



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LAS SUBUNIDADES ASA DEL BRAZO
PERIFÉRICO DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL DE *POLYTOMELLA*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

HÉCTOR VICENTE MIRANDA ASTUDILLO

TUTOR

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
(INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
(INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR)

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ
(FACULTAD DE MEDICINA)

MÉXICO, D. F, JUNIO 2014



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 está 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.

HONORABLE JURADO

PRESIDENTE: DR. ADOLFO GARCÍA SAÍNZ
SECRETARIO: DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
VOCAL: DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
VOCAL: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
VOCAL: DR. ABEL MORENO CÁRCAMO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 324 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del donativo No. 128110 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del donativo IN203114.

Agradezco la ayuda técnica de la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo en la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Fisiología Celular por la oportunidad de realizar estos estudios de grado.

A los miembros del Honorable Jurado por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Pierre Cardol y la Dra. Marie France Giraud por ayudarme en la realización de parte de este proyecto en sus laboratorios.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron en este trabajo.

Quiero agradecer especialmente:

A mis padres, por su amor, apoyo y ser mi más grande ejemplo.

A mi hermano Luis Daniel, por siempre estar a mi lado y apoyarme.

A Mónica, por tu amor y alegría. Por ayudarme a ser una mejor persona y todo lo que hemos crecido juntos.

A Lili, por tu alegría, amistad, paciencia y por apoyarme siempre en este largo proceso.

A mis tíos Edilberto, Andrés y Carmen, por su cariño y apoyo siempre.

Al Dr. Diego González por abrirme las puertas de la investigación, creer en mí, encaminarme, apoyarme y exigirme para que todo salga adelante. Por su amistad y sus consejos.

A mis compañeros y por siempre amigos: Paola, por ser la gran persona con la que siempre puedo contar. Ale, porque desinteresadamente siempre está dispuesta a ayudar. Edgar por su optimismo y apoyo. Lalo porque a pesar de lo difícil que pueda ser la vida nunca pierde el ánimo y la alegría.

A mis compañeros de laboratorio: Araceli, Valentín, Alain, Sergio, Paco, Alexa, Miriam, Elizabeth, Diana, Luis Pablo (que cuenta como de nuestro labo) y Lorenzo, por alegrar cada día de estos años en que el laboratorio se convirtió en mi casa adoptiva. Al señor Alfredo por siempre estar dispuesto a ayudar.

A todos los maestros que a lo largo de mi vida me han formado.

Ciudad Universitaria, México

Junio 2014

Héctor Vicente Miranda Astudillo

DEDICATORIAS

A mis padres, Pedro y Adela, con cariño y admiración.

A mi hermano Luis Daniel, con mucho cariño.

A Mónica, con amor y alegría por todo el camino recorrido juntos.

¿Pensaron alguna vez que si no fuera por todos, nadie sería nada?

Mafalda

"Ella está en el horizonte -dice Fernando Birri-. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré. ¿Para qué sirve la utopía? Para eso sirve: para caminar."

Eduardo Galeano

Índice general

Resumen	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
Índice de Figuras	<i>iii</i>
Índice de Tablas	<i>vi</i>
Abreviaturas	<i>vii</i>
1. Introducción	1
1.1. Fuerza protón motriz	1
1.2. ATPasas rotatorias	2
1.3. Evolución de las ATPasas rotatorias	2
1.4. Estructura de las ATPasas rotatorias	4
1.5. Complejo F_1/F_o ATP sintasa y fosforilación oxidativa	5
1.6. Dímero de complejo V mitocondrial	8
1.7. Brazo periférico	9
1.8. Algas clorofíceas	12
1.9. F_1F_o ATP sintasa de algas clorofíceas	14
2. Objetivo general	18
3. Objetivos particulares	19
4. Justificación	20
5. Estrategia experimental general	21
6. Metodologías	22
6.1. Amplificación de los cDNA de las subunidades ASA y clonación en vectores de expresión	22
6.2. Expresión de las proteínas ASA recombinantes en la bacteria <i>Escherichia coli</i> .	22
6.3. Lavado de cuerpos de inclusión	23
6.4. Purificación de las subunidades recombinantes	24
6.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP	24
6.6. Estudio de interacción entre subunidades por métodos bioquímicos	25
6.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH	25
6.6.2. Immunorréplica tipo Far-Western	25
6.6.3. Generación de subcomplejos en geles azules nativos	26
6.6.4. Purificación del complejo Asa2/Asa4/Asa7 estable	27
6.6.4.1. Cromatografía de exclusión molecular	28
6.6.4.2. Cromatografía de afinidad	28
6.6.4.3. Estequiometría del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7	29
6.6.4.4. Modelaje <i>in silico</i> de las subunidades Asa2, Asa4, Asa7 y posible estructura en el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella sp</i>	29
7. Resultados	31
7.1. Amplificación de los cDNA de las subunidades ASA y clonación en vectores de expresión	31
7.2. Expresión de las proteínas ASA recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	31
7.3. Lavado de cuerpos de inclusión	33
7.4. Purificación de las subunidades recombinantes	34
7.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP	36

7.6. Estudio de interacción entre subunidades por métodos bioquímicos	36
7.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH	36
7.6.2. Immunorréplica tipo Far-Western	41
7.6.3. Generación de subcomplejos en geles azules nativos	45
7.6.4. Purificación del complejo Asa2/Asa4/Asa7 estable	50
7.6.4.1.Cromatografía de exclusión molecular	50
7.6.4.2.Cromatografía de afinidad	50
7.6.4.3.Estequiometría del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7	50
7.6.4.4.Modelaje <i>in silico</i> de las subunidades Asa2, Asa4, Asa7 y posible estructura en el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp	52
8. Discusión	53
9. Resumen de resultados	63
10. Conclusiones	64
11. Perspectivas	65
12. Bibliografía	66
13. Anexos	75
13.1. Protocolos	76
13.2. Soluciones	121
13.3. Oligomerización de la ATP sintasa y caracterización de los supracomplejos mitocondriales de <i>Polytomella</i> sp	138
13.4. Exploración de las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial	159
13.5. Artículos publicados	162
Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of <i>Polytomella</i> sp.	
Estructura y función de la ATP sintasa de las arqueas aeróbicas	
Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga <i>Polytomella</i> sp.	
Overexpression of a monomeric form of the bovine Odorant-Binding Protein protects <i>Escherichia coli</i> from chemical-induced oxidative stress	

Resumen

La F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de las algas cloroficeas es un complejo parcialmente embebido en la membrana interna mitocondrial que se purifica como un dímero estable de 1600 kDa. Se encuentra formado por 17 polipéptidos, nueve de los cuales (subunidades Asa1 – Asa9) no se encuentran presentes en las ATP sintasas mitocondriales clásicas y parecen ser exclusivos de este grupo de algas. En particular, las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 parecen formar parte de una sección del brazo periférico de la enzima. En el presente trabajo se sobreexpresaron y purificaron las subunidades Asa2, Asa4, Asa7 y los correspondientes fragmentos amino terminal y carboxilo terminal de las subunidades Asa4 y Asa7, con el fin de realizar estudios de interacción *in vitro*, empleando técnicas inmunoquímicas, electroforesis azul nativa y cromatografía de afinidad. Se determinó que las subunidades Asa4 y Asa7 interactúan fuertemente principalmente a través de sus regiones carboxilo terminal. Además, la subunidad Asa2 interacciona con Asa4 y Asa7 así como con la subunidad α en el sector F₁. Las 3 subunidades Asa forman un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 con una estequiometría 1:1:1. La subunidad Asa7 y el extremo carboxilo terminal de Asa4 parecen ser necesarios para la interacción con Asa2. Basados en los resultados se generaron modelos estructurales *in silico* de las tres subunidades. Se propone un modelo de la vecindad topológica de las tres subunidades (subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7) así como de su posición en el brazo periférico de la ATP sintasa del alga. Adicionalmente, se reporta la presencia de una nueva subunidad asociada al complejo denominada Asa10, así como un estudio preliminar de la oligomerización de la ATP sintasa y caracterización de los supracomplejos mitocondriales de *Polytomella* sp.

Abstract

The mitochondrial F₁F_o-ATP synthase of chlorophycean algae is a complex partially embedded in the inner mitochondrial membrane that is purified as a stable dimer with a molecular mass around 1600 kDa. It is composed of 17 polypeptides, nine of which (subunits Asa1 – Asa9) are not found in classic mitochondrial ATP synthases and appear to be exclusive of the chlorophycean algae lineage. In particular, subunits Asa2, Asa4 and Asa7 seem to be part of a section of the peripheral arm of the enzyme. In this work subunits Asa2, Asa4, Asa7 and the corresponding C-terminal and N-terminal fragments of Asa4 and Asa7 were purified in order to perform *in vitro* interaction studies by means of immunochemical techniques, blue native electrophoresis, and affinity chromatography. Subunits Asa4 and Asa7 interact strongly through their C-terminal regions. Subunit Asa2 interacts with both Asa4 and Asa7 as well as with subunit α in the F₁ sector. The three Asa subunits form a Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex with a 1:1:1 stoichiometry. Subunit Asa7 and the C-terminal region of Asa4 seem to be necessary for the interaction with Asa2. Based on the results, structural models were generated *in silico* for the three subunits. We propose a model for the interaction of the three subunits (Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex) as well as their position in the peripheral arm of the enzyme. Additionally, we report the presence of a new subunit associated to the complex which we named Asa10. We also present a preliminary study of the ATP synthase oligomerization and the characterization of mitochondrial supracomplexes of *Polytomella* sp.

Índice de Figuras

Figura 1.	Distribución y función de las ATPasas rotatorias.	2
Figura 2.	Evolución de las ATPasas rotatorias.	3
Figura 3.	Modelo tridimensional de los elementos rotor/estotor y sobreposición de las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas.	4
Figura 4.	Estructura de las ATPasas rotatorias. Distribución de las subunidades en las -F, -A y -V ATPasas.	6
Figura 5.	Fosforilación oxidativa.	7
Figura 6.	Estructura dimérica de la ATP sintasa mitocondrial y su relación con las crestas mitocondriales.	10
Figura 7.	Estructura de los brazos periféricos de las ATPasas rotatorias.	11
Figura 8.	Fotografías de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> y <i>Polytomella</i> sp.	13
Figura 9.	BN-PAGE de los complejos mitocondriales de distintas especies.	15
Figura 10.	Composición polipeptídica de la F1F0-ATPasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	16
Figura 11.	Modelo topológico de las subunidades Asa dentro del monómero de ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	17
Figura 12.	Secuencia experimental de los estudios de interacción de las subunidades Asa a partir de la genoteca de <i>Polytomella</i> sp.	21
Figura 13.	Esquema de la Inumorréplica tipo Far-Western.	26
Figura 14.	Esquema de la generación de subcomplejos en geles azules nativos.	27
Figura 15.	Comparación de las subunidades Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8 recombinantes en dos sistemas de expresión en <i>E. coli</i> .	32
Figura 16.	Sobreexpresión en <i>E. coli</i> de algunas subunidades del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp así como fragmentos de las subunidades Asa4, Asa7, OSCP y beta utilizando tres sistemas de expresión.	33
Figura 17.	Distribución de la subunidad Asa4 recombinante en la fracción soluble e insoluble utilizando distintas fuerzas iónica durante la lisis celular.	34
Figura 18.	Lavado de los cuerpos de inclusión de la subunidad Asa4 con concentraciones crecientes de Triton X-100.	34
Figura 19.	Lavado de cuerpos de inclusión de la subunidad Asa7 con Triton X-100 y agua.	35
Figura 20.	Purificación de las subunidades y fragmentos recombinantes del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	35
Figura 21.	Inmunorréplicas tipo Western reveladas con los anticuerpos obtenidos para las subunidades Asa1, Asa2, ASA4, OSCP, Asa7 y Asa8 de <i>Polytomella</i> sp.	36
Figura 22.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP, Asa7, Asa8.	37
Figura 23.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa1 con las subunidades Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8.	38
Figura 24.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa2 con las subunidades Asa1, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8.	38

Figura 25.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa4 con las subunidades Asa1, Asa2, OSCP, Asa7 y Asa8.	39
Figura 26.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad OSCP con las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7 y Asa8.	39
Figura 27.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa7 con las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP y Asa8.	40
Figura 28.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa8 con las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP y Asa7.	40
Figura 29.	Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa1 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	41
Figura 30.	Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa2 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	42
Figura 31.	Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa4 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	42
Figura 32.	Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad OSCP contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	43
Figura 33.	Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa7 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	43
Figura 34.	Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa8 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	44
Figura 35.	Influencia de la etiqueta de histidinas en la inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa4 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	45
Figura 36.	Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de las subunidades Asa4 y Asa7.	46
Figura 37.	Inmunorréplica tipo Far-Western de los fragmentos Asa4-N y Asa4-C contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de <i>Polytomella</i> sp.	46
Figura 38.	Efecto de la temperatura, SDS, DTT en la migración de la subunidad Asa4 en electroforesis azul nativa.	47
Figura 39.	Generación de subcomplejos en geles azules nativos de la subunidad Asa4, Asa7 y fragmentos amino y carboxilo de la subunidad Asa4.	48
Figura 40.	Generación de subcomplejos en geles azules nativos de la subunidad Asa4, Asa7 y fragmentos amino y carboxilo de la subunidad Asa7.	49
Figura 41.	Purificación de un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 mediante cromatografía de exclusión molecular.	51
Figura 42.	Reconstitución de un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 estable mediante cromatografía de afinidad.	51
Figura 43.	Modelo del subcomplejo Asa2/Asa4/asa7. A) Modelo generado <i>in silico</i> del subcomplejo Asa2/Asa4/asa7.	52
Figura 44.	Modelo propuesto de la distribución de las subunidades Asa en el complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	62
Figura 45.	BN-PAGE de mitocondrias de <i>Polytomella</i> sp solubilizadas con n-dodecil-β-D-maltósido y digitonina, tinción de actividad para los complejos I, IV y V.	143
Figura 46.	Separación de los complejos mitocondriales solubilizados con n-dodecil-β-D-maltósido y digitonina mediante electroforesis azul nativa y segunda dimensión desnaturalizante.	145

Figura 47.	Separación de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp mediante cromatografía de exclusión molecular.	146
Figura 48.	Separación de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp mediante gradiente de densidad.	147
Figura 49.	Efecto de concentración de proteína sobre la oligomerización del complejo V de <i>Polytomella</i> sp.	148
Figura 50.	Efecto del n-dodecil-β-D-maltósido sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	148
Figura 51.	Efecto del CHAPS sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	149
Figura 52.	Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	149
Figura 53.	Efecto de la fosfatidilcolina sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	150
Figura 54.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión colectadas de oligómeros de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	151
Figura 55.	Reconstitución de supracomplejos respiratorios en cromatografía de intercambio iónico visualizados mediante BN-PAGE.	153
Figura 56.	Separación de supracomplejos respiratorios en cromatografía de exclusión molecular visualizados mediante BN-PAGE.	155
Figura 57.	Purificación de los complejos I, IV y V mediante cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de detergente.	156
Figura 58.	Separación de los complejos I y IV en cromatografía de exclusión molecular visualizados mediante BN-PAGE.	158
Figura 59.	Cristales salinos obtenidos en las pruebas de cristalización del dímero de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	161

Índice de Tablas

Tabla 1.	Construcciones de las subunidades Asa de <i>Polytomella</i> sp y fragmentos en vectores de expresión	22
Tabla 2.	Metodología utilizada para purificación de las subunidades recombinantes	24
Tabla 3.	Productos esperados de la expresión de las subunidades Asa mediante 3 sistemas de expresión y nomenclatura utilizada.	32
Tabla 4.	Posibles interacciones observadas por Far-Western de las subunidades Asa purificadas contra la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp	44
Tabla 5.	Porcentaje de G-C y número de codones <i>argU</i> en las subunidades Asa expresadas	53
Tabla 6.	Porcentaje péptido inducido/proteína total para la expresión de las subunidades Asa en <i>E. coli</i>	54

Abreviaturas

ASA	Subunidades Asociadas a la ATP Sintasa (del inglés: <i>ATP Synthase-Associated Subunits</i>)
BCIP	<i>p</i> -toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato
BN-PAGE	Electroforesis azul nativa en gel de poliacrilamida
cDNA	ADN complementario
CoA	Coenzima A
COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa
$\Delta\Psi$	Potencial transmembranal
Δp	Fuerza protón-motriz
ETF	Flavoproteína transportadora de electrones
FADH ₂	Dinucleótido de flavín adenina (reducido)
Fe/S	Centros hierro-azufre
FMN	Mononucleótido de flavina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
ME	Microscopía electrónica
NBT	Bromuro de nitro-azul tetrazolio
NDH	NADH deshidrogenasa
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (del inglés: oligomycin-sensitivity conferring protein)
Q	Ubiquinona
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

1. Introducción

1.1. Fuerza protón motriz

Dentro de los dominios de la vida existe una gran diversidad de formas de generación del potencial electroquímico de membrana (Nelson, 1994; Schaffer *et al.*, 1999; Madeira, 2012). Esta fuerza protón motriz (Δp) es utilizada para diversas funciones celulares: síntesis de ATP, transporte de iones, intercambio de nucleótidos, traslocación de proteínas, generación de calor, movimiento de flagelos (Nelson, 1994; Stryer, 1995). La conservación de energía para la mayoría de las formas existentes de vida recae en el principio universal de transducción quimiosmótica (Mitchell, 1961), que en términos filogenéticos evolucionó de forma temprana. En el postulado original, la fuerza protón motriz es obtenida a partir de la energía de oxidaciones traducida a un gradiente de potencial eléctrico y/o a un gradiente de pH entre ambos lados de una membrana biológica. Lo anterior se puede resumir en la siguiente ecuación:

$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\Psi - \frac{RT}{F} \Delta pH = \Delta\Psi - Z\Delta pH$$

donde Ψ = potencial de membrana; $\Delta\Psi = \Psi_{\text{dentro}} - \Psi_{\text{fuera}}$;
 $\Delta pH = pH_{\text{dentro}} - pH_{\text{fuera}}$; $Z = 59$ a 25°C

Esta fuerza protón motriz se expresa en milivolts (mV) y representa el potencial (energía libre) del gradiente electroquímico trasmembranal de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) dividido entre la constante de Faraday (F). Lo anterior es análogo a la fuerza electrón motriz en electricidad (Madeira, 2012). Para la obtención de energía química, a partir de esta fuerza protón motriz, la mayoría de las rutas convergen en un complejo membranal denominado ATP sintasa que está encargado de llevar a cabo la síntesis de ATP.

1.2. ATPasas rotatorias

La familia de los complejos membranales de ATPasas rotatorias contiene tres miembros y cada uno juega un papel fundamental en la conversión de la energía. La F₁F₀-ATPasa (F-ATPasa) acopla la síntesis de ATP con el potencial electroquímico de membrana ($\Delta\mu_H^+$) en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, mientras que la H⁺-ATPasa (V-ATPasa) opera como una bomba de protones dependiente de la hidrólisis de ATP principalmente en membranas de eucariontes, aunque también se ha encontrado en varios miembros del género bacteriano *Thermus*. Por otro lado, en diferentes especies de arqueas y bacterias, la A₁A₀-ATPasa (A-ATPasa) puede funcionar tanto como una ATP sintasa o como una bomba de iones (Figura 1) (Radax *et al.*, 1998; Muench *et al.*, 2011).

