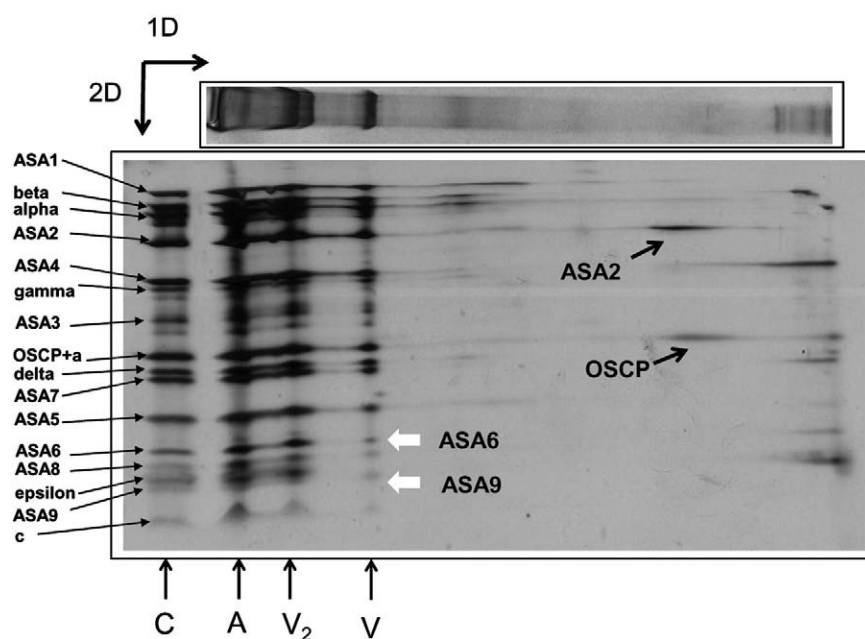


Fig. 2. Subcomplexes of the algal ATP synthase generated by detergent treatment and controlled heat dissociation. The purified algal ATP synthase (120 μg of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of additional 0.5% LM and then heated at 60 °C for 26 sec. The mixture was then resolved 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.

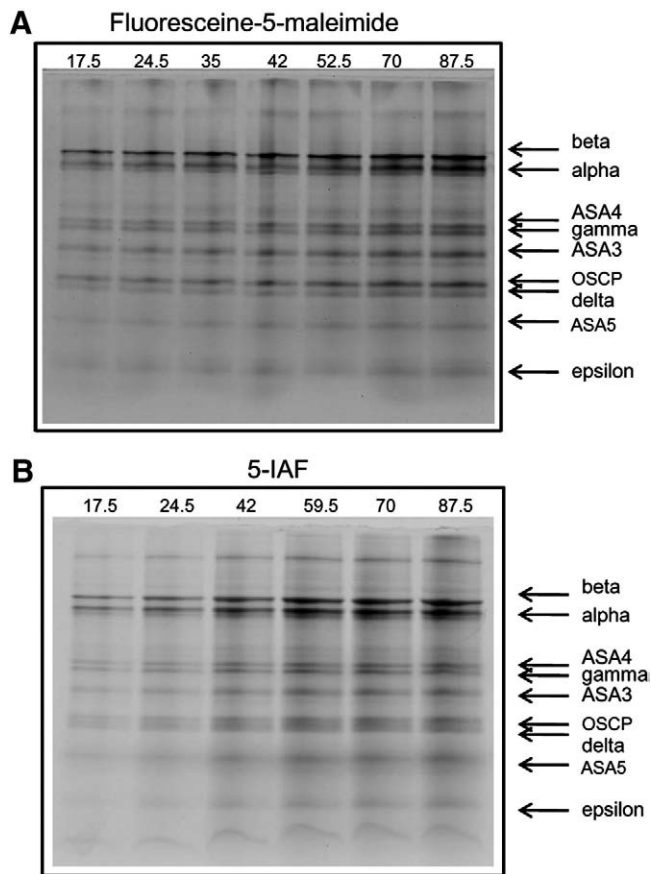


Fig. 3. Labelling of cysteine residues of the algal ATP synthase with fluorescent probes. In both panels, the labeled ATP synthase was resolved by tricine-SDS-PAGE and the images were obtained after scanning the electrophoretic pattern of the fluorescently-labeled enzymes. The amounts of labeled protein 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_1F_0 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_1F_0 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 α and OSCP, and subunits

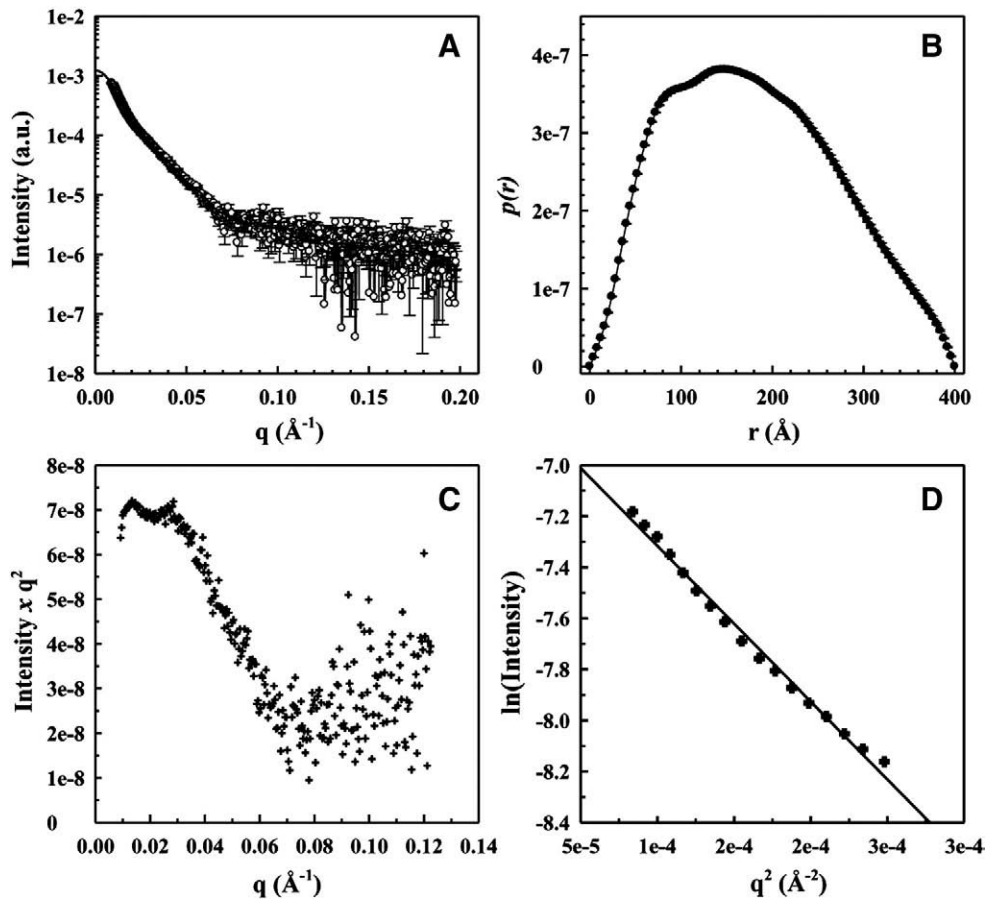


Fig. 4. SAXS data of *Polytomella* F_1F_0 ATP synthase. A) Experimental results of intensity as a function of the modulus of scattering vector q [$I(q)$] with their corresponding errors are shown (white dots); experimental data were fitted using the GNOM program (fit, solid line). B) Pair distance distribution $p(r)$ 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