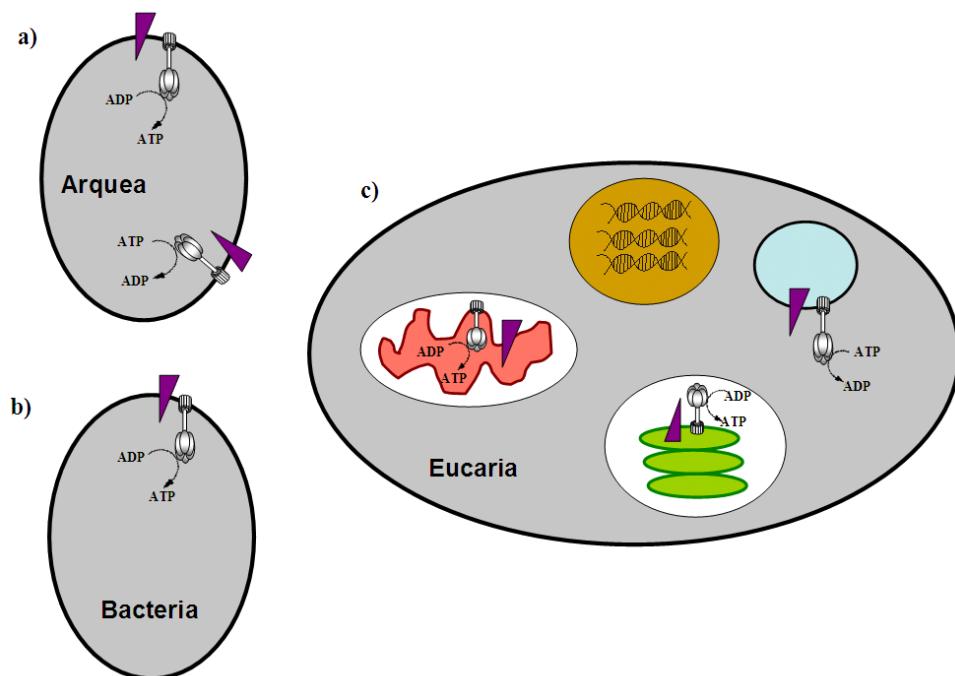


Figura 1. Distribución y función de las ATPasas rotatorias. a) Función de síntesis de ATP y como bomba de Na⁺/H⁺ mediante la hidrólisis de ATP de la A-ATPasa en Arqueas. b) Función de síntesis de ATP en membrana plasmática bacteriana. c) Función de síntesis de ATP de la F-ATPasa en membrana interna mitocondrial (rojo) y membrana tilacoidal (verde); función de bomba de H⁺ de la V-ATPasa en membranas vacuolares (azul). Los triángulos morados indican la dirección del potencial de membrana.

1.3. Evolución de las ATPasas rotatorias

Se ha propuesto que todas las ATPasas provienen de un ancestro común, la hipótesis más aceptada postula que un organismo anaeróbico desarrolló una bomba de protones

dependiente de ATP para la formación de un gradiente en su membrana. Con la aparición de otros sistemas redox, esta enzima evolucionó a una ATP sintasa mediante la duplicación de genes en el rotor y la inactivación de sitios catalíticos en el sector soluble, a fin de ajustar la relación H^+/ATP (Figura 2) (Cross y Taiz 1990; Cross y Müller 2004).

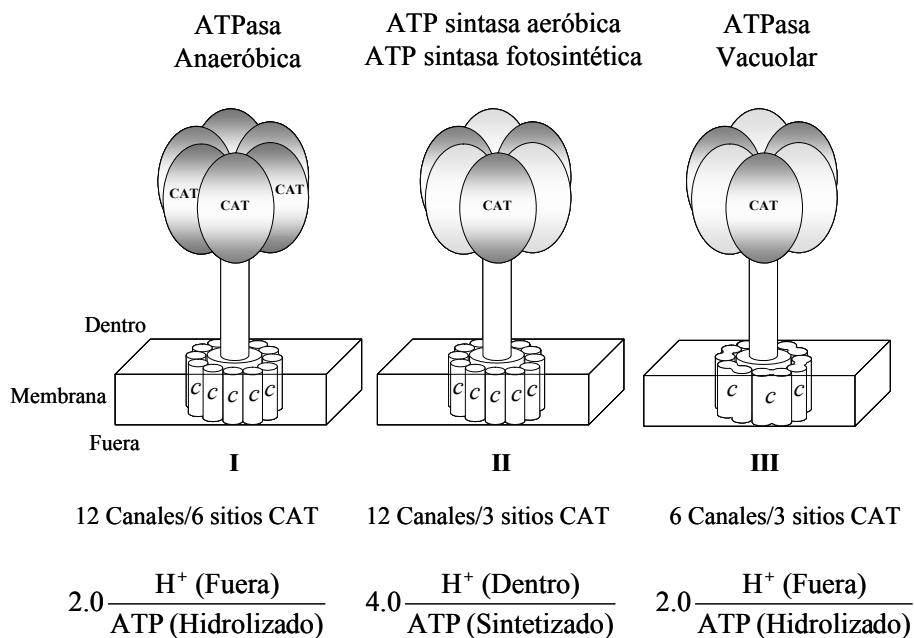


Figura 2. Evolución de las ATPasas rotatorias. La bomba de protones dependiente de ATP anaeróbica ancestral evolucionó hacia una ATP sintasa aeróbica (I→II), acompañando este cambio de función ocurrió una duplicación de genes de la subunidad catalítica (CAT), lo que provocó la pérdida de la función de tres de ellas, duplicando la relación H^+/ATP . El siguiente cambio en la función generó una bomba de protones dependiente de ATP, nuevamente (II→III) acompañada de una duplicación de los genes de la subunidad c que provocó la pérdida de la mitad de sitios en el canal de H^+ , disminuyendo la relación H^+/ATP a 2.0. Modificado de Cross y Taiz (1990).

Basándose en su composición polipeptídica y la secuencia primaria de las subunidades, las A-ATPasas se encuentran más relacionadas estructuralmente con las V-ATPasas que con las F-ATPasas (Iwabe *et al.*, 1989). Las A- F- y V-ATPasas se consideran un nanomotor rotatorio que consta de tres componentes desde el punto de vista mecánico (Figura 3a, 3b, y 3c): un dominio de membrana $A_o/F_o/V_o$ formado por el canal de protones, un tallo central (rotor) y un dominio soluble $A_1/F_1/V_1$ que contiene las subunidades catalíticas (Stock *et al.*, 2000; Gruber *et al.*, 2001; Nishi y Forgac, 2002). Una diferencia fundamental entre las ATPasas tipo V- y A- es la dissociación reversible del dominio V_1 del V_o como un mecanismo de regulación *in vivo* de la actividad de ATPasa (Muller *et al.*, 1999).

1.4. Estructura de las ATPasas rotatorias

Los modelos tridimensionales obtenidos mediante criomicroscopía electrónica de la A-ATPasa de *Pyrococcus furiosus* permitieron observar lo que corresponde a una estructura de “collar” que actúa como un segundo estator alrededor del núcleo catalítico A₃/B₃ (Coskun *et al.*, 2004; Vonck *et al.*, 2009). Esta estructura se encuentra más pronunciada en la familia de las V-ATPasas como se observa en el modelo del gusano de tabaco, *Manduca sexta* (Muench *et al.*, 2009); sin embargo, no se encuentra en las F-ATPasa (Figura 3b). La A₁A_o-ATP sintasa está compuesta por un dominio catalítico (A₃/B₃), un rotor central, dos brazos periféricos, una región translocadora de protones embebida en la membrana y el collar compuesto por el extremo amino de la subunidad I. Por otro lado, la V₁/V_o ATPasa contiene además de las subunidades homólogas descritas para la enzima de arqueas un tercer brazo periférico heterodimérico de subunidades E y G; la subunidad C une este tercer brazo al collar formado en este caso por las subunidades H y el extremo amino de la subunidad I (Figura 4).

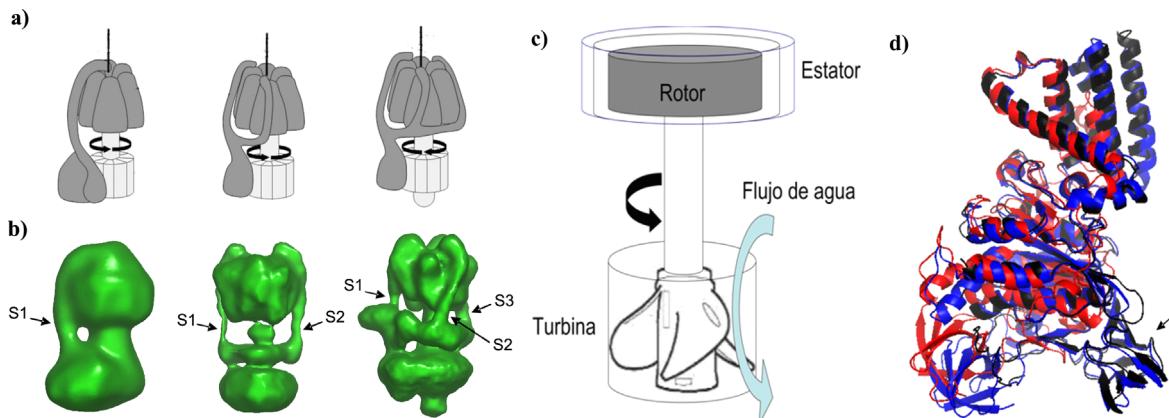


Figura 3. Modelo tridimensional de los elementos rotor/estator y sobreposición de las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas. a) Esquema de organización de los dominios de las -F, -A y -V ATPasas, las flechas indican la dirección relativa de giro del rotor central durante la síntesis de ATP (-F, -A) e hidrólisis de ATP (-V). Modificada de Muench *et al.*, 2011. b) Modelos tridimensionales obtenidos por microscopía electrónica de las -F, -A y -V ATPasas (F: EMD 1357; A: EMD 1542; V: EMD 1590), se observa la presencia de 1, 2 y 3 brazos periféricos (S1, S2 y S3) para las -F, -A y -V ATPasas, respectivamente, y una estructura tipo “collar” que une los brazos en las -A y -V ATPasas. Modificada de Muench *et al.*, 2011. c) Esquema de un generador hidroeléctrico, la flecha azul representa el flujo de agua, la flecha negra representa el giro del rotor central que genera corriente al interaccionar con el estator magnético. d) Sobreposición de las estructuras cristalográficas correspondientes a las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas (se utilizaron las estructuras obtenidas a la mayor resolución disponible). Negro: subunidad A de A-ATPasa (pdb: 3MFY, 2.35 Å); azul: subunidad A de V-ATPasa (pdb: 3GQB, 2.8 Å); rojo: subunidad β de F-ATPasa (pdb: 2JDI, 1.9 Å), la flecha indica la región no homóloga (NHR).

Debido a su origen común, las subunidades mayores de las A-ATPasas muestran cerca del 50% de aminoácidos idénticos con subunidades de las V-ATPasas y alrededor del 25% con las F-ATPasas (Muller *et al.*, 1999). Las estructuras cristalográficas de las subunidades catalíticas de los tres tipos de ATPasas al empalmarse muestran que la diferencia primordial entre estas estructuras es la denominada región no homóloga (NHR) (Figura 3d), que se encuentra presente en las ATPasas tipo -V y tipo -A, únicamente; y se ha sugerido que juegan un papel regulatorio de la actividad enzimática (Shao *et al.*, 2003). Lo anterior implica que la estructura global del sector A₁ y V₁ difiere notablemente de la estructura semiesférica observada para el dominio F₁ de las F-ATPasas, en donde las subunidades α y β se sobreponen con un RMSD menor a 1 Å sin tomar en cuenta la región de unión a sustrato denominada *P-Loop* (Abrahams *et al.*, 1994).

1.5. Complejo F₁/F_o ATP sintasa y fosforilación oxidativa

La F₁/F_o ATP sintasa es un complejo enzimático oligomérico ampliamente distribuido en la naturaleza, se localiza en la membrana plasmática de las bacterias, en la membrana tilacoidal de los cloroplastos y en la membrana interna mitocondrial (revisado por Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou, 2005). El complejo bacteriano presenta la composición más simple, ya que consta solamente de ocho subunidades diferentes, 3 de F_o: a, b₂ y c₍₁₀₋₁₅₎ y 5 subunidades diferentes de F₁: alfa₃, beta₃, gamma, delta y epsilon (Weber, 2006) (Figura 4).

El complejo mitocondrial de la F₁F_o-ATP sintasa juega un papel preponderante en la fosforilación oxidativa. En este proceso los electrones alimentan a la cadena respiratoria a través de diferentes vías. En la oxidación del NADH por la NADH deshidrogenasa (complejo I), los electrones llegan hasta la ubiquinona (Q) a través de un mononucleótido de flavina (FMN) y de varios centros fierro-azufre (Fe/S). Los electrones procedentes de la oxidación del succinato, de la acil-CoA y de otros sustratos, entran a la cadena respiratoria a través de la succinato deshidrogenasa (Complejo II) u otras deshidrogenasas mitocondriales; todos ellos son transferidos hasta la ubiquinona a través del FADH₂ unido a la enzima y por una flavoproteína transportadora de electrones (ETF). El anillo quinoidé de

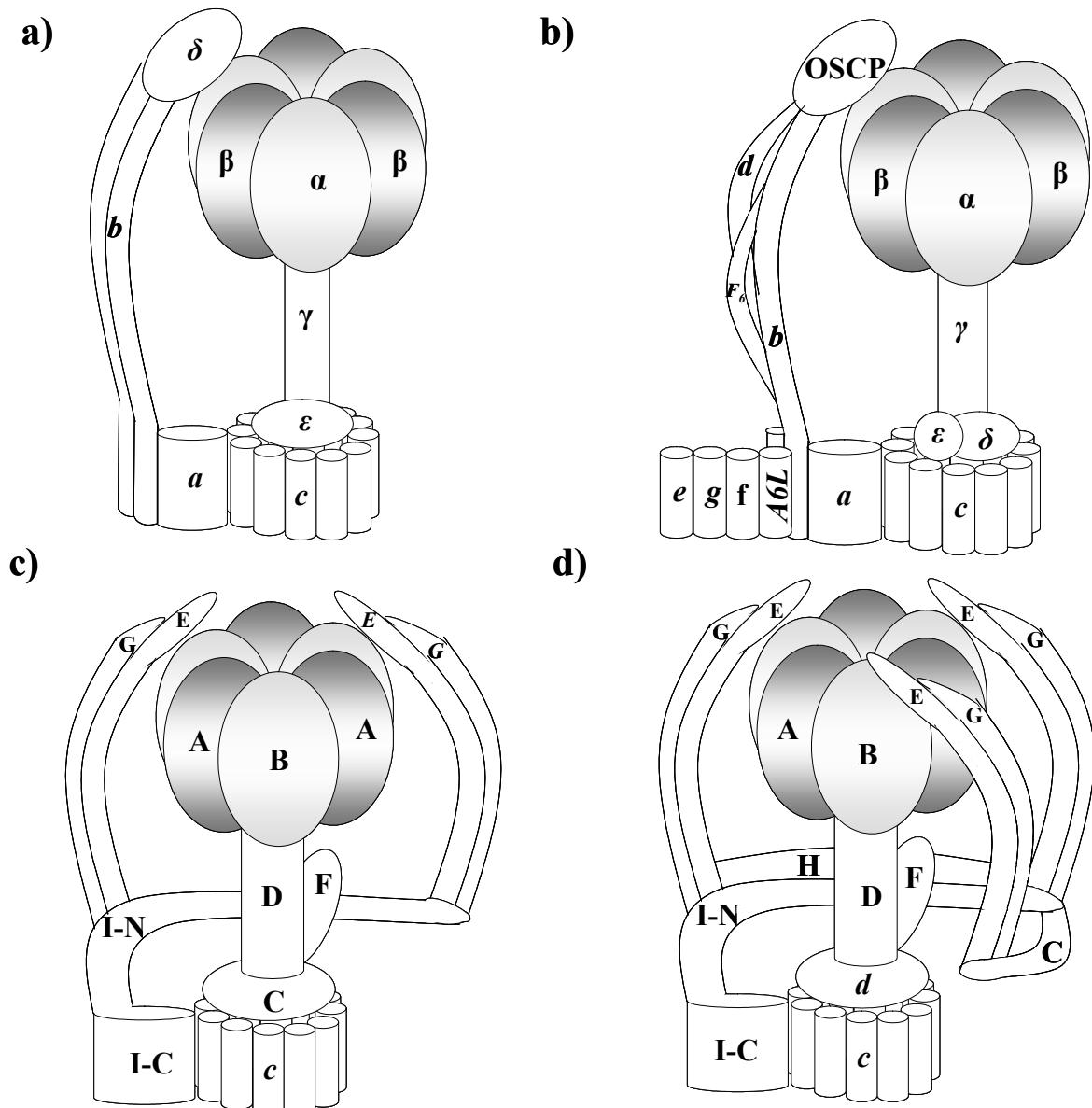


Figura 4. Estructura de las ATPasas rotatorias. Distribución de las subunidades en las -F, -A y -V ATPasas. a) ATP sintasa de *E. coli*. b) Complejo V mitocondrial de corazón de bovino. c) ATP sintasa de las Arqueas. d) ATPasa vacuolar. Las figuras muestran la nomenclatura para cada subunidad. Las subunidades I-N y I-C que aparecen en c) y d) corresponden respectivamente a los extremos amino y carboxilo terminales de la subunidad I. La subunidad OSCP (proveniente del inglés oligomycin sensitivity conferral protein) sólo se encuentra en b). Basado en Walker y Dickson 2006, Muench *et al.*, 2011, Cano-Estrada y González-Halphen, 2011.

la coenzima oxidada se reduce y forma la dihidroubiquinona (QH_2), que a su vez transfiere los electrones al complejo quinol:citrocomo c oxidoreductasa (complejo III), el cual los cede al citocromo c soluble del espacio intermembranal, por medio de dos grupos hemo del tipo b , un centro Fe/S y un hemo c_1 . El citocromo c transporta los electrones al complejo IV

que contiene como componentes redox activos dos centros con cobre (Cu_A y Cu_B) y los grupos hemo α y hemo α_3 , a través de los cuales los electrones llegan finalmente hasta el oxígeno. Por la donación de dos electrones del O_2 se produce -al menos formalmente- el anión O_2^- , que une dos protones y forma agua (Koolman y Röhm, 2004) (Figura 5). Los electrones provenientes de la β -oxidación de los ácidos grasos también pueden entrar a la cadena respiratoria a través de la poza de quinonas (Nelson y Cox, 2005).

Las reacciones que llevan a cabo los complejos I, III y IV están acopladas a la translocación vectorial de protones, por lo que se consideran bombas redox que generan un gradiente electroquímico. Por cada molécula de H_2O formada se bombean alrededor de diez protones hacia el espacio intermembranal. El proceso de transferencia de electrones y traslocación de protones se encuentra favorecido dentro de la membrana gracias a la asociación supramolecular de los complejos membranales. Este fenómeno se ha observado para los complejos III y IV en el caso de *S. cerevisiae* y para los complejos I, III y IV en el caso de la cadena respiratoria mitocondrial de bovino (Schagger y Pfeiffer, 2000; Schagger, 2002) y de *Yarrowia lipolytica* (Guerrero-Castillo *et al.*, 2009).