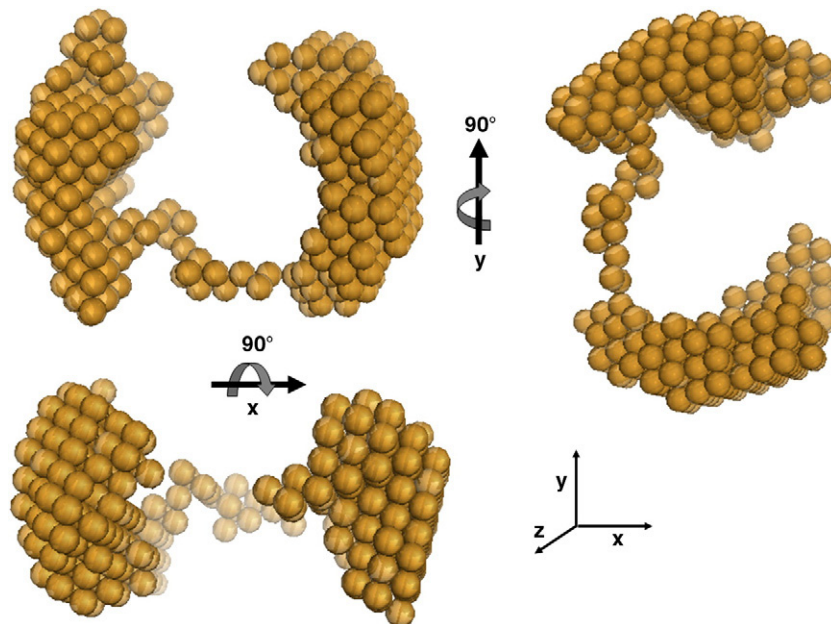


Fig. 5. Three-dimensional model of *Polytomella* ATP synthase inferred from SAXS data. The model strongly suggests that the algal ATP synthase is structured as a dimer in solution. *Ab initio* particle models were restored using the program DAMMIN. Several runs of *ab initio* shape determination led 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).

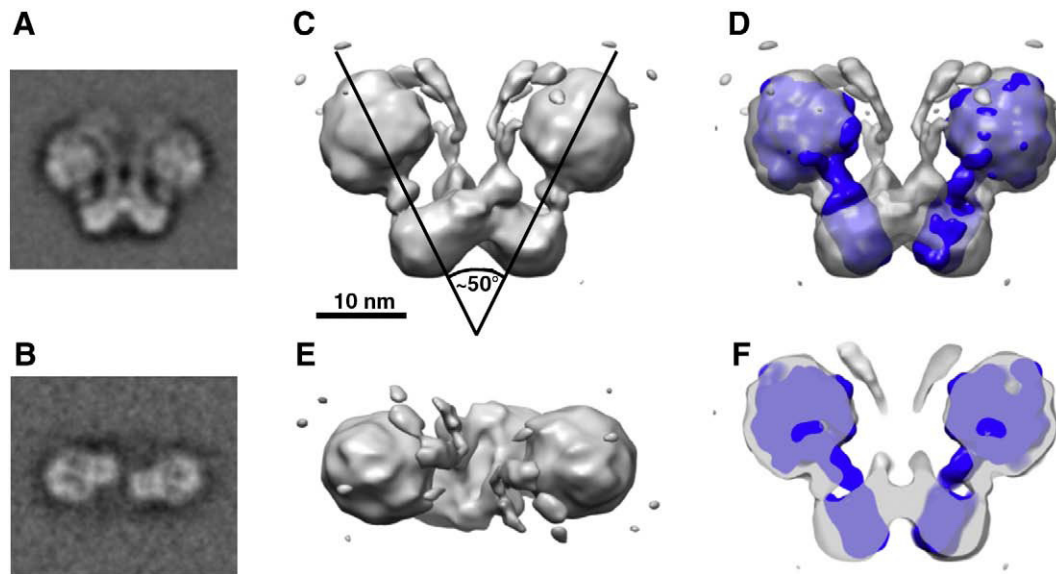


Fig. 6. Representative EM images and preliminary 3D structural of the *Polytomella* ATP synthase. A and B) Particle images of the algal ATP synthase obtained after averaging 100 to 150 single-molecule images (A, side view; B, top view). C and D) 3D structural model of the algal mitochondrial ATP synthase 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

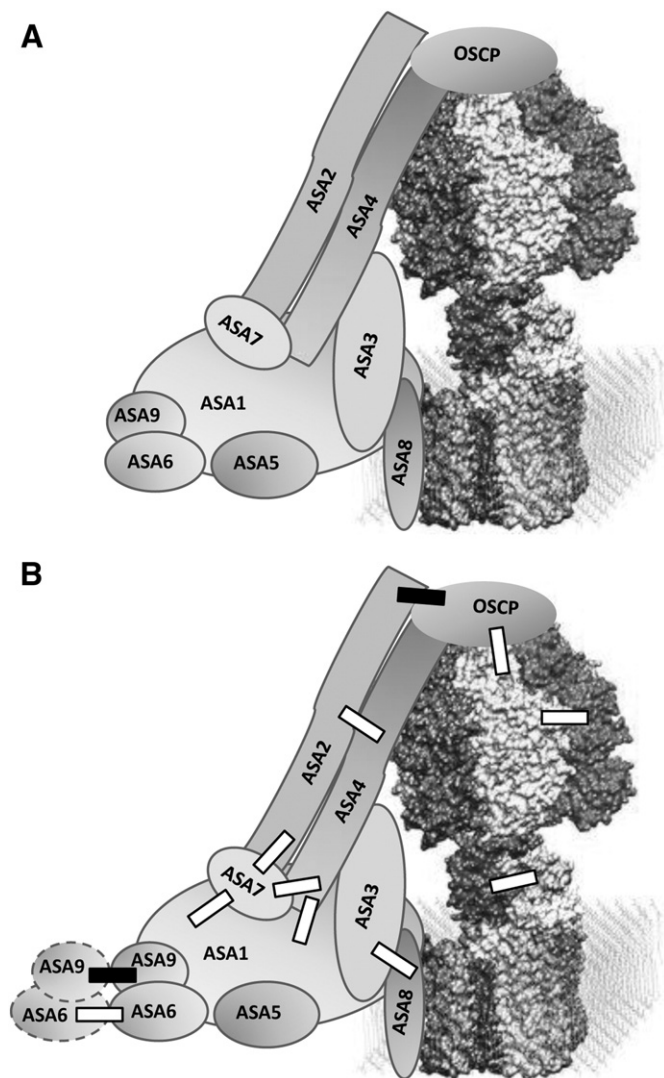


Fig. 7. Subunit arrangement of the dimeric algal mitochondrial ATP synthase. A) The model (only half the dimer is shown) is based on the overall structure of the complex found in the SAXS and EM studies and on the data obtained from the detergent dissociation assays and cross-linking experiments. For 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. Ludtke, 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, Diego, 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.

F₁F₀-ATP SINTASA Y SUS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES*

Araceli Cano-Estrada y Diego González-Halphen

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Correo E: ecano@email.ifc.unam.mx

RESUMEN

La estructura de la F₁F₀-ATPasa o F₁F₀-ATP sintasa es muy importante para entender su funcionamiento, por lo que ha sido de gran interés estudiar las subunidades que la componen, la interacción entre ellas y su función dentro de la enzima. La estructura de la F₁F₀-ATPasa varía de una especie a otra, encontrándose subunidades específicas de cada especie y siendo más compleja la estructura en los organismos más evolucionados; además estudios recientes han demostrado la presencia de subunidades novedosas dentro de la estructura de la ATP sintasa de algunas especies como las algas clorofíceas, el parásito *Trypanosoma brucei* y protistas como *Tetrahymena thermophila*. En este trabajo se pretende hacer una comparación de las subunidades que forman la F₁F₀-ATPasa de diferentes especies, haciendo hincapié en sus diferencias estructurales.

ABSTRACT

The structure of the F₁F₀-ATPase or ATP synthase plays an important role in understanding its function. It has been of interest to study the subunits, how they interact between them and what is their function in the enzyme. Many subunits have been conserved through out evolution, counterparts of them are found in the F₁F₀-ATPase of different organisms, yet the number of subunits forming the enzyme complex varies from one species to another. Also there seem to be specific subunits in several species, and in general, the structure is more complex in eukaryotic organisms. Recent studies have demonstrated the presence of novel subunits that form part of the ATP synthase in chlorophyte algae species, in parasites like *Trypanosoma brucei*, and in protists like *Tetrahymena thermophila*. This paper seeks to make a comparison of the subunits that form the F₁F₀-ATPase from different species, stressing their structural differences.