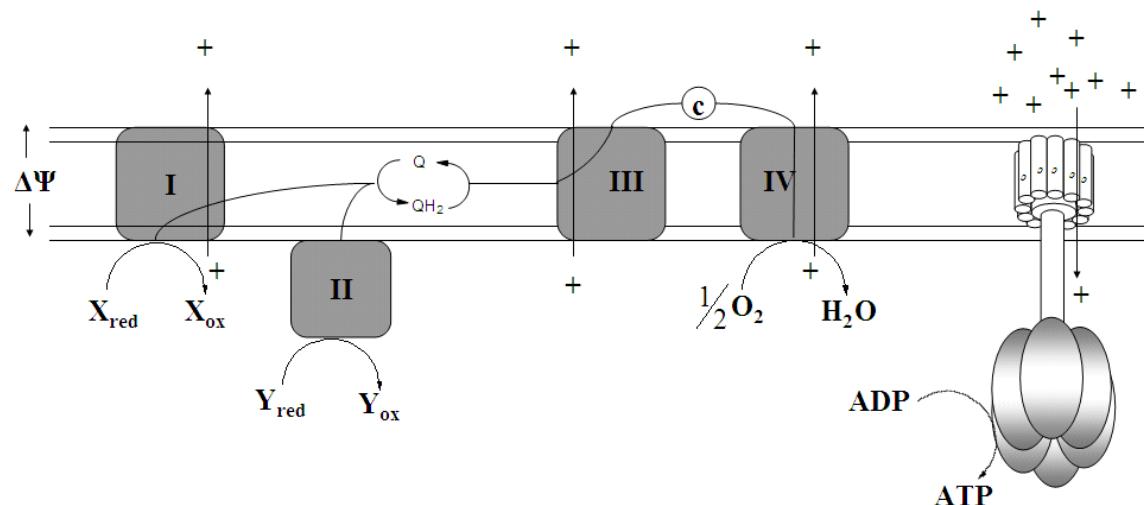


Figura 5. Fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria conduce los electrones generados por la oxidación de equivalentes reductores hacia el O_2 . Los complejos I, III y IV bombean protones hacia el espacio intermembranal creando un gradiente electroquímico, el cual es utilizado por el complejo V para llevar a cabo la síntesis de ATP.

Como se mencionó anteriormente, la fuerza protón motriz es utilizada por el complejo V para llevar a cabo la síntesis de ATP. En el mecanismo propuesto por Junge en 1997, los protones pasan a través de un hemicanal de la subunidad α y por el anillo de subunidades c embebido en la membrana, lo que produce su rotación. Concomitantemente, el anillo de subunidades c hace girar el cuello central del sector F_1 formado por las subunidades γ , δ y ϵ (nomenclatura de la enzima de mitocondria de corazón de bovino) (Stock *et al.*, 2000). Otras subunidades constituyen los elementos fijos del motor (el estator): la subunidad α , el centro catalítico [α_3/β_3], el pilar periférico [OSCP/b/d/ F_6] y las subunidades supernumerarias [A6L/e/f/g] (Figura 4) (Golden y Pedersen, 1998; Ko *et al.*, 2000; Walker y Dickson, 2006). Algunas de estas subunidades están involucradas en la estabilización del complejo dimérico, tales como las subunidades e, g, i y k (Brunner *et al.*, 2002; Paumard *et al.*, 2002; Fronzes *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2010). Una de las subunidades adicionales, la proteína inhibidora IF₁, juega un papel regulatorio (Gledhill y Walker, 2005). Este papel regulatorio es llevado a cabo por la subunidad ϵ en la mayoría de las enzimas bacterianas (Tsunoda *et al.*, 2001; Bulygin *et al.*, 2004) mientras que la subunidad ζ regula la función en la enzima de *Paracoccus denitrificans* y el resto de las alfa-proteobacterias (Morales-Ríos *et al.*, 2010).

A la fecha no se ha reportado la estructura completa de una ATPasa rotatoria. Para este tipo de enzimas existen 155 estructuras disponibles en el banco de datos estructurales de proteínas (PDB), las más completas corresponden a las F-ATPasas mitocondriales de bovino, de levadura y de *E. coli*.

1.6. Dímero de complejo V mitocondrial

Mientras que en el caso de la membrana plasmática bacteriana se propone que la ATP sintasa se encuentra como un monómero, se han reportado dímeros de ATP sintasa presentes en mitocondria de *Chlamydomonas* (van Lis *et al.*, 2003), *Polytomella* (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006), *Saccharomyces* (Arnold *et al.*, 1998), *Yarrowia* (Guerrero-Castillo *et al.*, 2009), varias especies de plantas (Eubel *et al.*, 2003), bovino (Schagger y Pfeiffer, 2000) y rata (Wittig *et al.*, 2006). Cuando estos dímeros se tratan con un detergente no

iónico y se analizan por electroforesis azul nativa (BN-PAGE) se encuentra que son activos (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009; Wittig *et al.*, 2006; Guerrero-Castillo *et al.*, 2009).

Utilizando crio-tomografía electrónica la ATP sintasa mitocondrial es fácilmente identificable en membranas por su porción globular F₁ de ~10 nm conectada a la membrana por un brazo de ~5 nm de largo (Nicastro *et al.*, 2000; Straus *et al.*, 2008). La presencia del complejo dimérico sobre la membrana mitocondrial se ha visualizado en *Bos taurus*, *Yarrowia lipolytica*, *Podospora anserina*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Solanum tuberosum* con un ángulo entre monómeros de ~80° en bovino y en las tres especies de hongos, y de ~115° para *S. tuberosum* (Davies *et al.*, 2011). Por el contrario, cuando se realizan estudios de crio-microscopía electrónica del complejo purificado a partir de *S. cerevisiae*, se observa una gran variedad de ángulos presentes entre cada monómero entre los 24 y 140° (Couoh-Cardel *et al.*, 2010); y de 45 a 142° (Thomas *et al.*, 2008). Se ha propuesto que la asociación dimérica del complejo V es la responsable de la formación de las crestas en la membrana interna mitocondrial (Paumard *et al.*, 2002) y así se favorece la síntesis de ATP optimizando la utilización del gradiente de protones (Strauss *et al.*, 2008) (Figura 6).

1.7. Brazo periférico

Como se mencionó, las subunidades correspondientes al núcleo catalítico y al rotor central de las F-ATPasas se encuentran altamente conservadas, por lo que se puede llevar a cabo la superposición estructural de las subunidades catalíticas de estos complejos. También se observa un 72% de identidad entre las subunidades de mayor masa molecular de las mitocondrias de bovino y la enzima de *E. coli* (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Poyou, 2005). Las masas moleculares determinadas por espectrometría de masas de desorción iónica inducida por láser en cama líquida (LILBID-MS) para la subunidad β de 5 especies tiene un valor promedio de 51.4 kDa con un error de <0.6% (Hoffmann *et al.*, 2010).

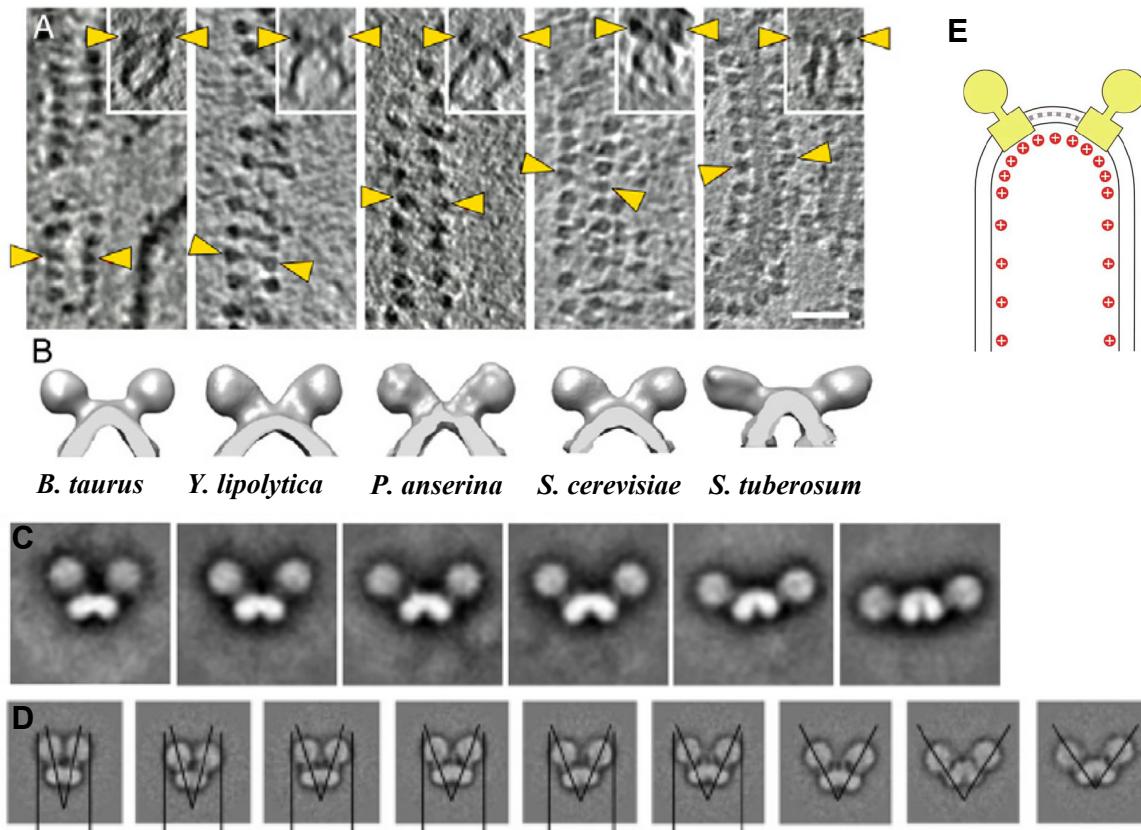


Figura 6. Estructura dimérica de la ATP sintasa mitocondrial y su relación con las crestas mitocondriales. A) Tomografías del complejo V sobre la membrana interna mitocondrial de 5 especies B) modelos 3D reconstruidos a partir de las imágenes obtenidas en (A) tomado de Davies *et al.*, 2011. C y D) Imágenes de microscopía de partícula única para el dímero purificado de *S. cerevisiae* C) (Thomas *et al.*, 2008) D) (Couoh-Cardel *et al.*, 2010) E) Esquema de la formación de las crestas sobre la membrana interna mitocondrial favorecida por el dímero de la ATP sintasa, tomado de Straus *et al.*, 2008.

El brazo periférico es un componente adicional requerido para contrarrestar la fuerza de torsión mecánica generada por la rotación del tallo central de la enzima durante la síntesis e hidrólisis de ATP, así como para conectar el núcleo catalítico con la base membranal. El número de estos estatores varía según el tipo de ATP sintasa siendo de 1, 2 y 3 para las F-, A- y V-, respectivamente (Figura 4). Cada uno de los tallos periféricos de las enzimas tipo A- y V- se forma por un heterodímero de subunidades E y G (Stewart *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008), mientras que la composición del brazo en las F-ATPAsas es muy variable entre organismos (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011). A la fecha no se ha logrado resolver la estructura de ningún estator periférico completo junto con la porción membranal, por lo que la información disponible corresponde a estudios estructurales de subcomplejos aislados o de subunidades reconstruidas sobre el núcleo catalítico (Dickson *et*

al., 2006; Rees *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2010). La estructura cristalográfica del estator heterodimérico (E y G) que une a la subunidad I con una subunidad B del núcleo catalítico en las V- y A-ATPasas permitió observar una estructura de hélices entrecruzadas dextrógiros (Lee *et al.*, 2010). Se ha postulado que este tipo de plegamiento se encuentra presente en la región formadora del dímero de las subunidades *b* del brazo de la F-ATPasa de *E. coli* (Del Rizzo *et al.*, 2002, Del Rizzo *et al.*, 2006); sin embargo, existen estudios que proponen que esta región podría formar hélices entrecruzadas levógiros (Wise y Vogel, 2008, Wise y Vogel, 2009). En el caso del brazo periférico de la F-ATPasa de bovino no está claro el sentido de las hélices presentes, ya que las estructuras que se han obtenido son solamente de fragmentos de las subunidades (Dickson *et al.*, 2006, Rees *et al.*, 2009) (Figura 7).

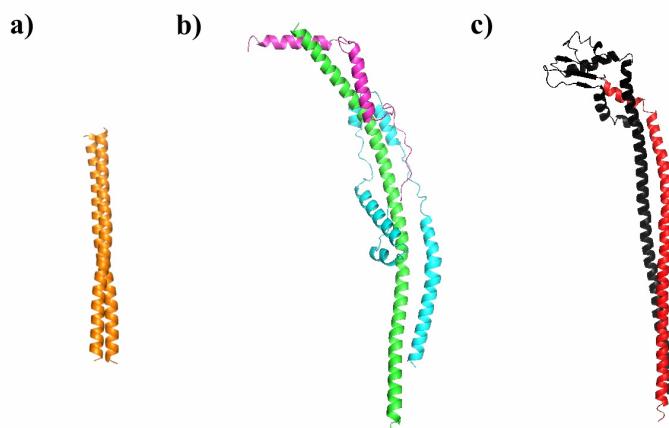


Figura 7. Estructura de los brazos periféricos de las ATPasas rotatorias. a) Región formadora del dímero (b62-122) de la F-ATPasa de *E. coli* (pdb: 1L2P). b) Brazo periférico (b79-183; d3-123; F65-70) del complejo V mitondrial de bovino (pdb: 2CLY). c) Brazo periférico de la A-ATP sintasa de *T. thermophilus* (subunidades E y G) (pdb: 3K5B).

Fuera de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *B. taurus*, poco se conoce acerca de las subunidades que forman el brazo periférico de los complejos mitocondriales en otros organismos. Sin embargo, se ha encontrado la presencia de subunidades no conservadas en complejos mitocondriales de ciliados, tripanosomátidos y algas clorofíceas (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011). Estas subunidades atípicas podrían modificar la estructura de la enzima dimérica como se ha visualizado en estudios de microscopía para los complejos de *Polytomella* (Dudkina *et al.*, 2006) y *Tetrahymena thermophila* (Balabaskaran *et al.*, 2010). En el caso de las enzimas típicas, se ha propuesto que el factor B asociado a la enzima de

bovino podría estar involucrado en la asociación de dímeros a tetrámeros en la enzima como un mecanismo de aumento de la eficiencia en la utilización del gradiente de H⁺ para la síntesis de ATP (Belogrudov, 2009). Recientemente, se han reportado asociaciones débiles de subunidades a la F-ATP sintasa de mamífero como es el caso de la subunidad *diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue* (DAPIT) y el proteolípido de 6.8 kDa con secuencia amino terminal MLQ, las cuales sólo son detectables junto con el complejo cuando éste se purifica en presencia de fosfolípidos exógenos. Se considera que estos nuevos polipéptidos pueden tener un papel importante en el ensamblaje o estabilización de la enzima (Fujikawa *et al.*, 2013, Ohsakaya *et al.*, 2011).

1.8. Algas clorofíceas

Las algas verdes (Chlorophyta) viven en ambientes marinos costeros formando parte del plancton o sujetas al fondo (bentos). También son abundantes en agua dulce, en lagos y ríos, en ambientes terrestres (rocas, lodos, troncos de árboles) y algunas son capaces de vivir en ambientes extremos (montañas y nieve). Podrían dividirse en dos grandes clados: el primero denominado Charophyta contiene desde organismos unicelulares (*Micrasterias*), filamentosos (*Spirogyra*) hasta talos complejos parenquimatosos (*Chara*); este clado comparte muchas características con las plantas. El segundo clado contiene las familias *Prasinophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* y *Chlorophyceae*, formadas por una gran diversidad de miembros que incluyen flagelados unicelulares (*Chlamydomonas*) y colonias (*Volvox*), formas filamentosas ramificadas o no ramificadas, algas macroscópicas marinas (*Ulva*, *Codium*), algas del suelo (*Chlorella*), epífitos terrestres (*Trentopohlia*) y fícobiontes (*Trebouxia*) (Cubas, 2008; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2012).

Chlamydomonas es un género de algas verdes unicelulares que se encuentran distribuidas ampliamente en el mundo, en suelos, aguas dulces, océanos e incluso en la nieve. Las algas de este género tienen pared celular, cloroplastos y dos flagelos anteriores. Se han descrito más de 500 especies diferentes. La más utilizada en la experimentación de laboratorio es *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 8), constituida por células haploides. Puede crecer en medios simples con sales inorgánicas, utilizando la fotosíntesis como proveedora de energía. Sin embargo, también puede crecer en oscuridad con acetato como fuente alterna

de carbono. En ausencia de fuente de nitrógeno, las células haploides de tipo opuesto se fusionan formando una zigospora diploide que forma una pared muy gruesa para protegerse de condiciones adversas. Cuando estas condiciones mejoran, el zigoto diploide se separa mediante meiosis liberando 4 células haploides que continúan con vida vegetativa (<http://www.chlamy.org>). Se cuenta con las secuencias completas del genoma nuclear, cloroplastídico y mitocondrial de *C. reinhardtii*, lo cual lo ha convertido en un organismo modelo para estudiar la fotosíntesis, la biogénesis de cloroplastos, la privación de nutrientes, el ensamblaje y la función del flagelo, y también para estudios evolutivos y estudios de los complejos mitocondriales (Smith y Lee, 2008b; Atteia *et al.*, 2013).

Algunas algas incoloras están relacionadas con las algas verdes dado que comparten características morfológicas y etapas semejantes en sus ciclos de vida. Un ejemplo es el alga *Polytomella* sp que se encuentra relacionada con *C. reinhardtii* (Figura 8); ambos géneros han reducido el tamaño de su secuencia de ADN mitocondrial, que codifica para un número limitado de proteínas de la cadena respiratoria. *Polytomella* es un alga unicelular, de forma ovoide, con cuatro flagelos; es incolora ya que carece de cloroplastos, lo que permite un mejor estudio de la estructura mitocondrial y, al igual que *C. reinhardtii*, tiende a enquistarse en condiciones externas desfavorables.