La F₁F₀-ATP sintasa es un complejo enzimático encargado de proveer a la célula la energía necesaria para realizar todos sus procesos vitales mediante la síntesis de ATP, aunque también puede llevar a cabo la hidrólisis de éste, por lo que al complejo también se le nombra F₁F₀-ATPasa. El nombre se debe a que las subunidades pueden separarse en dos dominios estructurales llamados F₁ y F₀ (1). El dominio F₁ está compuesto por subunidades solubles y es el dominio catalítico de la enzima, mientras que el F₀ es el dominio membranar. Ambos dominios están unidos por un tallo central y por un tallo periférico.

La síntesis de ATP está acoplada a un gradiente de potencial electroquímico de protones, que es generado por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria durante la oxidación de sustratos. Cuando los protones atraviesan la membrana por un conducto formado en el dominio F₀ (entre las subunidades *a* y *c*) provocan un giro de un anillo de proteolípidos formado por la subunidad *c* (Fig. 1). Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades *γ* y *ε*) en movimientos de 120°, provocando cambios conformacionales consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades *α* y *β*) e induciendo la unión de sustratos

PALABRAS

CLAVE:

F₁F₀-ATP sintasa, estructura, subunidades, homología.

KEY WORDS:

F₁F₀-ATP synthase, structure, subunits, homology.

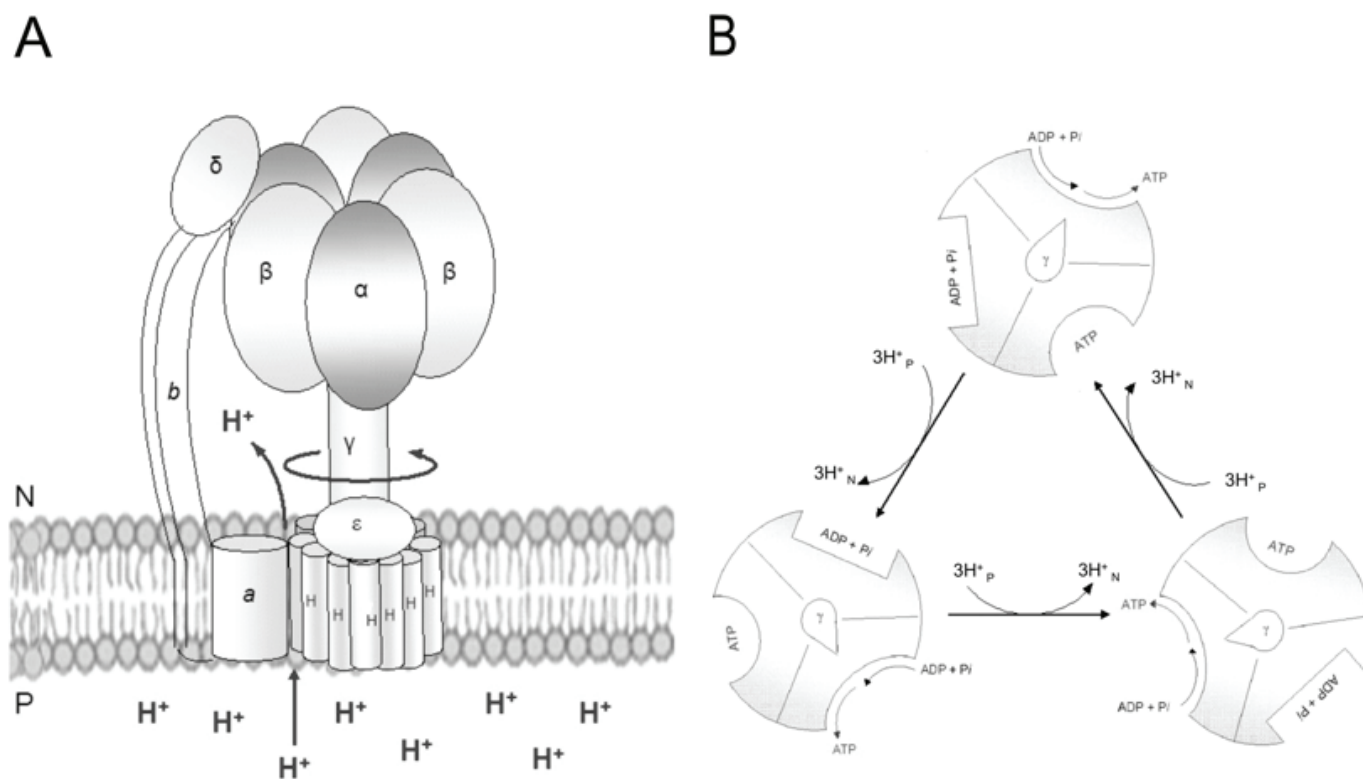


Figura 1. El mecanismo catalítico de la ATP sintasa. (A) Los protones atraviesan la membrana del lado P hacia el lado N a favor de su gradiente electroquímico, por un conducto formado entre las subunidades a y c, provocando un giro de 120° en la subunidad γ , que a su vez produce cambios conformacionales en las subunidades catalíticas. (B) Las tres subunidades catalíticas β adquieren conformaciones diferentes durante la síntesis de ATP: abierta, semiabierta y cerrada. Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP, y a su vez se captan las moléculas de ADP y fosfato (2). Con estos sustratos, la subunidad β cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la reacción de formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades β de la ATP sintasa.

(ADP + Pi), la síntesis de ATP y su liberación (2).

A la ATP sintasa se le representa como un motor molecular debido a su mecanismo catalítico, y por lo tanto consta de un rotor y de un estator. El rotor está compuesto por el tallo central de la enzima y el anillo de proteolípidos. Estas subunidades están involucradas en el movimiento de la enzima durante la catálisis, mientras que el estator lo forman las subunidades del tallo periférico, las cuales se mantienen estáticas durante la síntesis de ATP y a su vez mantienen fijas a las subunidades catalíticas (3).

Existe evidencia de que la ATP sintasa mitocondrial, dentro de su ambiente fisiológico, forma oligómeros. Se ha propuesto que este arreglo de la F₁F₀-ATPasa induce la curvatura de las crestas mitocondriales, favoreciendo así la formación del gradiente electroquímico de protones (4). La ATP sintasa es una enzima altamente conservada, sobre todo en aquellas subunidades involucradas

en la catálisis; sin embargo, existen subunidades específicas según la especie. En este trabajo se presentan las diferentes subunidades que forman parte de la F₁F₀-ATPasa de las especies más estudiadas, haciendo una comparación entre ellas, señalando aquellas que están altamente conservadas y aquellas que son específicas de cada especie.

LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias tienen la estructura más simple de la F₁F₀-ATP sintasa; cuentan con las subunidades mínimas indispensables para que la enzima lleve a cabo la síntesis de ATP. El complejo más estudiado es el de la bacteria *Escherichia coli*. La enzima está compuesta por 8 diferentes subunidades α , β , γ , δ , ϵ , a, b y c (ver Tabla 1). El sector membranal F₀ está compuesto por las subunidades a, b, c, mientras que el sector hidrofílico F₁ lo componen las