Figura 8. Fotografías de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. La primera es un alga fotosintética, mientras que la segunda es un alga incolora. Ambos géneros pertenecen a la familia Chlamydomonadaceae. http://bp1.blogspot.com/_DZH2cmCoois/Rw-OYR_zsKI/AAAAAAAADaM/LtXdx_Wo3W4/s1600-h/chlamydomonas.jpg y <http://128.128.175.211/fedora/get/data:288628/LocalImage>

1.9. F₁F₀ ATP sintasa de algas cloroficeas

El complejo V mitocondrial de diversos organismos como hongos, plantas y mamíferos, al ser solubilizado con concentraciones >1.0% de detergente no iónico, suele migrar como un monómero de 550 a 600 kDa en geles azules nativos (BN-PAGE) (Schägger *et al.*, 1994). En comparación con otras F₁F₀-ATPasas, las ATP sintasas de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp presentan una estructura oligomérica distinta a la del resto de los eucariotes, ya que migran como dímeros estables de 1,600 kDa (Figura 9) en las mismas condiciones de solubilización (van Lis *et al.*, 2003; van Lis *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2005). A partir de estudios de microscopía electrónica (ME), se observó que el dímero del complejo V de *Polytomella* sp presenta una estructura distinta a la enzima aislada de mitocondrias de bovino o de levadura (Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2006; Cano-Estrada *et al.*, 2010; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). Adicionalmente, la enzima de estas algas difiere en su composición polipeptídica de la ATP sintasa mitocondrial reportada para la mayoría de los eucariotes, ya que contiene únicamente 8 de las subunidades ortodoxas correspondientes al núcleo catalítico (α_3/β_3), al rotor central (γ , δ , ϵ y anillo de c) y a las dos subunidades encargadas de la unión de estos segmentos con el brazo periférico a (en la base de la enzima) y OSCP (en la porción F₁). Además de estas subunidades clásicas, contiene 9 polipéptidos atípicos de masas moleculares entre los 9 y 60 kDa que se han denominado subunidades ASA por sus siglas en inglés: *ATP Synthase-Associated Subunits* (Figura 10). Estas subunidades ASA están presentes exclusivamente en el grupo de las algas cloroficeas y no se encuentran en otras algas cercanamente relacionadas, como las algas verdes del linaje de las ulvoficeas, de las prasinoficeas o de las trebuxioficeas (Cardol *et al.*, 2005, Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006).

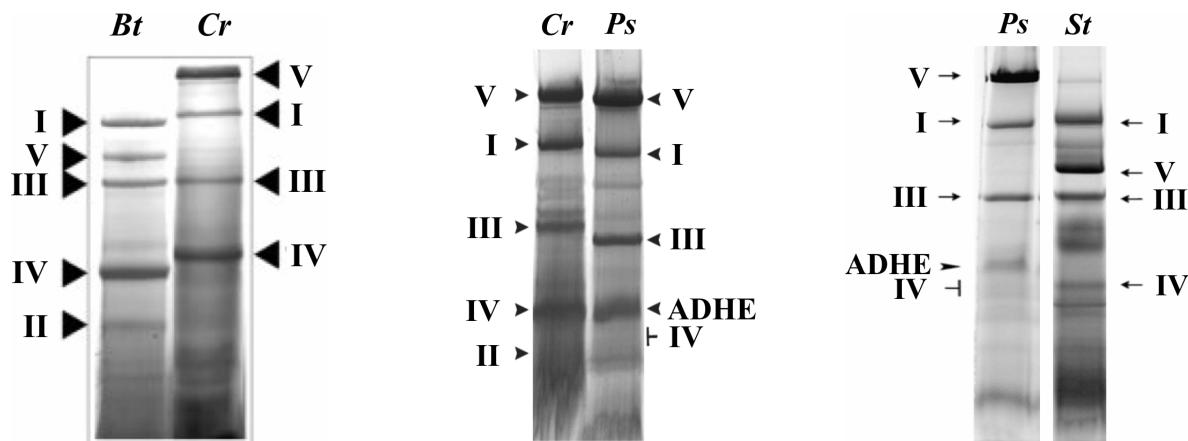


Figura 9 BN-PAGE de los complejos mitocondriales de distintas especies. Se observa la presencia de un complejo V dimérico en las especies de *C. reinhardtii* (Cr) y *Polytomella* sp. (Ps), que presenta menor migración que el complejo I en contraste con el complejo monomérico observado para *B. taurus* (Bt) y *S. tuberosum* (St). Modificado de: van Lis *et al.*, 2003, 2005 y 2007.

El complejo V de estas algas también contiene una extensión en el extremo amino terminal de la subunidad alfa de aproximadamente 20 residuos, así como otra en el extremo carboxilo terminal de la subunidad beta con cerca de 64 aminoácidos (Franzén y Falk, 1992; Nurani y Franzén, 1996). Se desconoce la función de estas extensiones de aminoácidos, aunque se ha sugerido que la extensión de la subunidad beta podría estar involucrada en la regulación del complejo, puesto que presenta similitud con la subunidad ε de *E. coli* (Atteia *et al.*, 1997) encargada de regular a la enzima bacteriana. También se ha postulado que las subunidades ASA se encuentran sustituyendo a las subunidades convencionales involucradas en la formación del brazo periférico (b, d, f, A6L y F6), en la dimerización del complejo (e y g) y en la regulación de la actividad (IF1), y que podrían ser las responsables de la formación del brazo periférico robusto observado en imágenes de microscopía y de la alta estabilidad del dímero de la enzima (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; van Lis *et al.*, 2007). Para elucidar la estequiometría de estas subunidades dentro del dímero de ATPasa se marcaron las cisteínas de las subunidades de la enzima que poseen cuando menos una cisteína en su secuencia, lo anterior arrojó una relación de $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\delta_1/\text{OSCP}_1/\text{Asa3}_1/\text{Asa4}_1/\text{Asa5}_1$. Basándose en la tinción de Coomassie del resto de las subunidades, se propuso una estequiometría de un polipéptido ASA por cada subunidad gamma (Cano-Estrada *et al.*, 2010).

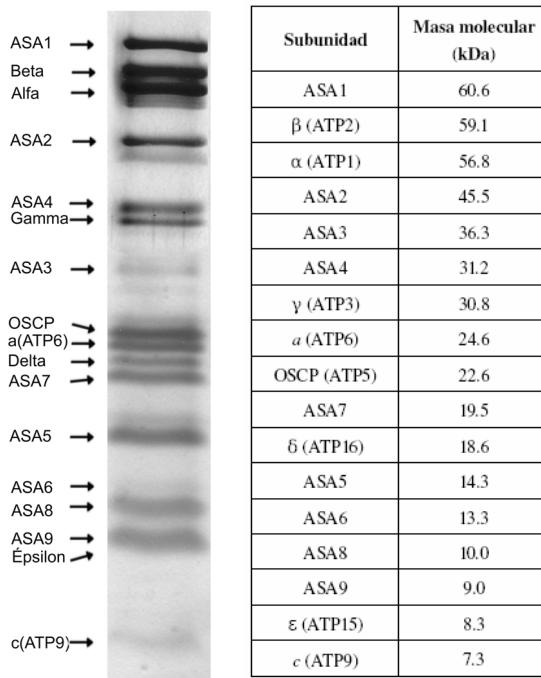


Figura 10. Composición polipeptídica de la F1F0-ATPasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Se muestra el patrón polipeptídico del complejo en un gel SDS-PAGE.

Inicialmente se propusieron dos modelos acerca de cómo las subunidades ASA se encuentran formando el brazo periférico de la ATPasa de *Polytomella* (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006, van Lis *et al.*, 2007). En nuestro grupo de trabajo, mediante distintos enfoques experimentales, se ha estudiado el papel de estos polipéptidos en el complejo mitocondrial. Utilizando un acercamiento basado en agentes entrecruzadores químicos y generación de subcomplejos, mediante la acción de detergentes y de disociación a altas temperaturas se llegó a un modelo de cómo las subunidades ASA se encuentran formando el brazo periférico. En este modelo se propone que las subunidades Asa6 y Asa9 se encuentran involucradas en la dimerización de la enzima (Figura 11) (Cano-Estrada *et al.*, 2010). Un análisis de hidrofobicidad de las subunidades ASA propone que Asa8 y Asa9 poseen hélices transmembranales, mientras que las subunidades Asa5 y Asa6 se postulan como subunidades hidrofóbicas, probablemente extrínsecas de membrana pero asociadas de alguna manera a la bicapa lipídica. El resto de las subunidades ASA no presentó un carácter hidrofóbico importante y únicamente las subunidades Asa1, Asa4 y Asa7 predicen una estructura de hélices entrecruzadas (*coiled-coils*) (Cano-Estrada *et al.*, 2011), motivo estructural característico de los brazos periféricos de las ATPasas rotatorias (Figura 7). Por

otro lado, estudios con agentes entrecruzadores y estudios de disociación de la enzima muestran una cercanía de las subunidades OSCP, Asa2, Asa4 y Asa7 (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006, Cano-Estrada *et al.*, 2010) por lo que se propone que estas subunidades forman el brazo periférico en las algas clorofíceas (Cano-Estrada *et al.*, 2010). Sin embargo, el silenciamiento del gen *asa7* en *C. reinhardtii* no condujo a cambios notables en la bionergética celular, ni en la estructura de las crestas mitocondriales, a pesar de que la enzima purificada de la mutante silenciada presenta una baja estabilidad y tiende a disociarse liberando el sector F₁ (Lapaille *et al.*, 2010). Es claro que las subunidades Asa presentes en el linaje de las algas clorofíceas le confieren una alta estabilidad estructural al complejo V mitocondrial y a la concomitante formación de las crestas mitocondriales tubulares características en estos organismos (Dudkina *et al.*, 2006).

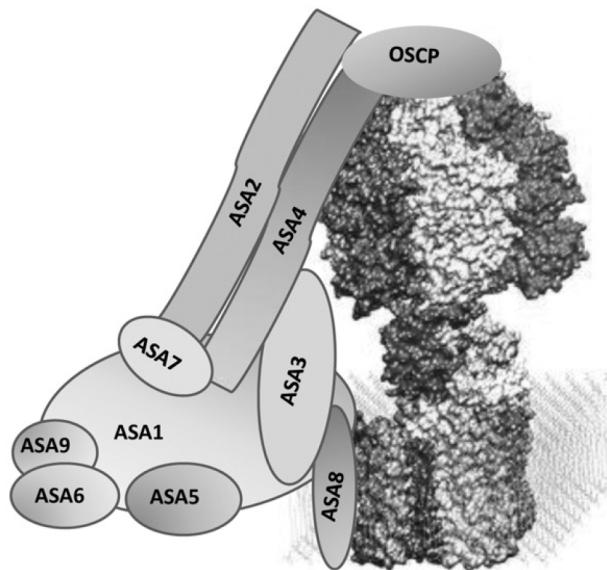


Figura 11. Modelo topológico de las subunidades Asa dentro del monómero de ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Se observa la participación de las subunidades Asa en la formación del brazo periférico de complejo. Tomado de Cano-Estrada *et al.*, 2010.

2. Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de la estructura de las subunidades ASA que conforman el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella* sp. En particular, conocer cómo interaccionan sus diversos componentes polipeptídicos.

3. Objetivos particulares

- Amplificar los cDNAs de las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7, Asa8, OSCP y los fragmentos de interés.
- Clonar los productos en vectores de expresión en bacteria.
- Expressar las proteínas en *Escherichia coli*.
- Purificar las subunidades recombinantes.
- Realizar estudios de interacción con las subunidades purificadas.

4. Justificación

La ATP sintasa es una enzima de amplia distribución en la naturaleza encargada de la síntesis de ATP, la moneda de intercambio de energía en el metabolismo celular. Su estructura se encuentra conservada tanto en bacterias como en eucariontes. Sin embargo, se ha encontrado que en el linaje de las algas clorofíceas, la ATP sintasa mitocondrial presenta una estructura cuaternaria y una composición polipeptídica que difiere de forma notable del resto de las enzimas conocidas. Es de interés profundizar en el estudio de esta enzima atípica y conocer más acerca de sus propiedades estructurales y funcionales, así como de los posibles mecanismos a través de los cuales es regulada. Consideramos que el presente proyecto podrá establecer un modelo topológico de cómo interaccionan algunas de las subunidades ASA y contribuir así al conocimiento de una enzima clave de la fosforilación oxidativa mitocondrial en las algas clorofíceas.

5. Estrategia experimental general

Se amplificó por PCR el cDNA de las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7, Asa8 y OSCP a partir de una genoteca de cDNA de *Polytomella* sp, así como de construcciones previamente realizadas (Cano-Estrada, 2012). Los productos amplificados se clonaron en vectores de expresión en bacterias. Las proteínas recombinantes se expresaron en las cepas de *Escherichia coli* XL1-Blue o BL21-CodonPlus(DE3)RIL mediante la inducción con IPTG. Las subunidades recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal (IMAC), cromatografía de intercambio iónico o una combinación de ambas. Se generaron anticuerpos específicos contra las subunidades Asa2, Asa7-C, Asa8 y OSCP. Con las subunidades purificadas se realizaron ensayos de interacción que incluyen: replegamiento y estabilidad al pH, inmunorréplica tipo Far-Western, generación de subcomplejos en geles azules nativos y purificación de subcomplejos estables. Por otro lado, se realizaron pruebas de cristalización para la subunidad Asa4 purificada y el complejo V mitocondrial aislado, así como una exploración de la formación de oligómeros y supracomplejos mitocondriales. Esta secuencia se muestra en la Figura 12.

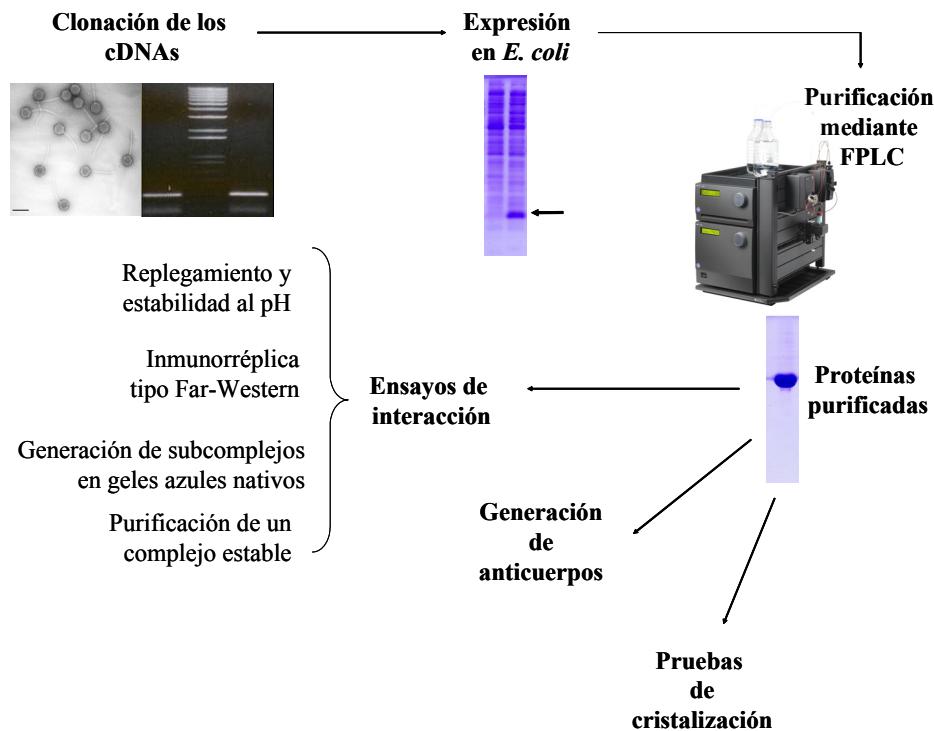


Figura 12. Secuencia experimental de los estudios de interacción de las subunidades Asa a partir de la genoteca de *Polytomella* sp.

6. Metodologías

Los protocolos detallados de las técnicas se encuentran en el Anexo 13.1. Protocolos utilizados

6.1. Amplificación de los cDNA de las subunidades ASA y clonación en vectores de expresión

La amplificación de los genes se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para cada gen (Anexo II). Se experimentó con diferentes temperaturas de alineamiento, número y duración de los ciclos. Se determinaron las condiciones óptimas para amplificar cada gen de interés. Los productos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se secuenciaron. Posteriormente se diseñaron cebadores para amplificar fragmentos de las subunidades; estos fragmentos y los genes que codifican a las subunidades completas se clonaron en los vectores de expresión para *E. coli* pQE30, pET28a y pET3a de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1. Construcciones de las subunidades Asa de *Polytomella* sp y fragmentos en vectores de expresión

Subunidad/ Fragmento	pQE30 (+HisTag)	pET28a (+HisTag)	pET3a (-HisTag)
Asa1	—	✓	✓
Asa2	✓	✓	✓
Asa4	✓	✓	✓
OSCP	✓	✓	✓
Asa7	✓	✓	✓
Asa8	✓	—	—
Asa4-N	—	✓	✓
Asa4-C	—	✓	✓
Asa7-N	—	✓	—
Asa7-C	—	✓	—
OSCP-N	—	✓	—
Ext-Beta	—	✓	—

(✓) Construcción realizada y secuenciada, (—) construcción no realizada

6.2. Expresión de las proteínas ASA recombinantes en *E. coli*.

Los sistemas utilizados permiten la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* mediante la inducción con isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG); además, en el caso de los vectores pQE30 y pET28a la proteína recombinante adquiere una etiqueta de 6 histidinas (His-tag) en el extremo amino terminal, la cual permite la purificación de la

proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Las proteínas recombinantes se expresaron en las cepas de *E. coli* XL1-Blue o BL21-CodonPlus(DE3)RIL mediante la inducción con IPTG, utilizando la primera cepa para el plásmido pQE30 y la segunda para el caso de los vectores pET28a y pET3a. Se estandarizaron las condiciones de tiempo, temperatura, concentración de IPTG para obtener la mayor cantidad posible de las proteínas de interés.

6.3. Lavado de cuerpos de inclusión

Las células se recuperaron por centrifugación y el botón celular se resuspendió en amortiguador de lisis, las células se rompieron por ultrasonido y la fracción insoluble se separó por centrifugación (12000 xg/10 min), posteriormente se realizó la búsqueda de proteína recombinante en la fracción soluble celular mediante inmunorréplicas tipo Western (se describe como ejemplo, lo realizado con la subunidad Asa4).

Para corroborar que las subunidades recombinantes se encuentran agregadas debido a la formación de cuerpos de inclusión (CI) durante la expresión y no a una agregación de la proteína durante la lisis celular, el rompimiento celular se llevó a cabo para la subunidad Asa4 con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 M de NaCl y se analizó la distribución de la subunidad en la fracción soluble e insoluble mediante inmunoréplica tipo Western. Por otro lado, muestras de la fracción insoluble obtenida a 0.5 M de NaCl se resuspendieron en amortiguador conteniendo concentraciones crecientes (1-50%) de Triton X-100 y posteriormente los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación.

Una vez corroborada la formación de cuerpos de inclusión para la subunidad Asa4, se observó que esto ocurrió también para casi todas las proteínas que se sobreexpresaron. El resto de las proteínas expresadas se encontraron también en la fracción insoluble celular muy posiblemente alojadas en cuerpos de inclusión (CI). Sin embargo, se decidió llevar a cabo su purificación a partir de ellos. Las células se rompieron por ultrasonido y la fracción insoluble se separó por centrifugación. Esta fracción se encuentra enriquecida por los cuerpos de inclusión conteniendo mayoritariamente a la proteína inducida (CI crudos). Como primer paso de purificación los cuerpos de inclusión se enriquecieron mediante

lavados con 5% de Triton X-100 seguidos de lavados con agua.

6.4. Purificación de las subunidades recombinantes

Una vez enriquecidos, los CI se solubilizaron en un amortiguador conteniendo 8.0 M de urea. Se eliminó el material no disuelto por centrifugación y a partir de esta solución se efectuó la purificación de cada subunidad o fragmento de acuerdo con lo indicado en la Tabla 2.

Tabla 2. Metodología utilizada para purificación de las subunidades recombinantes

Subunidad/ Fragmento	pQE30 (+HisTag)	pET28a (+HisTag)	pET3a (-HisTag)
Asa1	—	Af (r)	NR
Asa2	NE	Af (r)	IE (a)
Asa4	Af (r)/IE	Af (r)/IE	IE (a)/IE (a)
OSCP	NE	Af (d)	IE (c)
Asa7	NE	Af (d)	NR
Asa8	Af (d)	—	—
Asa4-N	—	Af (d)	NR
Asa4-C	—	Af (d)	NR
Asa7-N	—	Af (d)	—
Asa7-C	—	Af (d)	—
OSCP-N	—	Af (d)	—
Ext-Beta	—	Af (n)/IE	—

Af: Cromatografía de afinidad a Ni²⁺, (r) Replegado, (d) Condiciones desnaturalizantes, (n) Condiciones nativas, IE: Cromatografía de intercambio iónico (a) aniónico, (c) catiónico, NR: No realizado, NE: No expresado.

6.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP

Muestras de las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP purificadas se cargaron en un gel desnaturalizante con azul de Coomassie en el amortiguador de cátodo, con el fin de visualizar directamente las bandas de interés una vez terminada la migración electroforética de las proteínas en el gel. Las bandas correspondientes a cada subunidad se cortaron y se molieron en TBS, se tomaron alícuotas y se guardaron a -20 °C. Se inmunizaron conejos hembras intramuscularmente, con una mezcla de la proteína con adyuvante completo de Freund (1:1), seguido de tres refuerzos de la muestra mezclada con adyuvante incompleto de Freund (1:1) cada 3 semanas. La presencia de anticuerpos contra las subunidades se corroboró mediante inmunorrélicas tipo Western utilizando el suero del conejo para

decorar a la ATP sintasa purificada. Una vez corroborada la presencia de anticuerpos específicos, las inmunoglobulinas se enriquecieron a partir del suero mediante precipitación con sulfato de amonio. Los anticuerpos se guardaron en alícuotas pequeñas a -70°C hasta su uso.

6.6. Estudio de interacción de las subunidades recombinantes por métodos bioquímicos

Con las proteínas purificadas se llevaron a cabo ensayos de interacción con las proteínas completas, con sus fragmentos y con la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp.

6.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH

Como un acercamiento para detectar posibles interacciones subunidad-subunidad, se prepararon cuerpos de inclusión lavados de cada una de las proteínas. Se ajustó la concentración de cada subunidad a 0.1 mM basado en la cuantificación de proteína. Se prepararon mezclas con 2 nanomoles de cada subunidad y se llevaron a 220 µL con amortiguador contenido 8.0 M de urea. Las muestras se dializaron a 4°C contra 250 mL de diferentes amortiguadores a 6 distintos pHs, empleando fosfatos (pH 2), acetatos (pH 4), Mes (pH 6), MOPS (pH 7), Tris (pH 8) y CAPS (pH 10) a una concentración de 20 mM y NaCl a 500 mM. Las muestras se centrifugaron a 18000 *xg* durante 10 minutos y las fracciones soluble e insoluble de cada una se analizaron por separado en SDS-PAGE.

6.6.2. Inmunorréplica tipo Far-Western

El complejo V aislado de *Polytomella* sp. y las subunidades purificadas se sometieron a una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, posteriormente las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los carriles con complejo V se incubaron con concentraciones crecientes de las subunidades purificadas en el amortiguador correspondiente para cada una. Finalmente la membrana se decoró con anticuerpos específicos para cada subunidad con la que se incubó previamente la membrana (Figura 13).

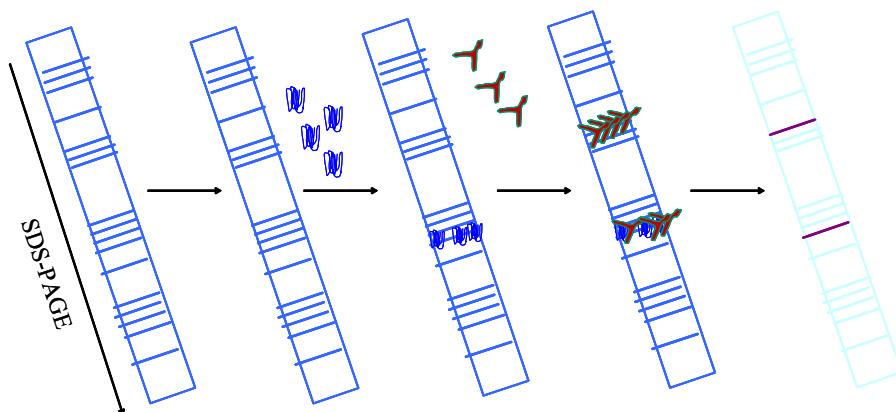


Figura 13. Esquema de la Inumorréplica tipo Far-Western. La ATP sintasa se separó en un gel SDS y se transfirió a una membrana, posteriormente se incubó con una subunidad recombinante y finalmente la membrana se decoró con anticuerpos específicos contra la subunidad recombinante con la cual se incubó la membrana.

6.6.3. Generación de subcomplejos en geles azules nativos

Interacción de las subunidades Asa4 y Asa7

La asociación entre las subunidades Asa4/Asa7 se detectó utilizando las dos metodologías descritas anteriormente. Para corroborar dicha interacción y descartar la influencia de alguna proteína bacteriana presente en los CI lavados, se llevaron a cabo los ensayos de replegamiento y estabilidad al pH utilizando las subunidades purificadas. Por otro lado, se efectuó un ensayo de inmunorréplica tipo Far-Western utilizando los fragmentos amino y carboxilo de la subunidad Asa4. Cabe mencionar que no fue posible efectuar el ensayo utilizando los fragmentos amino y carboxilo de la subunidad Asa7 debido a que el anticuerpo que reconoce Asa7 se produjo utilizando al fragmento Asa7-C como inmunógeno. Por último, se estandarizó una tercera metodología para corroborar dicha interacción basada en electroforesis azul nativa (BN-PAGE).

Como un primer acercamiento se realizó un BN-PAGE con gradiente de 4-12% de acrilamida y se observó el comportamiento de la subunidad Asa4 purificada/replegada y con adición de agentes desnaturalizantes (SDS), reductores (DTT) y temperatura (94°C/5

min). Con base en estos resultados se decidió utilizar BN-PAGE sin gradiente a una concentración de 12 ó 14% dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar.

Muestras equimolares de las subunidades Asa4 y Asa7 completas y sus fragmentos purificados fueron desnaturizados con SDS y temperatura (94°C) en presencia de DTT, ácido ϵ -amino caproico y azul de Coomassie G. Inmediatamente se realizó una electroforesis azul nativa que permitió el replegamiento y la asociación entre las subunidades para formar subcomplejos durante la electroforesis. Una vez transcurrida la separación en el gel nativo, la banda de interés se transfirió a una electroforesis de segunda dimensión desnaturizante para separar las subunidades del subcomplejo formado (Figura 14).

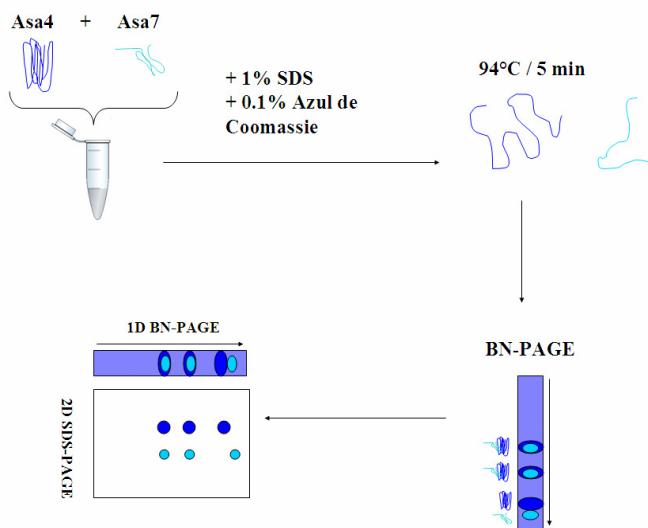


Figura 14. Esquema de la generación de subcomplejos en geles azules nativos. Las subunidades son desnaturizadas por temperatura en presencia de SDS y azul de Coomassie, posteriormente son replegadas mediante BN-PAGE y finalmente los subcomplejos formados son separados en las subunidades correspondientes en una 2D-SDS-PAGE.

6.6.4. Purificación del complejo Asa2/Asa4/Asa7 estable

Interacción de las subunidades Asa4, Asa7 y Asa2

Una vez corroborada la interacción Asa4/Asa7 y tomando en cuenta las asociaciones observadas en los estudios de replegamiento y estabilidad al pH junto con las

inmunorrélicas tipo Far-Western descritas en los puntos 6a y 6b, así como resultados de copurificación mediante cromatografía de afinidad de las subunidades y fragmentos (Cano-Estrada, 2012), se exploró la posible asociación de la subunidad Asa2 formando un complejo estable con las subunidades Asa4 y Asa7. Para esto se utilizaron dos estrategias distintas: cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.

6.6.4.1. Cromatografía de exclusión molecular

Cinco miligramos de las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 purificadas se mezclaron en 1.3 mL (volumen final) de amortiguador contenido 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 2% glicerol, 50 mM ácido ϵ -aminocaproico, 0.25 M urea, 1 mM DTT, 0.25 mM EDTA y 0.05% Tween 20. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó para eliminar el material agregado (18000 xg/10 min). La muestra clarificada se concentró en un Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit (Millipore) hasta 100 μ L y se inyectó a una columna Superose 12 10/300 (24 mL) para FPLC equilibrada con el mismo amortiguador conectada a un ÄKTA monitor UPC-900 Workstation (GE Healthcare Life Sciences).

6.6.4.2. Cromatografía de afinidad

Las subunidades Asa4 y Asa7 purificadas (10 mg de cada una), la última con una etiqueta de histidinas, se mezclaron y se dializaron juntas para permitir el replegado de la subunidad Asa7 y la asociación de ambas. Después de eliminar el material no soluble por centrifugación, la muestra se cargó a una matriz de Ni-Sefarosa permitiendo la unión del complejo y la eliminación por lavado del exceso de la subunidad ASA4 libre. El subcomplejo Asa4/Asa7 se separó de la matriz cromatográfica con una concentración alta de imidazol (500 mM) y posteriormente se dializó junto con la subunidad Asa2 purificada (38 mg) para eliminar el imidazol presente y permitir la unión de la subunidad Asa2. Una vez eliminado el material no disuelto, la muestra se unió a una columna Histrap FF (1mL) la cual se lavó para eliminar las subunidades no unidas y después se eluyó al aplicar un gradiente de imidazol. Las fracciones que contenían el subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 se identificaron mediante electroforesis desnaturizante.

6.6.4.3. Estequiometría del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7

Cantidades crecientes de ATP sintasa así como de la subunidad Asa7 recombinante (pET28a) purificadas se separaron en electroforesis desnaturizante. El gel se teñió con azul de Coomassie. La imagen del gel se digitalizó utilizando un equipo GEL-Chemiluminescent Scanner System (Bio-Rad) y el análisis de densitometría se realizó utilizando el programa GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/index.html>). Los datos se representaron gráficamente en área contra pmoles y se ajustaron a una función lineal. Cada fracción correspondiente a la coelución del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 de cromatografía de afinidad se separó en un gel desnaturizante y el valor densitométrico de cada banda se interpoló a la función lineal correspondiente, obtenida de la ATP sintasa (Asa2 y Asa4) y la proteína recombinante purificada (Asa7).

6.6.4.4. Modelaje *in silico* de las subunidades Asa2, Asa4, Asa7 y posible estructura en el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp (En colaboración con el Dr. Lenin Domínguez-Ramírez de la Universidad Autónoma Metropolitana).

Modelos *in silico* de las subunidades Asa2 y Asa4 se realizaron en el servidor Robetta (<http://robbetta.bakerlab.org>) de la Universidad de Washington. En este servidor la secuencia es fragmentada inicialmente en pequeños “dominios” mediante un protocolo de predicción denominado Ginzu. Los “dominios” obtenidos son alineados con secuencias depositadas en el Protein Data Bank (PDB) a fin de poder modelar por homología de secuencia con las estructuras reportadas. En caso de que la secuencia no presente similitud con secuencias dentro del PDB se realiza un modelado *ab initio* de estos dominios. Por su parte, el modelaje *in silico* de la subunidad Asa7 se efectuó con el algoritmo Quarck del servidor Zhang lab de la Universidad de Michigan (<http://zhanglab.ccmb.umich.edu/Quark/>). Este algoritmo permite el modelado *ab initio* de péptidos pequeños mediante una simulación replica-intercambio de Monte Carlo. Se seleccionaron los modelos que presentaban una estructura alargada como es de esperarse en el brazo periférico de la ATP sintasa. La adición de cargas y átomos de hidrógenos, así como la minimización de energía se llevó a cabo mediante el algoritmo *ff99SB forcefield* de la suite UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Este paso es importante para obtener un volumen tridimensional completo de la estructura modelada, así como sus cargas superficiales, para

realizar la predicción de acoplamiento. Esta última predicción se elaboró en el servidor Vakser Lab de la Universidad de Kansas (<http://Vakser.bioinformatics.Ku.edu/resources/gramm/grammx/>). En un primer paso se realizó el acoplamiento de las subunidades Asa4 y Asa7; de los modelos resultantes se seleccionaron aquellos que mostraban concordancia con los resultados bioquímicos obtenidos hasta el momento (interacción mediada por los extremos carboxilos de ambas subunidades). Posteriormente, se utilizó este modelo del complejo Asa4 y Asa7 para realizar el acoplamiento con el modelo seleccionado para la subunidad Asa2. El modelo final se seleccionó en concordancia con los datos experimentales.

7. Resultados

7.1. Amplificación de los cDNA de las subunidades ASA y clonación en vectores de expresión

Se obtuvieron los amplicones correspondientes a las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7, Asa8 y OSCP, los cuales se clonaron en el vector pGEM-T Easy. La secuenciación de estos amplicones confirmó la secuencia de cada subunidad. A partir de esta primera construcción, se amplificaron las secuencias codificantes para los fragmentos Asa4-N, Asa4-C, Asa7-N y Asa7-C, los cuales se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Los insertos secuenciados en el vector pGEM-T Easy se subclonaron en los vectores pQE30, pET28a y pET3a. Las inserciones correctas en cada vector se corroboraron secuenciando cada plásmido.

7.2. Expresión de las proteínas ASA recombinantes en *E. coli*.

Las subunidades Asa2, Asa7 y OSCP no fueron detectables en los extractos totales bacterianos utilizando el sistema de expresión pQE30 en la cepa XL1-Blue, mientras que las subunidades Asa4 y Asa8 se acumularon fuertemente en dichas condiciones (Figura 15). Por otro lado, las subunidades Asa2, OSCP y Asa7 se acumularon fuertemente con el sistema pET28a en la cepa BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Por lo anterior se decidió utilizar los vectores pET en dicha cepa para la expresión del resto de las subunidades y sus fragmentos.

Los productos esperados y la expresión de las subunidades recombinantes mediante inducción con IPTG se muestran en la Tabla 3 y Figura 16 respectivamente. Todas las subunidades sobreexpresadas formaron cuerpos de inclusión dentro de la bacteria, por lo que se utilizaron las condiciones para favorecer la formación de éstos durante la inducción.

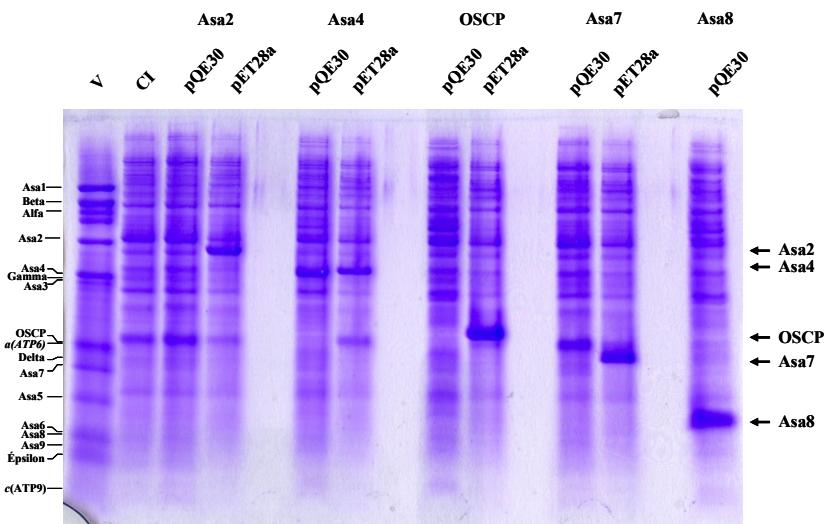


Figura 15. Comparación de las subunidades Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8 recombinantes en dos sistemas de expresión en *E. coli*. Gel SDS-PAGE de los extractos totales bacterianos después de inducir en las mismas condiciones con IPTG en los sistemas pQE30 (cepa XL1-Blue) y pET28a (cepa BL21-CodonPlus(DE3)RIL). Las flechas a la derecha indican la subunidad recombinante correspondiente. V: Complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. A la izquierda se indica la identidad de cada subunidad de la ATP sintasa purificada. CI: Cepa inducida.

Tabla 3. Productos esperados de la expresión de la subunidades Asa mediante 3 sistemas de expresión y nomenclatura utilizada.

Número	Proteína	Vector	Masa molecular esperada (kDa)	Nomenclatura
1	Asa1	pET28a	62	Asa1 28a
2	Asa1	pET28a (NcoI)	60	Asa1 s/e
3	Asa2	pET28a	40	Asa2 28a
4	Asa2	pET3a	38	Asa2 3a
5	Asa4	pET28a	35	Asa4 28a
6	Asa4	pQE30	33	Asa4 pQ
7	Asa4	pET3a	32	Asa4 3a
8	OSCP	pET28a	27	OSCP 28a
9	OSCP	pET3a	25	OSCP 3a
10	Asa7	pET28a	23	Asa7 28a
11	Asa7	pET3a	21	Asa7 3a
12	Asa8	pQE30	11	Asa8 pQ
13	Asa4-N	pET28a	16	Asa4-N 28a
14	Asa4-N	pET3a	14	Asa4-N 3a
15	Asa4-C	pET28a	14	Asa4-C 28a
16	Asa4-C	pET3a	12	Asa4-C 3a
17	Asa7-N	pET28a	7	Asa7-N 28a
18	Asa7-C	pET28a	10	Asa7-C 28a
19	OSCP-N	pET28a	10	OSCP-N 28a
20	Ext-Beta	pET28a	11	Ext-beta 28a

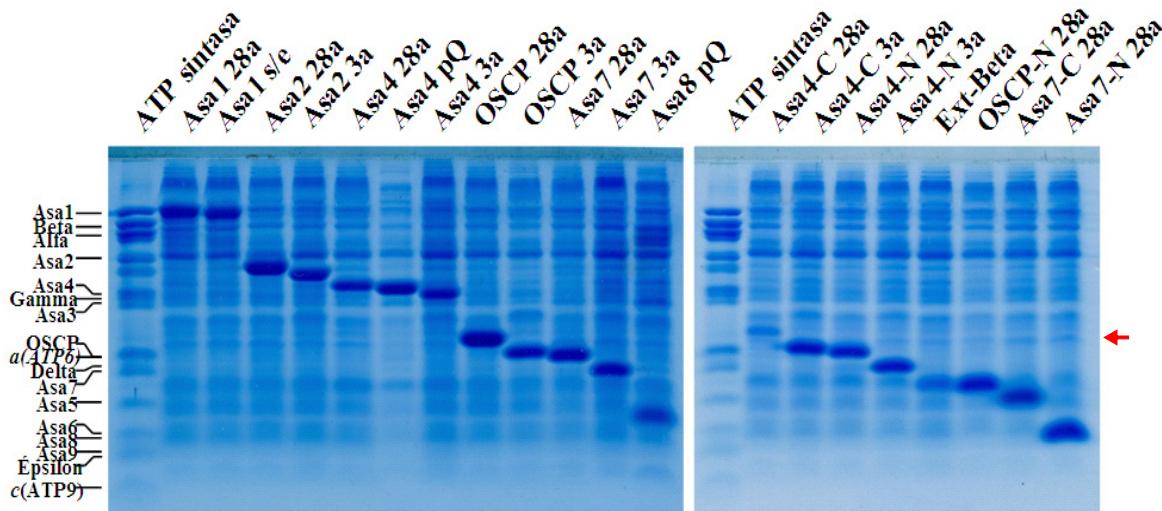


Figura 16. Sobreexpresión en *E. coli* de algunas subunidades del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp así como fragmentos de las subunidades Asa4, Asa7, OSCP y beta utilizando tres sistemas de expresión. Gel SDS-PAGE de los extractos totales bacterianos después de inducción con IPTG. La banda mayoritaria en cada carril corresponde a la subunidad recombinante excepto en el caso del fragmento Asa4-C 28a que se indica con una flecha roja a la derecha. Las diferencias con respecto a las subunidades presentes en el complejo V purificado (línea 1) son debidas a la presencia de una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal en el caso de los sistemas pQE30 y pET28a. La subunidad Asa2 presenta una menor masa molecular debido a la carencia de residuos en los extremos amino (25) y carboxilo (39). La nomenclatura utilizada para cada subunidad es la indicada en la Tabla 3, a la izquierda se indica la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa purificada.