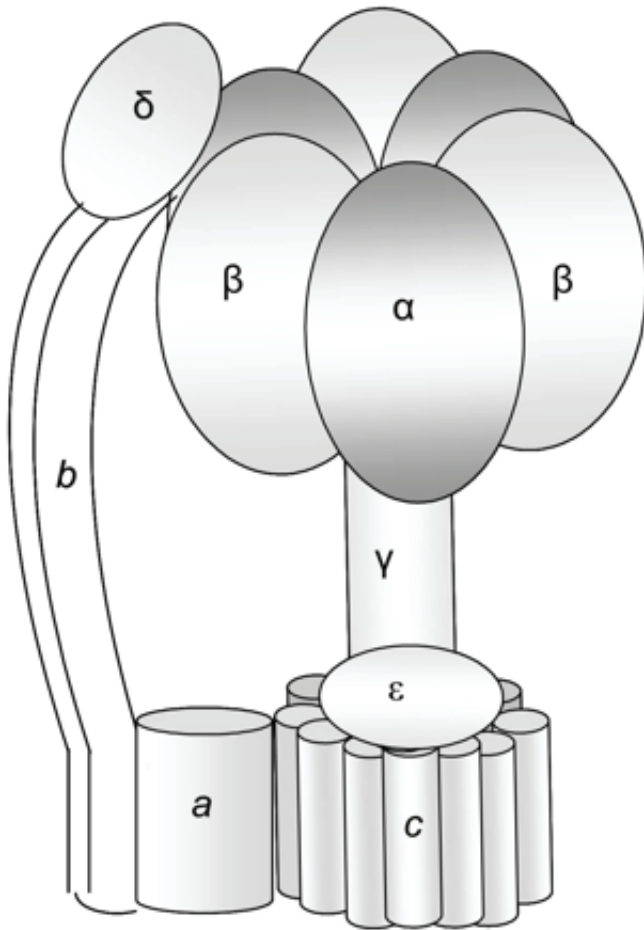


Figura 2. La estructura de la ATP sintasa bacteriana. La componen las subunidades catalíticas α y β , las cuales forman un hetero hexámero soluble en el dominio F_1 de la enzima. El tallo central, compuesto por las subunidades γ y ϵ , interactúa con el anillo de subunidades c ; formando el rotor de la enzima. El estator está compuesto por un dímero de subunidades b que se unen al dominio F_0 por la interacción con la subunidad a y al dominio F_1 por la interacción con la subunidad δ .

subunidades α , β , γ , δ , ϵ (Fig. 2). Las subunidades α , β son las subunidades catalíticas. La enzima posee tres subunidades a y tres subunidades β que interactúan alternadamente entre sí formando un hetero hexámero (Fig. 2).

La estructura cristalográfica del dominio F_1 , en ausencia de la subunidad δ , fue resuelta para la enzima de *E. coli* (5). Sus coordenadas atómicas fueron registrada en el PDB, por las siglas en inglés de Banco de Datos de Proteínas, con la clave de acceso: 1jnv. En esta conformación se observa que la subunidad γ penetra en la cavidad del hetero hexámero y tiene una estructura formada por hélices entrecruzadas. Se extiende 45 Å desde la base de las subunidades catalíticas hasta la superficie

de la membrana, donde entra en contacto con las subunidades ϵ y c por medio de un dominio globular (6). Al conjunto de subunidades γ , ϵ , c se le conoce como el rotor de la enzima. Se ha propuesto que la subunidad ϵ es la proteína reguladora de la síntesis o hidrólisis del ATP en el complejo bacteriano, actuando como una palanca que controla la dirección de la rotación en respuesta a la concentración de nucleótidos o a la presencia del gradiente electroquímico de protones (7). El extremo carboxilo terminal (C-terminal) de la subunidad ϵ tiene cambios conformacionales e interactúa simultáneamente con la subunidad β en el dominio F_1 y con la subunidad c en el dominio F_0 .

La subunidad c es una proteína hidrofóbica compuesta por dos estructuras de α hélices anti-paralelas conectadas por una asa hidrofílica (8). Este arreglo forma un anillo compuesto por un total de 10 subunidades c en la ATPasa de *E. coli*, según estudios de entrecruzamientos (9).

La subunidad α también se encuentra embebida en la membrana. No se conoce su estructura, pero su secuencia de aminoácidos predice 6 posibles cruces transmembranales. Se une al dominio F_1 por el brazo periférico o estator de la enzima formado por la subunidad δ y un dímero de subunidades b (b_2) (Fig. 2). El brazo periférico de la enzima fue observado por primera vez gracias a estudios de crio-microscopía electrónica de la enzima de *E. coli* (10). La subunidad b forma principalmente al brazo; su estructura es la de una única hélice alargada, de la cual el extremo amino terminal (N-terminal) se inserta en la membrana y el resto se define como un dominio citoplasmático que dimeriza formando una estructura de hélice enrollada y donde el extremo C-terminal interactúa con la subunidad δ , formando el complejo δb_2 (11). Sin embargo, los detalles moleculares de esta interacción todavía no se conocen. En la parte más alta del complejo se encuentra la subunidad δ , que presenta una estructura de seis α -hélices hidrofílicas. Interactúa por medio de su extremo N-terminal con los primeros 22 aminoácidos de la subunidad α (12), de acuerdo a estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) (PDB 1ABV).

LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE LA LEVADURA Y LOS MAMÍFEROS

A diferencia de la F_1F_0 -ATP sintasa de las bacterias, el complejo enzimático de los eucariontes presenta una estructura más elaborada; sin embargo, conserva homólogos de las subunidades bacterianas (Tabla 1). Los complejos enzimáticos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de corazón de bovino han sido de los más estudiados.

La F₁F₀-ATPasa mitocondrial conserva las subunidades α , β , γ , ϵ , c , a y cuenta con una subunidad δ , que no presenta similitud con la δ bacteriana, y que forma parte del tallo central de la enzima, interactuando con las subunidades γ y ϵ , aunque la función que desempeñan estas subunidades dentro del complejo no es del todo clara. La proteína OSCP (proteína que confiere sensibilidad al inhibidor oligomicina) sustituye a la subunidad δ en la parte más alta de la ATPasa mitocondrial. Presenta un plegamiento muy similar a su contraparte en bacterias, por lo que la interacción con la subunidad α se conserva.

La estructura del tallo periférico es la que más difiere respecto a la enzima bacteriana (Tablas 1 y 2). El tallo periférico de la ATP sintasa mitocondrial está compuesto por una sola copia de las subunidades OSCP, b , d y F₆ (Fig. 3), de acuerdo con experimentos de interacción *in vitro* con proteínas recombinantes de estas subunidades (13). La estructura del tallo periférico de la ATP sintasa de bovino fue resuelta a 2.8 Å (14) gracias a estudios de cristalografía (PDB 2CLY). En su conformación se observa que la subunidad b , conocida en *S. cerevisiae* como subunidad 4, es la principal formadora del tallo periférico y aunque su secuencia de aminoácidos no tiene una alta similitud con la secuencia de la subunidad b de las bacterias, las dos subunidades tienen una estructura muy parecida. Sin embargo, la región extrínseca de la proteína no dimeriza. Otra proteína que interactúa con la subunidad b formando parte del tallo periférico es la subunidad d (Fig. 3), con una estructura de cinco α -hélices que no presentan ninguna región altamente hidrofóbica, por lo que no entran en contacto con la región membranal (14, 15). La subunidad homóloga en levadura es 16 aminoácidos más grande. La subunidad d interactúa con la subunidad b a través de tres α -hélices entrecruzadas (14). F₆ es otra proteína que forma parte del brazo periférico (Fig. 3); su contraparte en *S. cerevisiae* es la subunidad h . Su conformación dentro del complejo es la de una proteína alargada donde una α -hélice localizada en su extremo N-terminal se encuentra próxima a una α -hélice en el extremo C-terminal de la subunidad OSCP, estabilizando la interacción entre la subunidad OSCP y la subunidad b , la cual es a través de α -hélices.

Detalles moleculares de la interacción del tallo periférico con el dominio F₁ se observan en la estructura cristalográfica resuelta a 3.2 Å (15) (PDB 2WSS), aunque sólo algunas regiones de las subunidades que comprenden el tallo periférico pudieron ser resueltas.