7.3. Lavado de cuerpos de inclusión

Al realizar la lisis del cultivo con la subunidad Asa4 sobreexpresada, la acumulación de subunidad recombinante se encontró mayoritariamente en la fracción insoluble, independientemente de la concentración de NaCl utilizada, solamente se detectó una pequeña cantidad de proteína soluble mediante inmunorréplica tipo Western (Figura 17). La proteína agregada es resistente a lavados con Triton X-100 utilizando concentraciones entre 1 y 50% (v/v) del detergente en el mismo amortiguador (Figura 18). Por lo anterior, los cuerpos de inclusión obtenidos para cada subunidad y fragmento expresado se lavaron con Triton X-100 seguido con lavados de agua a fin de enriquecerlos. Un ejemplo del enriquecimiento mediante el lavado de los cuerpos de inclusión se muestra en la Figura 19.

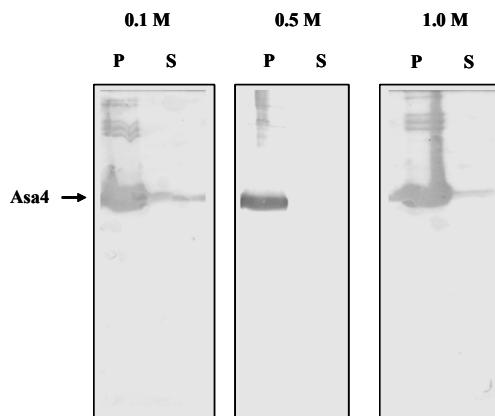


Figura 17. Distribución de la subunidad Asa4 recombinante en la fracción soluble e insoluble utilizando distintas fuerzas iónica durante la lisis celular. Inmunorréplica tipo Western de las fracciones soluble (S) e insoluble (P) obtenidas a distintas fuerzas iónicas durante la lisis celular. La flecha señala la subunidad Asa4 recombinante y se indica la concentración de NaCl en el amortiguador de lisis.

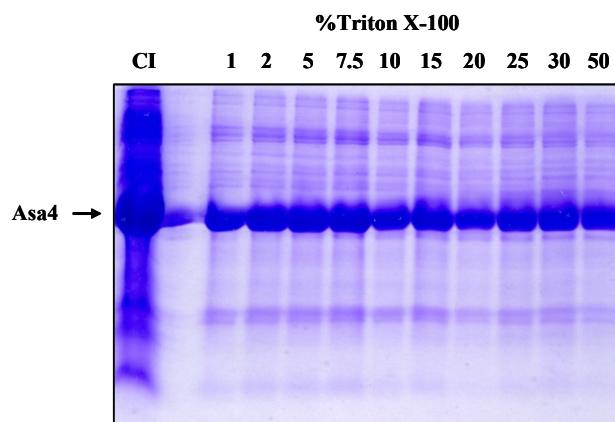


Figura 18. Lavado de los cuerpos de inclusión de la subunidad Asa4 con concentraciones crecientes de Triton X-100. Gel SDS-PAGE de los cuerpos de inclusión recuperados luego del lavado con distintas concentraciones de Triton X-100. La flecha indica la subunidad Asa4 recombinante. Los números indican la concentración del detergente utilizada en el amortiguador de lavado (% v/v).

7.4. Purificación de las subunidades recombinantes

Los protocolos de purificación se estandarizaron para cada subunidad (Anexo I), el protocolo de purificación permitió a su vez el replegamiento de las subunidades Asa1, Asa2, Asa4 y OSCP, mientras que las subunidades Asa7 y Asa8, así como los fragmentos Asa4-N, Asa4-C, Asa7-N, Asa7-C y OSCP₁₂₀ se purificaron en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas recombinantes aisladas se muestran en la Figura 20.

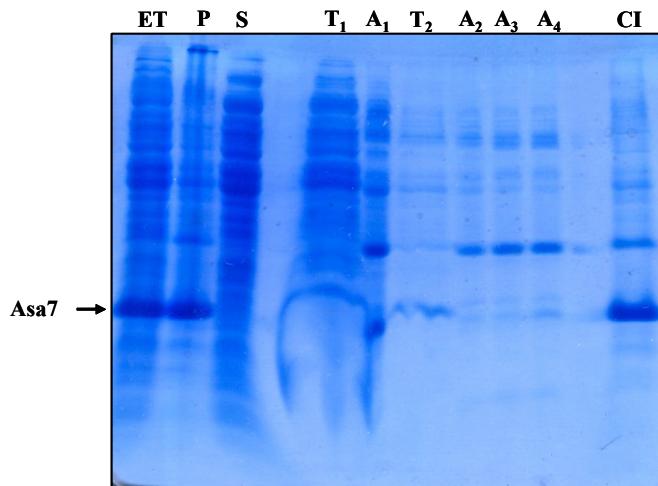


Figura 19. Lavado de cuerpos de inclusión de la subunidad Asa7 con Triton X-100 y con agua. Gel SDS-PAGE del extracto total bacteriano (ET) fracciones soluble (S) e insoluble (P) así como de muestras del sobrenadante en los lavados con Triton X-100 (T₁ y T₂) y agua (A₁ - 4), CI: patrón electroforético de los cuerpos de inclusión lavados (CI).

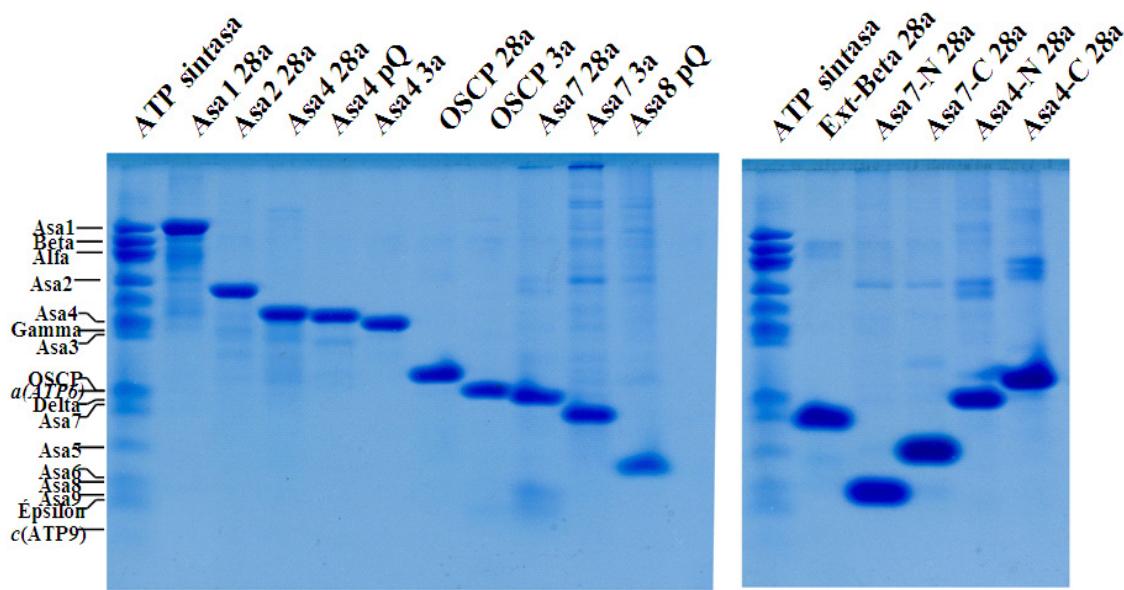


Figura 20. Purificación de las subunidades y fragmentos recombinantes del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Gel SDS-PAGE con 3 µg de las subunidades completas y 5 µg de los fragmentos de las subunidades Asa4, Asa7, OSCP y beta. Las diferencias con respecto a las subunidades presentes en el complejo V purificado (línea 1) son debidas a la presencia de una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal en el caso de los sistemas pQE30 y pET28a. La subunidad Asa2 presenta una menor masa molecular debido a la carencia de residuos en los extremos amino (25 residuos) y carboxilo (39 residuos). La nomenclatura utilizada para cada subunidad es la indicada en la Tabla 3, las flechas indican la identidad de cada subunidad de la ATP sintasa purificada.

7.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP

Los anticuerpos policlonales producidos en conejo contra las subunidades Asa2, Asa7 y OSCP reconocieron específicamente tanto a la proteína recombinante purificada como a la subunidad presente en el complejo V mitocondrial. En la Figura 21 se muestran inmunorréplicas tipo Western reveladas con los anticuerpos utilizados que reconocen tanto a las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8 presentes en la ATP sintasa purificada como a cada subunidad recombinante correspondiente.

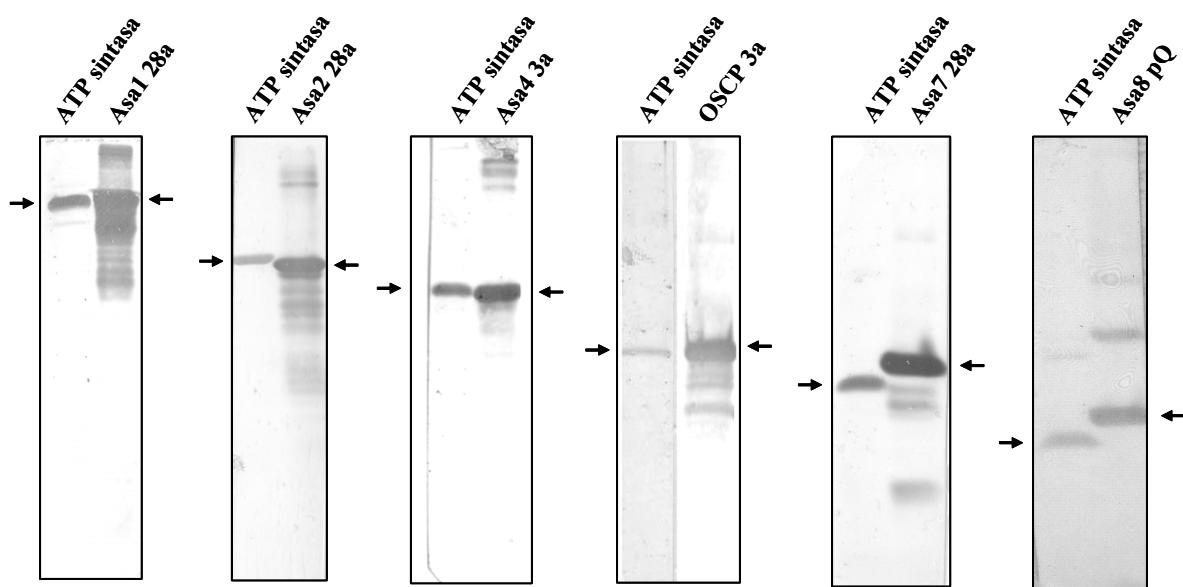


Figura 21. Inmunorréplicas tipo Western reveladas con los anticuerpos obtenidos para las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8 de *Polytomella* sp. Se cargaron en el carril 25 µg de complejo V mitocondrial y 3 µg de la subunidad recombinante purificada. La nomenclatura utilizada para cada subunidad es la indicada en la Tabla 3, las flechas a la izquierda y a la derecha indican la subunidad nativa y recombinante respectivamente.

7.6. Estudio de interacción entre subunidades por métodos bioquímicos

7.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH

La Figura 22 muestra la estabilidad de cada subunidad respecto al pH. Una de las propiedades seguidas en la estabilidad de las proteínas fue la capacidad de mantenerse en solución al retirar el agente desnaturalizante. Las subunidades Asa2 y Asa4 mostraron una estabilidad dependiente de pH. En estos estudios las subunidades que se asocian deben presentar un patrón distinto de estabilidad con respecto a los controles con las subunidades aisladas. En las Figuras 23-28 se muestran este tipo de pruebas para cada combinación de subunidades. Para el caso de Asa1 no fue posible detectar ningún cambio con respecto al

comportamiento de los controles (Figura 23), es decir, la presencia de otra subunidad recombinante no modifica el comportamiento de Asa1 a ninguno de los pHs probados. Al utilizar a la subunidad Asa2 (Figura 24) se observa la presencia de las subunidades Asa4 (gel b), OSCP (gel c) y Asa7 (gel d) en la fracción soluble, lo que indica una posible asociación con estas subunidades. En el caso de la subunidad Asa4 (Figura 25) se observa en la fracción soluble a las subunidades Asa2 (gel b) y Asa7 (gel d) en compañía de la subunidad Asa4. Al realizar el experimento con la subunidad OSCP (Figura 26) se observa la presencia de dicha subunidad en la fracción soluble sólo al mezclar con las subunidad Asa2 (gel b) y Asa4 (gel c). Al llevar a cabo el experimento utilizando la subunidad Asa7 (Figura 27), ésta puede detectarse en la fracción soluble cuando se encuentra junto a las subunidades Asa2 (gel b) y Asa4 (gel c). En el caso de la subunidad Asa8 (Figura 28) no fue posible detectar dicha subunidad en la fracción soluble en ninguna de las condiciones probadas. En resumen, las posibles asociaciones que se observan corresponden a los pares de subunidades Asa2/Asa4, Asa2/OSCP, Asa2/Asa7, Asa4/OSCP y Asa4/Asa7.

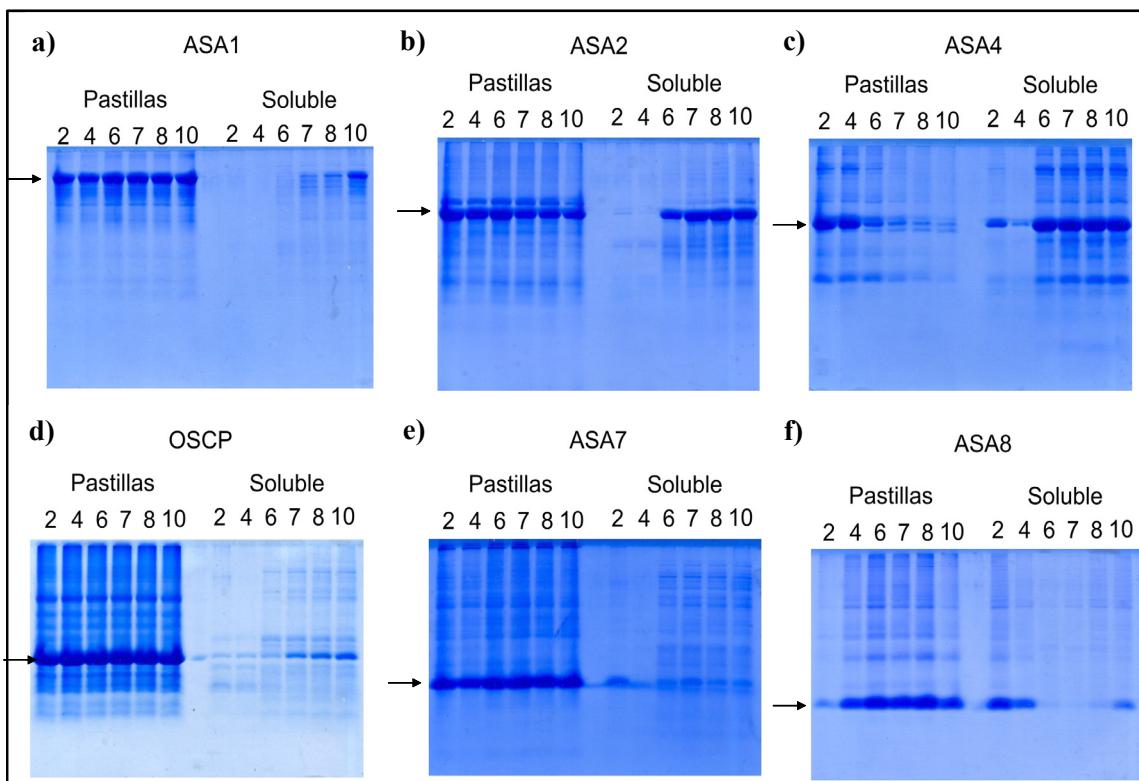


Figura 22. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP, Asa7, Asa8. Dos nanomoles de cada subunidad se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálisis. Las flechas indican cada subunidad y los números indican el valor de pH.

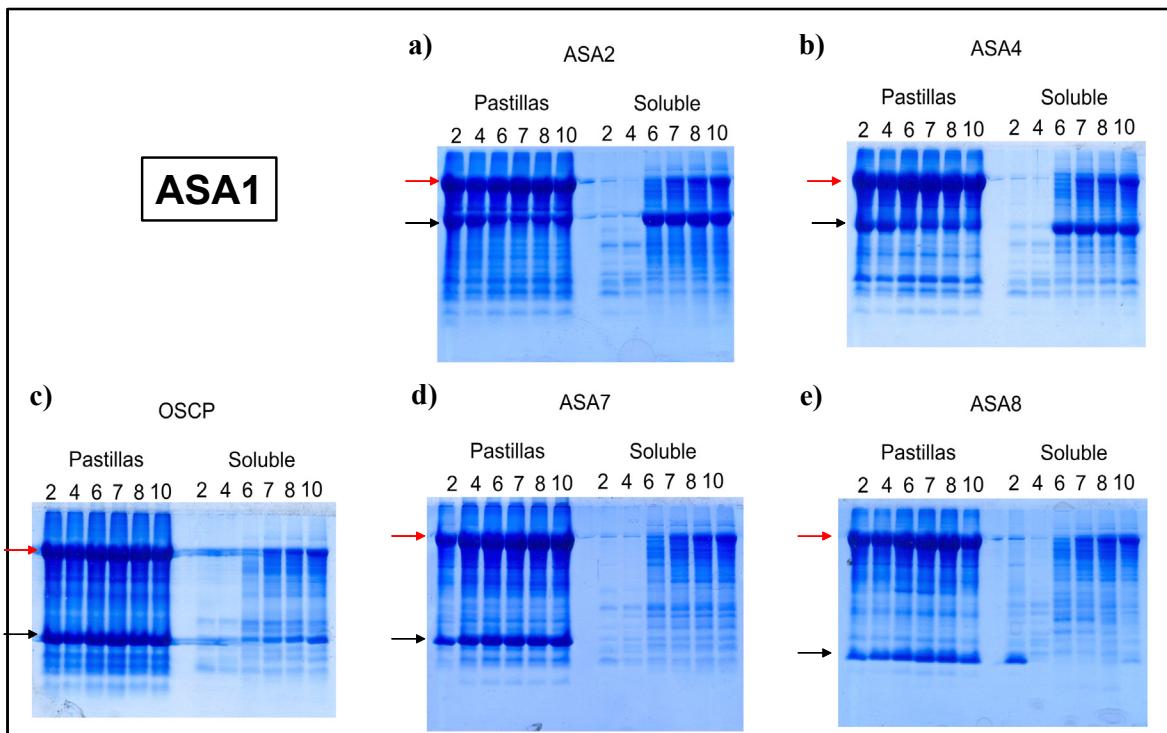


Figura 23. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa1 con las subunidades Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8. Dos nanomoles de cada par de subunidades se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálisis. Las flechas indican cada subunidad (Asa1 en rojo) y los números indican el valor de pH.

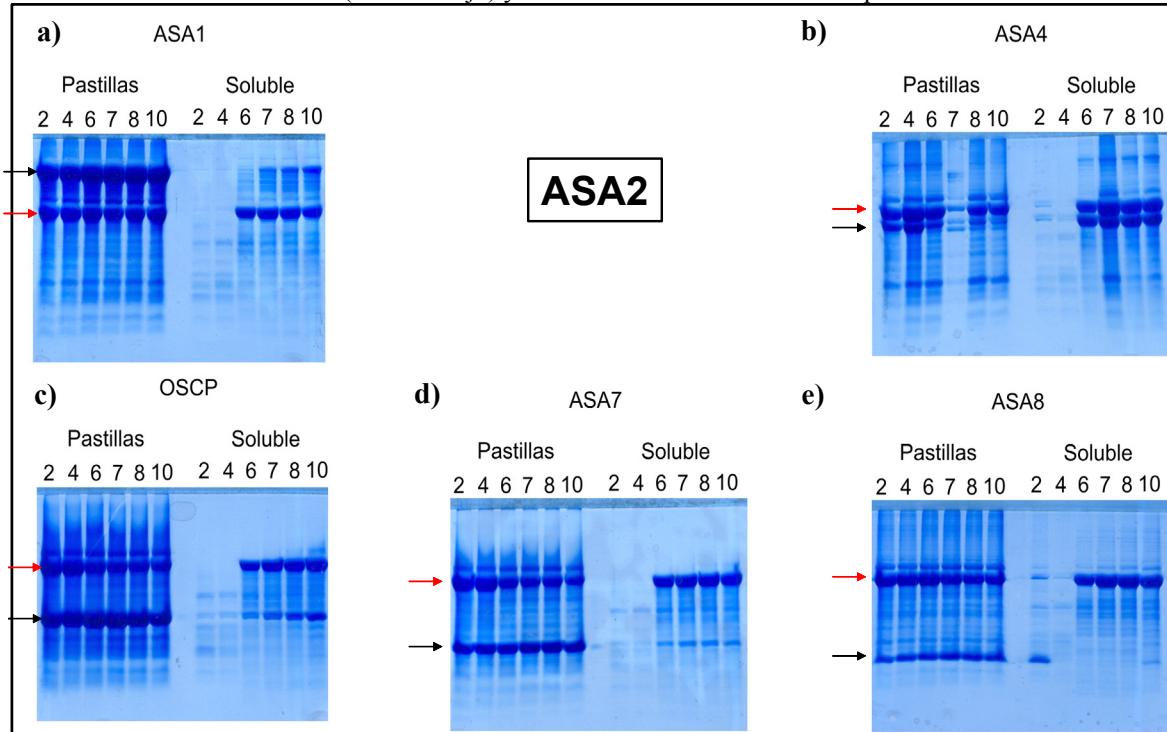


Figura 24. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa2 con las subunidades Asa1, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8. Dos nanomoles de cada par de subunidades se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálisis. Las flechas indican cada subunidad (Asa2 en rojo) y los números indican el valor de pH.

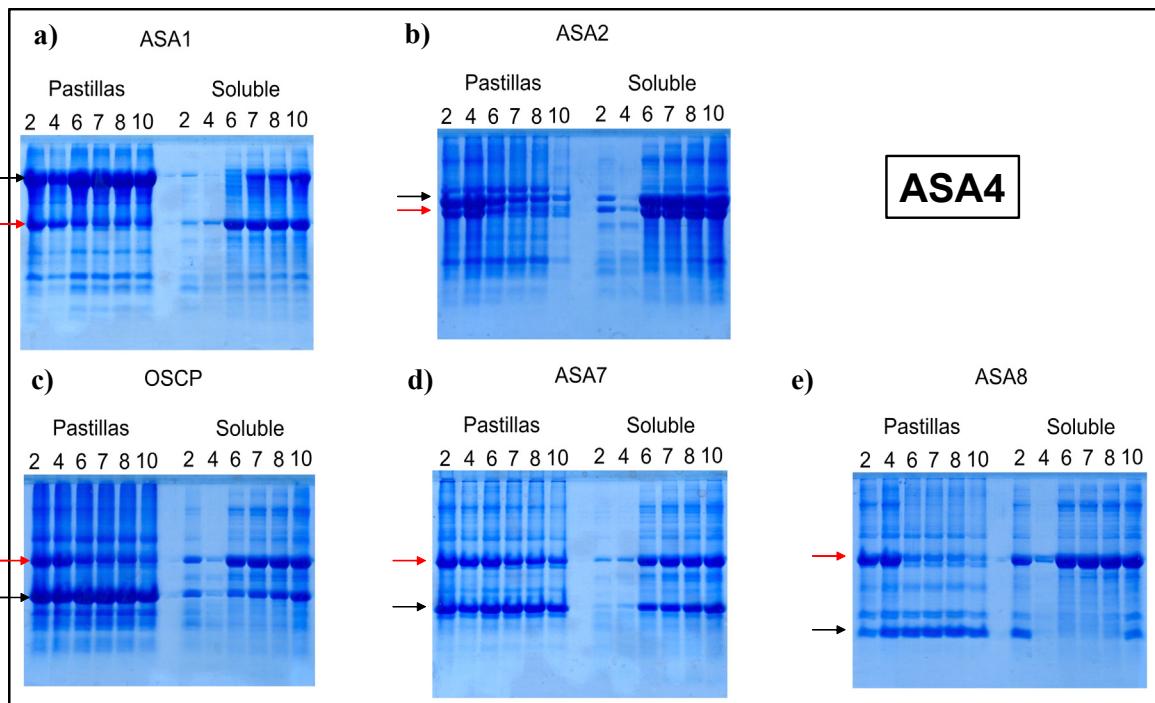


Figura 25. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa4 con las subunidades Asa1, Asa2, OSCP, Asa7 y Asa8. Dos nanomoles de cada par de subunidades se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálsis. Las flechas indican cada subunidad (Asa4 en rojo) y los números indican el valor de pH.

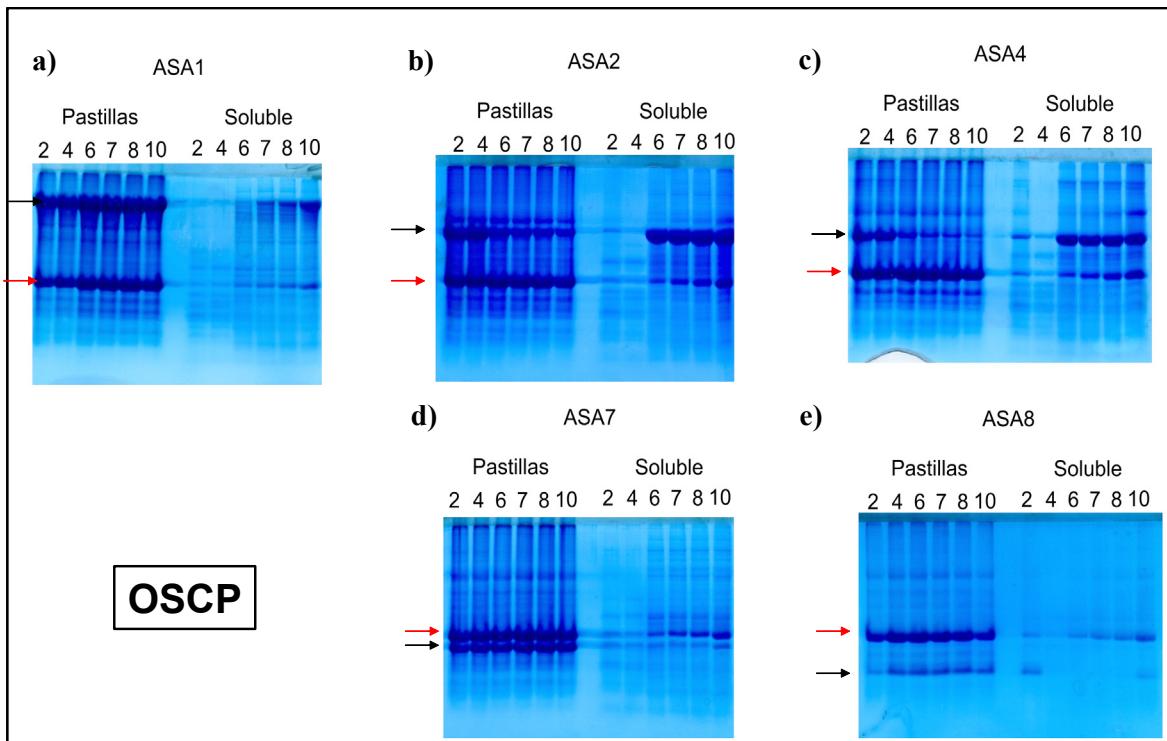


Figura 26. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad OSCP con las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7 y Asa8. Dos nanomoles de cada par de subunidades se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálsis. Las flechas indican cada subunidad (OSCP en rojo) y los números indican el valor de pH.

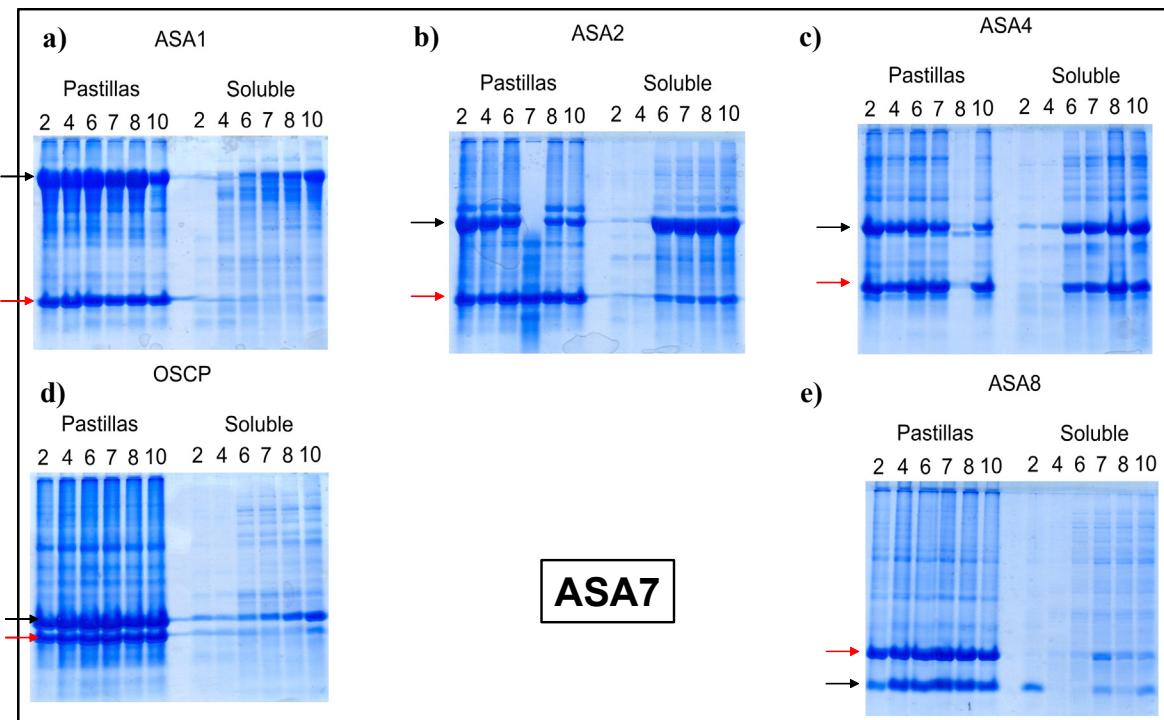


Figura 27. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa7 con las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP y Asa8. Dos nanomoles de cada par de subunidades se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálsis. Las flechas indican cada subunidad (Asa7 en rojo) y los números indican el valor de pH.

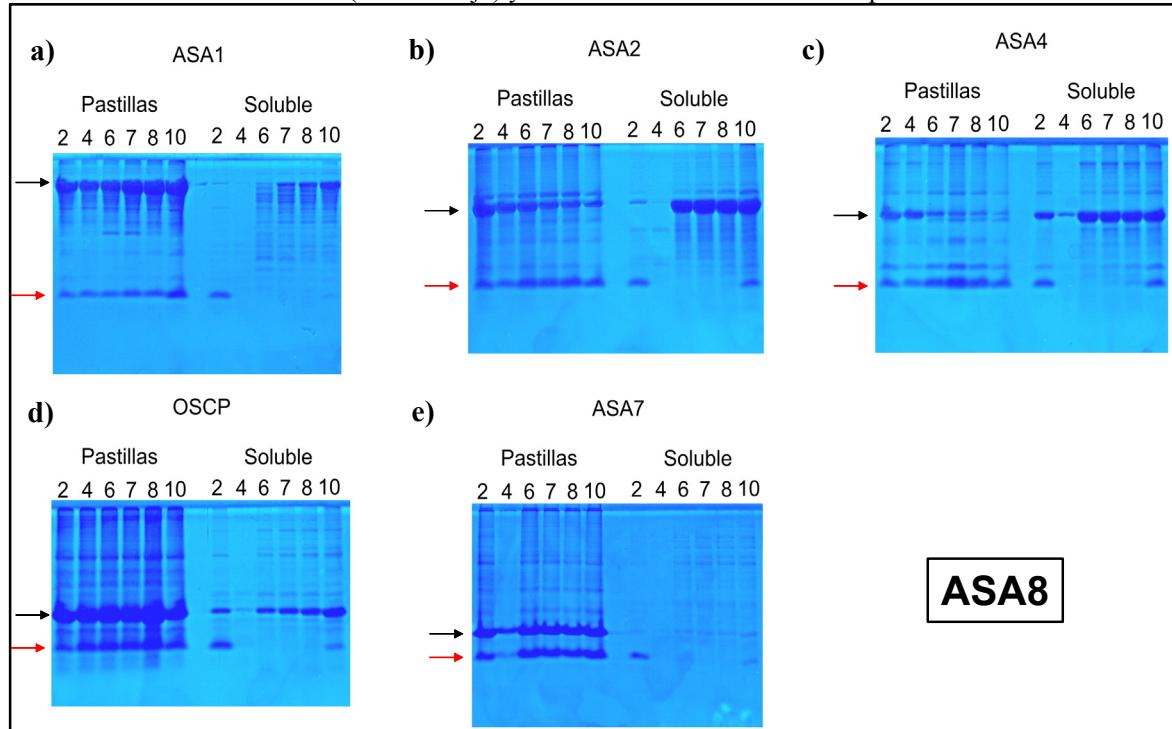


Figura 28. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de la subunidad Asa8 con las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP y Asa7. Dos nanomoles de cada par de subunidades se dializaron a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálsis. Las flechas indican cada subunidad (Asa8 en rojo) y los números indican el valor de pH.

7.6.2. Inmunorréplica tipo Far-Western

Las inmunorréplicas tipo Far-Western de las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, OSCP, Asa7 y Asa8 se muestran en las Figuras 29 a 34. En estos estudios, como es de esperarse, la banda correspondiente a la proteína nativa presente en el complejo V siempre se detectó por el anticuerpo utilizado. En adición a estas bandas, se observan señales en la posición en la cual migran otras subunidades, lo que indica una posible interacción entre las subunidades transferidas a la membrana y la proteína recombinante adicionada externamente en el ensayo. Generalmente, estas bandas adicionales se hacen más evidentes a medida que aumenta la concentración de la proteína con la cual se incubó cada ensayo, indicando también, la posible aparición de interacciones inespecíficas. Las principales interacciones observadas por esta técnica se resumen en la Tabla 4

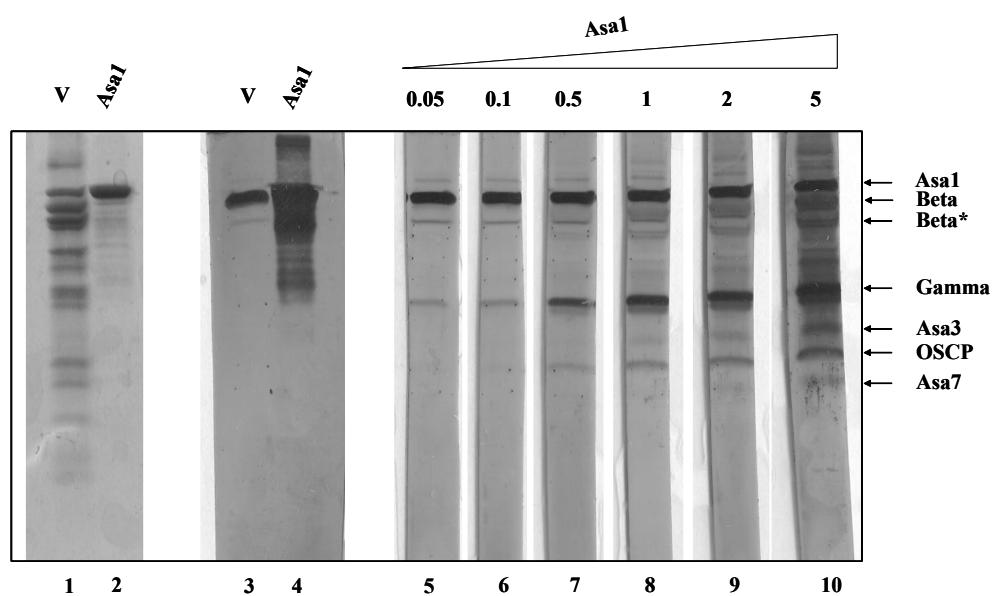


Figura 29. Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa1 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Carriles 1 y 2: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de la subunidad recombinante purificadas. Carriles 3 y 4: Inmumorréplica tipo Western de los carriles 1 y 2 detectada con anticuerpo específico para la subunidad Asa1. Carriles 5 – 10: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Las flechas indican la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa. Beta* indica una degradación de la subunidad beta.. Los números en la parte superior indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo en un volumen de 5 mL finales. Los números en la parte inferior indican los carriles.