Además de estas dos subunidades, la F₁F₀-ATPasa de los eucariontes presenta las subunidades membranales e , f , g y A6L (Fig. 3). El homólogo de

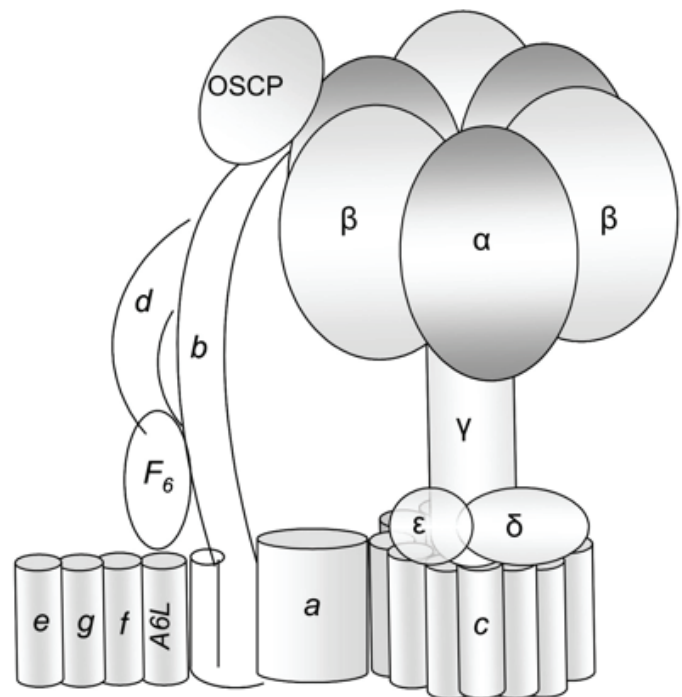


Figura 3. La estructura de la ATP sintasa de los mamíferos. Es más compleja que la ATP sintasa bacteriana. Sin embargo, conserva las subunidades catalíticas, así como las subunidades que forman el rotor de la enzima. La mayor diferencia se encuentra en las subunidades que componen el estator de la enzima. Éste está compuesto por una subunidad b , d , y F₆ y OSCP, ésta última es homóloga de la subunidad δ en bacteria. Además, cuenta con subunidades membranales, llamadas supernumerarias, que se encargan de la dimerización de la enzima. La ATP sintasa de los mamíferos es muy parecida a la ATP sintasa de la levadura, excepto que ésta última cuenta con dos subunidades supernumerarias adicionales, k e i .

A6L en la levadura es la subunidad 8. El complejo enzimático de las levaduras también posee las subunidades i (algunas veces llamada subunidad j) y k que también se anclan a la membrana (Fig. 3). Todas ellas son proteínas pequeñas, compuestas por 60 a 110 aminoácidos. La función de estas proteínas, denominadas supernumerarias, no es del todo clara; sin embargo, se ha demostrado que las subunidades A6L (o subunidad 8), f , e , i son necesarias para el ensamblaje del dominio F₀ y por lo tanto son indispensables para el funcionamiento de la enzima (16). Por otra parte, se ha probado que las subunidades e y g están involucradas en la dimerización de la enzima (17). El dominio GXXXG es importante para la dimerización y se localiza en la región membranal de la subunidad g (18). La subunidad k parece ser necesaria para la expresión de las subunidades g y e (19).

TABLA1. SUBUNIDADES CONSERVADAS EN LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE DIFERENTES ESPECIES													
<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>		Bovino		<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>C. reinhardtii</i>		<i>T. brusei</i>		<i>T. thermophila</i>	
Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI
α	AAA24735	α	P07251	α	P19483	α	NP_085571	α	EDP07337	α	AAZ12804	α	XP_001027692
β	AAA24737	β	P00830	β	P00829	β	At5g08670/80/90	β	EDP04740	β	AAZ10173	β	XP_001032631
γ	AAA24736	γ	P38077	γ	P05631	γ	At2g330400	γ	ED097956	γ	EAN77450	γ	XP_001010761
ε	AAA24738	ε	P21306	ε	P05632	ε	At1g51650	ε	EDP06388	ε	EAN77924	---	---
c	AAA24732	c	P61829	c	P32876/P07926/Q3ZC75	c	NP_085561	c	EDO97408/EDO97377	c	EAN77586	c	NP_149381
δ	AAA24734	OSCP	P09457	OSCP	P13621	OSCP	At5g13450	OSCP	EDP01322	OSCP	EAN78209	OSCP	XP_001025180
a	AAA24731	a	P00854	a	P00847	a	---	a	EDP09230	a	AAA97428	Ymf66	NP_149365
b	AAA24733	Su 4	P05626	b	P13619	Orf25	NP_085524	---	---	b	AAZ11286	putativas subunidades b	XP_001031468/ XP_001032687/ XP_001016306
---	---	δ	Q12165	δ	P05630	δ	At5g47030	δ	EDO99236	δ	AAZ12057	δ	---
---	---	d	P30902	d	P13620	d	At3g52300	---	---	---	---	putativa subunidad d	XP_001013499
---	---	h	Q12349	F6	P02721	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	Su 8	P00856	A6L	P03929	orfB	NP_085508	---	---	---	---	---	---
---	---	e	P81449	e	Q00361	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	f	Q06405	f	Q28851	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	g	Q12233	g	Q28852	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	Inh1	P01097	IF1	P01096	---	---	---	---	---	---	---	---

TABLA2. SUBUNIDADES NO CONSERVADAS DENTRO DE LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE DIFERENTES ESPECIES											
<i>S. cerevisiae</i>		Bovino		Plantas		Algas clorofíceas		<i>T. brusei</i>		<i>T. thermophila</i>	
Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI	Subunidad	No. Acceso NCBI
i/j	P81450	Factor B	P22027	F _A D	At2g21870	ASA1	EDP03873	Tb927.5.2930	AAZ11406	146185889	XP_001032687
k	P81451	MLQ	P14790	---	---	ASA2	EDP00850	Tb11.02.4120	EAN79587	229594811	XP_001032843
Stf1	P01098	AGP/DAPIT	Q3ZBI7	---	---	ASA3	EDO98373	Tb10.6k15.0480	EAN78377	146161614	XP_001007749
Stf2	P16965/Q06177	---	---	---	---	ASA4	EDP08830	Tb927.3.1690	AAZ10204	118399953	XP_001032300
---	---	---	---	---	---	ASA5	EDP00370	Tb11.47.0022	EAN79106	118366175	XP_001016306
---	---	---	---	---	---	ASA6	EDP06853	Tb927.7.840	AAZ12149	118370910	XP_001018655
---	---	---	---	---	---	ASA7	EDP00858	Tb11.03.0475	EAN79040	229594147	XP_001029413
---	---	---	---	---	---	ASA8	EDP01930	Tb927.2.3610	AAQ15818	146180703	XP_001021321
---	---	---	---	---	---	ASA9	EDP02597	Tb927.3.2880	AAZ10322	118398278	XP_001031468
---	---	---	---	---	---	---	---	Tb927.3.2180	AAZ10253	118398135	XP_001031397
---	---	---	---	---	---	---	---	Tb927.5.3090	AAZ11422	146184052	XP_001027673
---	---	---	---	---	---	---	---	Tb927.4.3450	AAZ10936	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	Tb927.8.3320	AAZ13097	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	Tb10.70.7760	EAN77482	---	---

Debido a su complejidad, la ATP sintasa mitocondrial cuenta con una subunidad adicional que se encarga de regular su actividad enzimática. En los mamíferos se le conoce como IF₁ y en la levadura como Inh1 (Tabla 1). El sitio responsable de la inhibición lo forman 6 aminoácidos, Phe17, Arg20, Glu21, Arg22, Glu25 y Phe28; esta región se une a la subunidad β formando el complejo F₁-IF₁ (PDB 1OHH) (20). En la levadura, la proteína inhibidora se estabiliza con otras dos proteínas llamadas Stf1 y Stf2, por las siglas en inglés de factores de estabilización (Tabla 2), las cuales incrementan la acción inhibitoria sobre la ATP sintasa (21).

Recientemente se ha descrito la presencia de tres proteínas asociadas a la ATP sintasa de los mamíferos, que no son componentes del dominio catalítico ni del estator de la enzima, y se les ha denominado factor B, MLQ y AGP o también llamada DAPIT, por las siglas en inglés de proteína asociada con la diabetes en los tejidos sensibles a la insulina (Tabla 2). El factor B es importante para mantener el gradiente de potencial electroquímico de la membrana mitocondrial, ya que la carencia de este factor resulta en un desacoplamiento (22). El papel que desempeñan las otras dos proteínas aún no es claro, aunque podrían estar involucradas en el metabolismo energético celular, o bien en la organización supramolecular de complejos de la fosforilación oxidativa, en especial de los oligómeros de la ATP sintasa mitocondrial.

LA ATP SINTASA DE LAS PLANTAS

En comparación con la estructura de la ATP sintasa de los mamíferos o la levadura, que han sido muy estudiadas, poco se sabe de la estructura de la ATP sintasa de las plantas. Se ha purificado el complejo enzimático de especies como papa, espinaca y *Arabidopsis thaliana*, identificando sus distintos componentes. El dominio F₁ de la enzima de las plantas se encuentra altamente conservado y está formado por las subunidades catalíticas α y β, así como las subunidades γ, δ y ε (Tabla 1). Las subunidades α, β y γ presentan una similitud alta con sus contrapartes en las bacterias y los mamíferos; por el contrario, las subunidades δ y ε tienen una similitud menor con sus contrapartes en bovino, aunque sus estructuras sean muy parecidas. Los genes que codifican para la subunidad a y c, las cuales forman parte de dominio F₀, se han encontrado en el genoma de varias especies de plantas, incluyendo a *A. thaliana* (23, 24). También están presentes los genes que codifican para ortólogos de la subunidad OSCP y la subunidad d, componentes del tallo periférico. A la subunidad OSCP también se le denomina subunidad δ' debido a su similitud

con la subunidad δ de las bacterias y los cloroplastos. Sin embargo, poco se conoce del resto de los componentes del dominio F₀ y del estator de las plantas, debido a la baja similitud que presentan las subunidades asociadas a estos dominios.

Otras subunidades que fueron identificadas como constituyentes de la F₁F₀-ATPasa de las plantas son las proteínas orfB, orf25 y FAd (24, 25) (Tabla 2). Aunque la similitud de la subunidad orfB con la subunidad A6L de los mamíferos o la subunidad 8 de la levadura es baja, se han propuesto que son homólogos. Por otra parte, estudios bioquímicos demostraron que orfB es parte del dominio F₀ de la F₁F₀-ATPasa de plantas e interactúan con la subunidad c y la subunidad orf25, lo cual apoya la hipótesis (24). La proteína orf25 es una proteína hidrofóbica y su gen se ha encontrado en los genomas de diferentes especies de plantas (26). Se ha propuesto que esta subunidad es la contraparte de la subunidad b de las bacterias, las levaduras y los mamíferos, debido a que ambas presentan la misma masa molecular y su extremo N-terminal es hidrofóbico. Sin embargo, a nivel de secuencia de aminoácidos la similitud entre estas subunidades es muy baja, aunque la subunidad b de los eucariontes y la subunidad b de las bacterias tampoco presentan una alta similitud. Parecería que más que una secuencia de aminoácidos conservada, lo esencial es la presencia de una estructura α-helicoidal alargada. La proteína F_Ad es de carácter hidrofílico y hasta el momento no se ha encontrado un homólogo de esta subunidad, por lo que representaría un nuevo componente del estator en la ATP sintasa de plantas.

LAS ATP SINTASAS CON SUBUNIDADES ATÍPICAS

La ATP sintasa de las algas clorofíceas

Las algas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp.* forman parte del linaje de las algas clorofíceas o algas verdes y son las más estudiadas. Estudios bioquímicos de la ATP sintasa de estas algas demostraron una composición de subunidades atípica. Se identificaron 17 polipéptidos que forman parte de la enzima (Fig. 4), de las cuales se encontraron homólogos de las subunidades α, β, γ, δ, OSCP, a y c (Tabla 1). Aunque las subunidades catalíticas presentan una alta similitud con el resto de las ATP sintasas, éstas presentan extensiones de aminoácidos. La extensión de la subunidad α consta de aproximadamente 20 aminoácidos y se localiza en el extremo N-terminal (27) mientras que la extensión de la subunidad β está compuesta por aproximadamente 60 aminoácidos y se localiza en el extremo C-terminal (28). No es clara la función

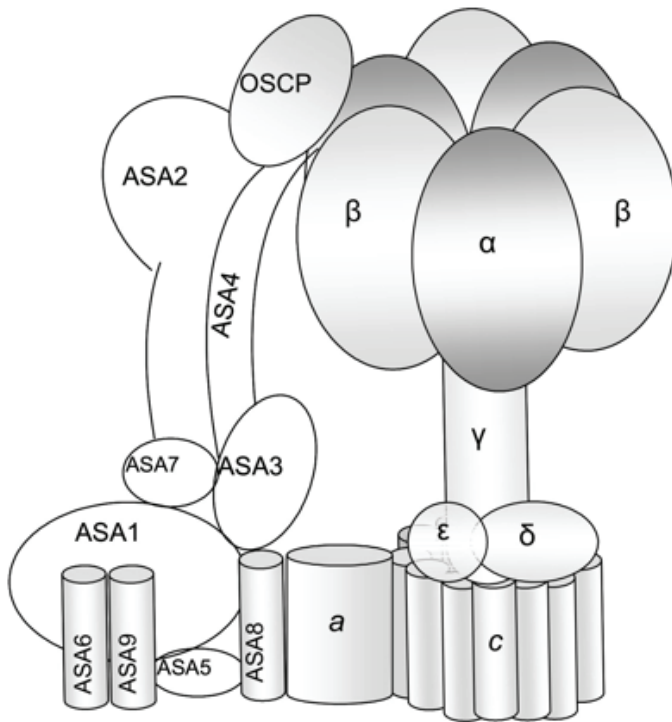


Figura 4. La estructura de la ATP sintasa de las algas clorofíceas. La ATP sintasa de algas clorofíceas está altamente conservada. Sin embargo, cuenta con nueve subunidades novedosas llamadas ASA, que no presentan homología con las proteínas que se muestran en las bases de datos. Estas subunidades sustituyen a las subunidades clásicas que forman el estator de la enzima. Se propone que ASA2, ASA4 y ASA7, junto con la subunidad OSCP, forman el brazo periférico, y que ASA6 está involucrada en la dimerización de la enzima, ASA5 y ASA8 se encuentran en la región membranal y ASA1 y ASA3 se encontrarían de manera periférica a la membrana.

de estas extensiones, aunque se ha propuesto que estos aminoácidos extra en la subunidad β podrían hacer el papel de la proteína reguladora dentro del complejo (29), ya que la proteína inhibidora clásica de la ATP sintasa de los eucariontes, la $IF_{1'}$, no se encuentra en este complejo. Tampoco se identificaron homólogos de las subunidades clásicas que forman el estator de la ATP sintasa de los eucariontes, ni de aquellas implicadas en la dimerización del complejo (30, 31). Por el contrario, se encontró que la ATP sintasa de estas algas presentan 9 subunidades asociadas que no tienen similitud con otras proteínas de las bases de datos (Tabla 2). A estas subunidades se les nombró ASA, por las siglas en inglés de Proteína Asociada a la ATP Sintasa: ASA1 a ASA9 (Fig. 4). Estas proteínas presentan una masa molecular aparente que va desde los 60 kDa para ASA1 hasta los 9 kDa para

ASA9 (32). Basados en la secuencia de *C. reinhardtii*, las cuales presentan una similitud promedio del 50% con las secuencias de *Polytomella sp.*, se realizó un análisis de hidrofobicidad utilizando el servidor TMHMM v.2.0. El programa predice cruces transmembranales para la subunidad ASA8 y ASA9; las subunidades ASA5 y ASA6 son proteínas hidrofóbicas, pero no predicen cruces transmembranales, mientras que el resto de las subunidades ASA parecen ser completamente hidrofílicas (32, 33). Para las subunidades ASA1 y ASA4 se predice la presencia de estructura de hélices entrecruzadas, importantes para la interacción proteína-proteína.

La ATP sintasa de estas algas, a diferencia de las enzimas del resto de los organismos eucariontes, se purifica preferentemente como un dímero muy estable con una masa molecular aproximada de 1600 kDa (32, 34). Este complejo se observó por estudios de microscopía electrónica (33, 35) en los cuales destaca la presencia de brazos periféricos muy robustos, que contrastan con los de la enzima bacteriana o la mitocondrial clásica, en donde dicha estructura es poco densa.

La monomerización de la enzima se ha llevado a cabo observando cambios en la composición polipeptídica, disminuyendo la proporción de las subunidades ASA6 y ASA9 (36), sugiriendo que estas subunidades son responsables de la dimerización (Fig. 4). Utilizando agentes entrecruzadores, posteriormente se demostró que la subunidad ASA6 sí está involucrada en la formación del dímero de la enzima (29). Sin embargo, ninguna de las dos subunidades presenta el motivo GXXXG, por lo que se asume que otro dominio es el encargado de la dimerización del complejo en el linaje de las algas clorofíceas.

Se han propuesto diferentes modelos del arreglo topológico de las subunidades que componen a la ATP sintasa de las algas clorofíceas (32, 33, 36). Estos modelos concuerdan en que la subunidad ASA6 es la responsable de la dimerización y que se encuentra en la región membranal junto con la subunidad ASA9, ASA8; sin embargo, la disposición de las subunidades que estarían formando el brazo periférico de la enzima no es todavía muy clara. No obstante, estudios con agentes entrecruzadores y estudios de disociación de la enzima muestran una cercanía de las subunidades OSCP, ASA2, ASA4 y ASA7 (32,33), por lo que se ha propuesto que estas subunidades forman el brazo periférico de la F_1F_0 -ATPasa de las algas clorofíceas (Fig. 4) en estequiometría de uno respecto a la subunidad γ (33).

Para conocer mejor la función que desempeñan las subunidades ASA dentro del complejo se realizó un estudio de silenciamiento del gen de la

subunidad ASA7 mediante RNA de interferencia (RNAi) en *C. reinhardtii*, encontrando que la enzima purificada es muy inestable y se disocia fácilmente liberando al sector F₁ (37); sin embargo, la pérdida de esta subunidad no tiene algún impacto en la bioenergética celular ni en la estructura de las crestas mitocondriales.

Es claro que la presencia de las subunidades ASA en la ATP sintasa de las algas clorofíceas le confieren una estructura más voluminosa y mucho más estable que la de las ATP sintasas del resto de los organismos eucariontes, aunque su posible función aún no es clara. Se ha planteado que su arreglo en dímero podría contribuir a mantener la estructura tubular de las crestas mitocondriales *in vivo* (38). Tampoco se conoce como es que las algas clorofíceas adquirieron estas subunidades atípicas a lo largo de la evolución ni en que momento lo hicieron.

La ATP sintasa de los Tripanosomátidos

Un reciente estudio sobre la ATP sintasa de *Trypanosoma brucei* reveló que la enzima contiene subunidades extra que no están presentes en la enzima de los mamíferos o de la levadura (39). Al realizar estudios bioquímicos para conocer la composición de la ATP sintasa de *T. brucei* se encontró que el complejo enzimático está compuesto por 22 subunidades, que presentan una masa molecular entre 8.6 y 55.7 kDa. Ocho de estas subunidades están conservadas, las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , c , b y OSCP (Tabla 1). Las otras 14 subunidades restantes no presentan similitud con las subunidades clásicas que componen el estator de la ATPasa mitocondrial de otras especies (39) (Tabla 2). Puesto que no se encontraron homólogos de estas proteínas en las bases de datos ni dominios estructurales conservados, estas proteínas parecen ser únicas del orden Kinetoplastida, pues sólo comparten similitud con proteínas que pertenecen a este linaje. Estas 14 nuevas proteínas fueron registradas como proteínas hipotéticas en GeneBD, por sus siglas en inglés de Base de Datos de Genes (Tabla 2).

La subunidad b está presente en la ATPasa de *T. brucei*, aunque solamente su extremo N-terminal tiene similitud con la subunidad b de los eucariontes. Por otra parte, no se pudo identificar en la enzima a un homólogo de la subunidad a ; esto puede deberse a dificultades en las técnicas para la identificación de proteínas hidrofóbicas asociadas a la membrana, pero se asume que esta subunidad está presente y que interactúa con la subunidad c .

Cuando se llevó a cabo el silenciamiento de genes, mediante RNAi, de la subunidad α y de dos nuevas proteínas, Tb10.70.7760, Tb927.5.2930, se

produjo la disociación del complejo, liberándose el dominio F₁, por lo que se concluye que estas proteínas son esenciales para la organización estructural del complejo (39).

Se ha logrado purificar el dominio F₁, el monómero y el dímero de la F₁-F₀-ATPasa de *T. brucei* con una masa molecular aparente de 450 kDa, 700 kDa y 1000 kDa respectivamente. En el monómero de la enzima se identificaron 16 subunidades, mientras que en la forma dimérica se identificaron dos proteínas adicionales (Tb927.2.3610 y Tb927.5.3090), las cuales podrían ser las responsables de la dimerización (40).

Sin duda, estas nuevas proteínas remplazan la función de las subunidades que forman el estator de la enzima en el resto de las ATP sintasas mitocondriales, con excepción de la subunidad b , que es la única que se encuentra conservada en esta especie. Sin embargo, es necesario estudiar más acerca de la topología de esta ATP sintasa para tener clara la función de cada una de estas nuevas proteínas y conocer su arreglo para la formación de una estructura diferente.

La ATP sintasa de los ciliados

Recientemente se ha identificado una nueva estructura de la ATP sintasa en *Tetrahymena thermophila* (40). Este organismo ciliado pertenece al grupo protista que junto con los dinoflagelados y los apicomplejos forman el gran grupo de los alveolados. La purificación de la ATP sintasa de *T. thermophila* en geles azules nativos muestra una forma dimérica, tal como se comporta la ATP sintasa de las algas clorofíceas (32, 33, 34, 35). El complejo puro reveló la presencia de 22 subunidades (40). Se identificaron las subunidades α , β , γ y OSCP, todas ellas formando parte del dominio F₁ de la enzima (Tabla 1). Del dominio membranaral F₀ sólo fue identificada la subunidad c . Sorprendentemente, no se encontraron homólogos de las subunidades a que hasta el momento se encuentra muy conservada en todas las estructuras de la ATP sintasa, tampoco se identificó algún homólogo de la subunidad b , que es la subunidad principal del tallo periférico de la enzima (40). Para el resto de las subunidades asociadas a la ATP sintasa de *T. thermophila* no se encontró algún homólogo en las bases de datos, por lo que éstas se registraron como proteínas hipotéticas en NCBI, por sus siglas en inglés de Centro Nacional de Información Biotecnológica (Tabla 2). Estudios detallados de comparación de secuencias lograron identificar con una baja similitud al homólogo de la subunidad δ (proteína hipotética 118355322) y de la subunidad d (proteína hipotética 118360532). También se

encontró que una nueva proteína nombrada Ymf66 podría sustituir a la muy conservada subunidad *a*, debido a que tienen características muy similares y también es codificada en el genoma mitocondrial (40). Esta proteína es integral de membrana y su estructura primaria predice 8 cruces transmembranales, donde el cuarto cruce conserva un residuo de arginina, esencial para la formación del canal para el paso de protones. Esta proteína Ymf66 sólo está conservada en organismos ciliados; en ningún otro organismo se encuentra un ortólogo de esta proteína, lo cual indicaría una divergencia de la subunidad *a* en este tipo de organismos. Por otra parte, también se identificaron de entre las 15 subunidades hipotéticas, a tres proteínas que podrían cumplir con la función de la subunidad *b* (146185889, 118398278 y 118366175). Esto se llevó a cabo con base en la predicción de la estructura secundaria (40).

Estudios de microscopía electrónica se llevaron a cabo (40) en donde se destacan dominios exclusivos de *T. thermophila*, sobre todo en la región membranal, donde se observa una gran densidad electrónica. Entre cada monómero también se aprecia densidad electrónica adicional que parece unirse al sector F_1 . Este dominio podría estar involucrado en la dimerización de la enzima. Otra característica interesante que se observó en la ATP sintasa de *T. thermophila* es el arreglo en paralelo de sus monómeros, que contrasta con el arreglo angular que forman los monómeros de la ATP sintasa dimerica de otros organismos (40). Se propone que este arreglo en paralelo está asociado a la morfología en forma tubular de las crestas mitocondriales observadas en mitocondrias de los organismos ciliados y en general de los organismos alveolados.

Sin duda la ATPasa de *T. thermophila* presenta una estructura atípica, donde se involucran subunidades novedosas que hasta el momento no se tiene clara su función, aunque alguna de ellas puede sustituir la función de las subunidades clásicas involucradas en el estator de la enzima y ser exclusivas de esta especie.

CONCLUSIONES

La estructura general de la F_1F_0 ATP sintasa se ha conservado a lo largo de la evolución debido

al mecanismo catalítico que se lleva a cabo para sintetizar el ATP que la célula necesita para realizar sus procesos vitales. Tanto el dominio globular F_1 y el dominio membranal F_0 presentan ortólogos de las subunidades mínimas involucradas en la catálisis de la enzima en todas las especies (Tabla 1). La subunidades catalíticas α y β son las más conservadas. Todos los organismos cuentan con tres subunidades α y tres subunidades β que se arreglan alternadamente para formar un hetero hexámero. Otras de la subunidades que están presentes en todos los organismos son aquellas que forman el rotor de la enzima, subunidades γ , ϵ , c y δ , aunque esta última sólo está presente en la F_1F_0 -ATPasa mitocondrial. El brazo periférico de la enzima es la estructura del complejo que más difiere de una especie a otra, donde sólo se conservan las subunidades OSCP o δ , en el caso de las bacterias, y *a*. La mayoría de los organismos eucariontes, desde las levaduras hasta las plantas y los mamíferos, cuentan con las mismas subunidades, aunque poco conservadas a nivel de secuencia pero más conservadas a nivel de estructura, lo cual indica que estas subunidades comparten la misma función dentro del estator del complejo. Pocas son las subunidades específicas de cada una de estas especies (Tabla 2), adquiridas generalmente para estabilizar al complejo y optimizar el metabolismo energético celular. Estudios recientes han descubierto nuevas subunidades asociadas a la ATP sintasa en los linajes de las algas clorofíceas, en los tripanosomátidos y en los ciliados que producen una estructura atípica de la enzima (Tabla 2). Todas estas nuevas subunidades están involucradas en la formación del estator de la enzima, aunque todavía no es clara la función que tiene cada una de ellas dentro del complejo enzimático. Podemos sugerir que fueron adquiridas para satisfacer las necesidades energéticas específicas de estas especies y son esenciales para el buen ensamble del complejo, estabilizando una forma dimerica necesaria para mantener la morfología de las crestas mitocondriales.

No cabe duda que las últimas décadas dedicadas al estudio de esta interesante enzima han aportado información muy valiosa para el conocimiento de su estructura y su funcionamiento, pero aún falta mucho por estudiar y comprender sobre este motor molecular.



REFERENCIAS

1. Alfonzo M, Kandrach MA, Racker E (1981) Isolation, characterization, and reconstitution of a solubilized fraction containing the hydrophobic sector of the mitochondrial proton pump. *J Bioenerg Biomembr* 13:375-391.
2. Itoh H, Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase. *Nature* 427:465-468.
3. Weber J, Senior AE (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase. *FEBS Lett* 545:61-70.
4. Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27:1154-1160.
5. Hausrath AC, Grüber G, Matthews BW, Capaldi RA (1999) Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia coli* F(1) ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13697-13702.
6. Rodgers AJW, Wilce MCJ (2000) Structure of the γ - ϵ complex of ATP synthase. *Nat Struct Biol* 7:1051-1054.
7. Tsunoda SP, Rodgers AJW, Aggeler R, Wilce MJC, Yoshida M, Capaldi RA (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F₁F₀ ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6560-6564.
8. Fillingame RH, Jiang W, Dmitriev OY (2000) The oligomeric subunit C rotor in the F_o sector of ATP synthase: unresolved questions in our understanding of function. *J Bioenerg Biomembr* 32:433-439.
9. Jiang W, Hermolin J, Fillingame RH (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4966-4971.
10. Wilkens S, Capaldi RA (1998) ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* 393:29.
11. Dmitriev O, Jones PC, Jiang W, Fillingame RH (1999) Structure of the membrane domain of subunit b of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 274:15598-15604.
12. Wilkens S, Borchardt D, Weber J, Senior AE (2005) Structural Characterization of the interaction of the δ and α subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 44:11786-11794.
13. Collinson IR, van Raaij MJ, Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM, Orriss GL, Miroux B, Walker JE (1994) ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence. *J Mol Biol* 242:408-421.
14. Dickson VK, Silvester JA, Fearnley IM, Leslie AGW, Walker JE (2006) On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J* 25:2911-2918.
15. Rees DM, Leslie AG, Walker JE (2009) The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21597-21601.
16. Vaillier J, Arselin G, Graves PV, Camougrand N, Velours J (1999) Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene ATP18. *J Biol Chem* 274:543-8.
17. Paumard P, Vaillier J, Couly B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21:221-230.
18. Sabbar S, Stuart RA (2005) The yeast F₁F₀-ATP Synthase. Analysis of the molecular organization of subunit g and the importance of a conserved GXXXG motif. *J Biol Chem* 280:24435-24442.
19. Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H (1998) Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17:7170-7178.
20. Cabezón E, Montgomery MG, Leslie AGW and Walker JE (2003) The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* 10:744-750.
21. Ichikawa N, Yoshida Y, Hashimoto T, Ogasawara N, Yoshikawa H, Imamoto F and Tagawa K (1990) Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast. *J Biol Chem* 265:6274-6278.
22. Belogradov GI, Hatefi Y (2002) Factor B and the mitochondrial ATP synthase complex. *J Biol Chem* 277:6097-6103.
23. Brugière S, Kowalski S, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Miras S, Salvi D, Ravel S, d'Hérin P, Garin J, Bourguignon J, Joyard J, Rolland N (2004) The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions. *Phytochemistry* 65:1693-1707.

24. Heazlewood JL, Whelan J, Millar AH (2003) The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are F₀ components in the plant F₁F₀ ATP synthase. *FEBS Lett* 540:201-205.
25. Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y, Burger G (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res* 26:865-878.
26. Tang HV, Pring DR, Muza FR and Yan B (1996) Sorghum mitochondrial orf25 and a related chimeric configuration of a male-sterile cytoplasm. *Curr Gen* 29:265-274.
27. Nurani G, and Franzén LG (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* 6:1105-1116.
28. Franzén LG, 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.
29. Villavicencio-Queijeiro A, Vázquez-Acevedo M, Cano-Estrada A, Zarco-Zavala M, Tuena de Gómez M, Mignaco JA, Freire MM, Scofano Helena M, Foguel D, Cardol P, Remacle C, González-Halphen D (2009) The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *polytomella sp.* is dimeric. *J Bioenerg Biomembr* 41:1-13.
30. Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, 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.
31. Cardol P, Gonzalez-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C (2005) The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol* 137:447-459.
32. Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, González-Halphen D (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomem* 38:271-282.
33. Cano Estrada A, Vazquez-Acevedo M, Villavicencio-Queijeiro A, Figueroa-Martinez F, Miranda-Astudillo H, Cordeiro Y, Mignaca JA, Foguel D, Cardol P, Lapaille M, Remacle C, Wilkens S, and Gonzalez-Halphen D (2010) Subunits-Subunits interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella sp.* *Biochim Biophys Acta* 1797:1439-1448.
34. Van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D (2003) Identification of 21 novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*: A proteomic approach. *Plant Physiol* 132:318-330.
35. Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (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.
36. Van Lis R, Mendoza-Hernández G, Groth G, 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.
37. Lapaille M, Escobar-Ramirez A, Degand H, Baurain D, Rodriguez-Salinas E, Coosemans N, Boutry M, González-Halphen D, Remacle C, Cardol P (2010) Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F₁F₀ ATP synthase and role of ASA7 protein in stability and aligomycin resistance of the enzyme. *Mol Biol Evol* 27:1630-1644.
38. Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* 580:3427-3432.
39. Zíková A, Schnaufer A, Dalley RA, Panigrahi AK, Stuart KD (2009) The F₀F₁-ATP Synthase complex contains novel subunits and is essential for Procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens* 5:1-15.
40. Balabaskaran NP, Dudkina NV, Kane LA, van Eyk JE, Boekema EJ, Mather MW, Vaidya AB (2010) Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*. *Plos Biol* 7:e1000418.