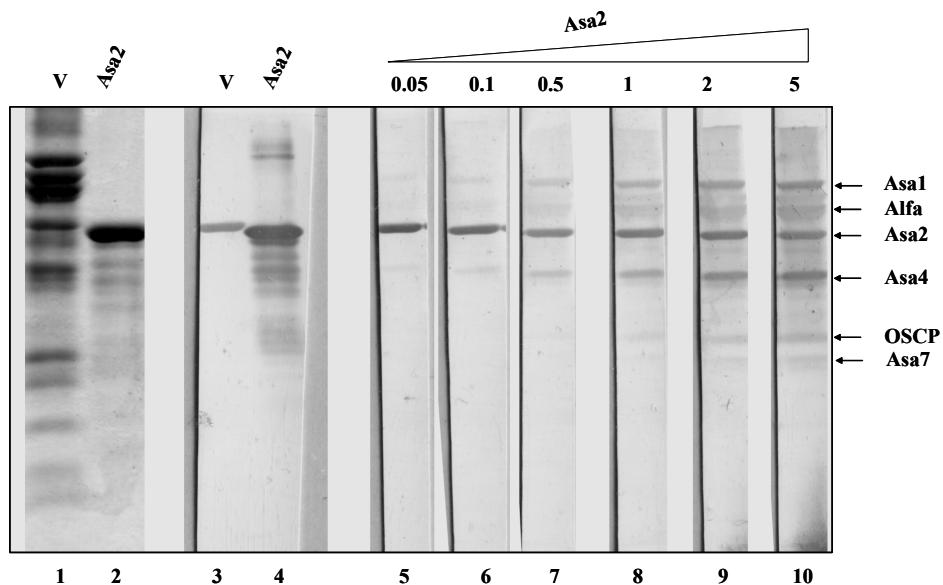


Figura 30. Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa2 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Carriles 1 y 2: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de la subunidad recombinante purificadas. Carriles 3 y 4: Inmumorréplica tipo Western de los carriles 1 y 2 detectada con anticuerpo específico para la subunidad Asa2. Carriles 5 – 10: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Las flechas indican la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa. Los números en la parte superior indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo en un volumen de 5 mL finales. Los números en la parte inferior indican los carriles.

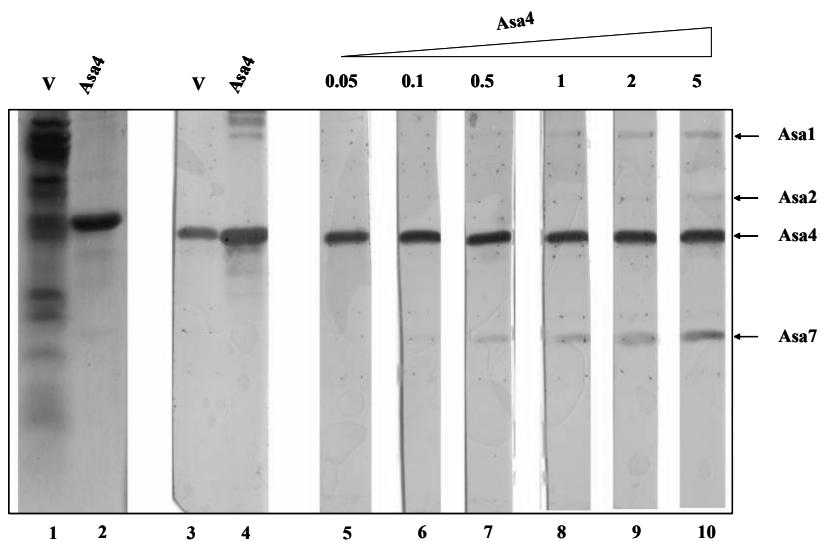


Figura 31. Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa4 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Carriles 1 y 2: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de la subunidad recombinante purificadas. Carriles 3 y 4: Inmumorréplica tipo Western de los carriles 1 y 2 detectada con anticuerpo específico para la subunidad Asa4. Carriles 5 – 10: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Las flechas indican la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa. Los números en la parte superior indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo en un volumen de 5 mL finales. Los números en la parte inferior indican los carriles.

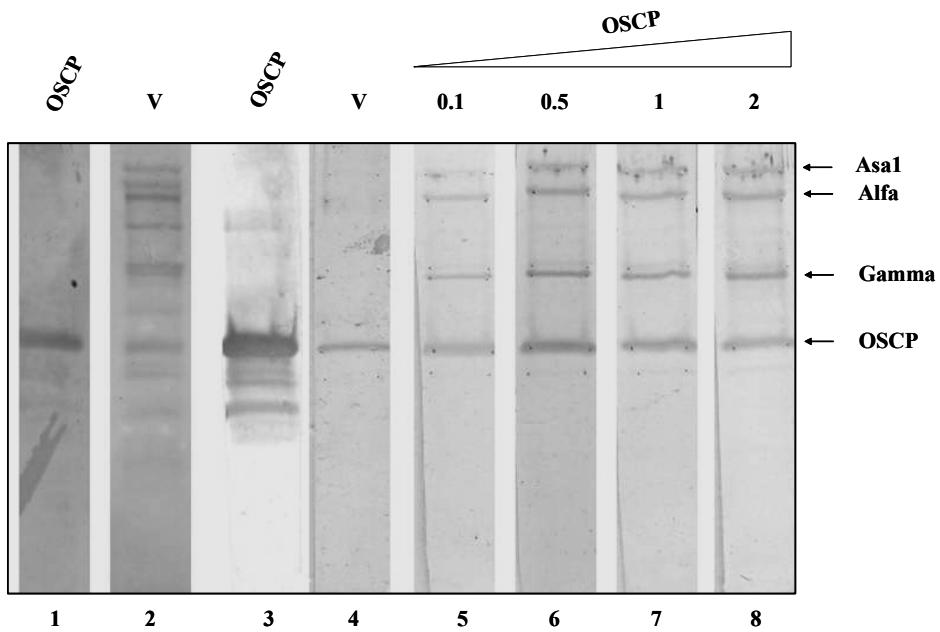


Figura 32. Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad OSCP contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Carriles 1 y 2: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de la subunidad recombinante purificados. Carriles 3 y 4: Inmumorréplica tipo Western de los carriles 1 y 2 detectada con anticuerpo específico para la subunidad OSCP. Carriles 5 – 8: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Las flechas indican la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa. Los números en la parte superior indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo en un volumen de 5 mL finales. Los números en la parte inferior indican los carriles.

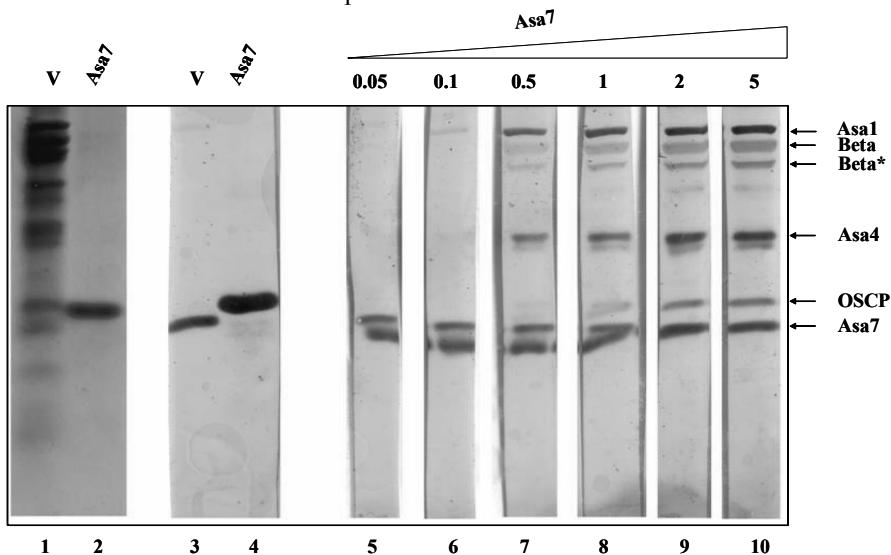


Figura 33. Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa7 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Carriles 1 y 2: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de la subunidad recombinante purificados. Carriles 3 y 4: Inmumorréplica tipo Western de los carriles 1 y 2 detectada con anticuerpo específico para la subunidad Asa7. Carriles 5 – 10: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Las flechas indican la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa. Beta* indica una degradación de la subunidad beta. Los números en la parte superior indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo en un volumen de 5 mL finales. Los números en la parte inferior indican los carriles.

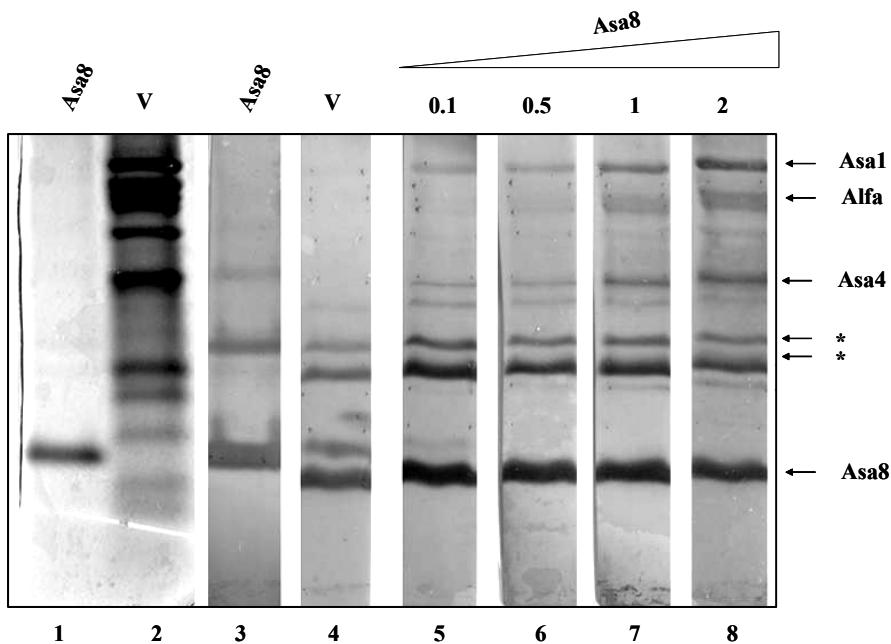


Figura 34. Inmunorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa8 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Carriles 1 y 2: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de la subunidad recombinante purificadas. Carriles 3 y 4: Inmunorréplica tipo Western de los carriles 1 y 2 detectada con anticuerpo específico para la subunidad Asa8. Carriles 5 – 8: Inmunorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Las flechas indican la identidad de cada subunidad en la ATP sintasa. Los números en la parte superior indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo en un volumen de 5 mL finales. Los números en la parte inferior indican los carriles. Se señalan con * bandas de unión inespecífica del anticuerpo contra la subunidad Asa8 utilizado sobre la ATP sintasa purificada.

Tabla 4. Posibles interacciones observadas por Far-Western de las subunidades Asa purificadas contra la ATP sintasa de *Polytomella* sp

Ensayo	Posibles interacciones
Asa1	Beta, Gamma, Asa3, OSCP, Asa7
Asa2	Asa1, Alfa, Asa4, OSCP, Asa7
Asa4	Asa1, Asa2, Asa7
OSCP	Asa1, Alfa, Gamma
Asa7	Asa1, Beta, Asa4, OSCP
Asa8	Asa1, Alfa, Asa4

Para determinar si existe influencia de la etiqueta de histidinas en las posibles asociaciones observadas en este tipo de ensayos, se realizó una inmunorréplica tipo Far Western utilizando la subunidad Asa4 con etiqueta de histidinas (pQE30) y carente de ella (pET3a) (Figura 35). Los resultados indican que no existe una influencia de la etiqueta de histidinas en la unión de Asa4 a las subunidades Asa1 y Asa7 presentes en la membrana.

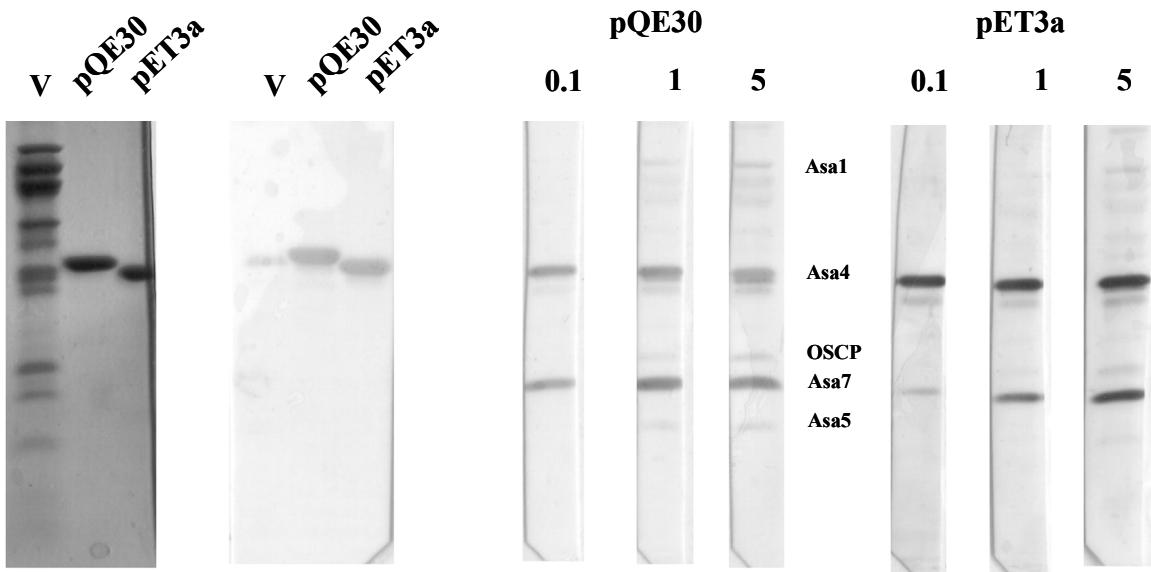


Figura 35. Influencia de la etiqueta de histidinas en la inmumorréplica tipo Far-Western de la subunidad Asa4 contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. Líneas 1 - 3: SDS-Gel teñido con azul de Coomassie con 25 µg de complejo V y 3 µg de las subunidades recombinantes purificados. Líneas 4 - 6: Inmumorréplica tipo Western de los carriles 1 - 3 detectada con anticuerpo específico para la subunidad Asa4. Líneas 7 – 9: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante Asa4 pQ purificada detectada con anticuerpo específico contra la subunidad adicionada. Líneas 10 – 12: Inmumorréplica tipo Far-Western incubada con cantidades crecientes de la subunidad recombinante Asa4 3a purificada detectada con anticuerpo específico para la subunidad adicionada. Los números indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo.

7.6.3. Generación de subcomplejos en geles azules nativos

A fin de hacer un análisis más detallado de la interacción Asa4/Asa7 se realizaron estudios de replegamiento y estabilidad al pH utilizando las subunidades Asa4 y Asa7 purificadas (Figura 36) reproduciendo los resultados obtenidos en el experimento utilizando los cuerpos de inclusión (Figuras 25 y 27). Se observa que Asa7 es poco soluble a los diferentes pHs, pero que en presencia de Asa4 se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble. Por otro lado, se determinó que la interacción de estas subunidades se encuentra mediada por el extremo carboxilo de Asa4 mediante la técnica de Far-Western utilizando los fragmentos purificados incubados con la ATP sintasa mitocondrial (Figura 37). Mientras que el fragmento Asa4-C da una señal clara con la subunidad Asa7, el fragmento Asa4-N prácticamente no reconoce a dicha subunidad.

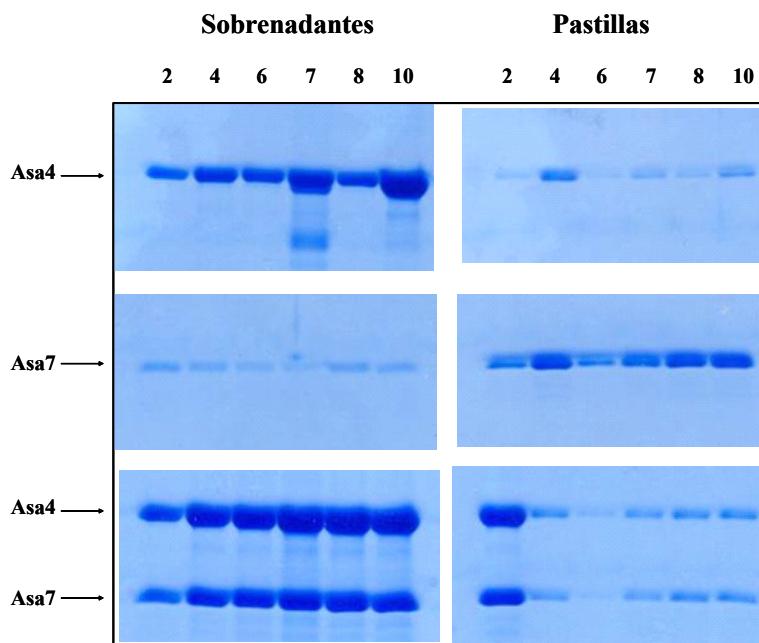


Figura 36. Estudio de replegamiento y estabilidad al pH de las subunidades Asa4 y Asa7. Dos nanomoles de cada subunidad purificada se dializaron juntos a 6 distintos valores de pH, se muestran geles SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble posteriores a la diálisis. Las flechas indican cada subunidad y los números indican el valor de pH.

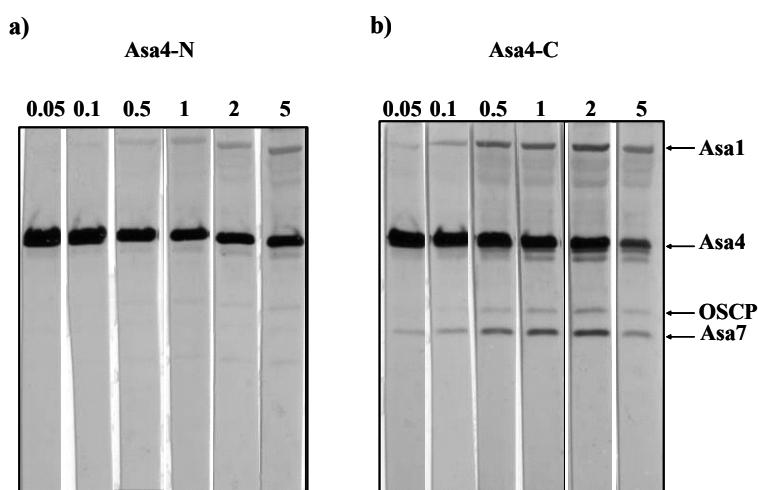


Figura 37. Inmunorréplica tipo Far-Western de los fragmentos Asa4-N y Asa4-C contra la ATP sintasa mitocondrial aislada de *Polytomella* sp. 25 µg de complejo V fueron separados en SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa, las bandas fueron incubadas con cantidades crecientes de los fragmentos Asa4-N (a) y Asa4-C (b) recombinantes purificados y las membranas fueron detectadas con un anticuerpo específico contra la subunidad Asa4. Las flechas indican la identidad de las subunidades en la ATP sintasa. Los números indican la cantidad en nanomoles agregada en el ensayo.

El comportamiento de la subunidad Asa4 en electroforesis azul nativa se muestra en la Figura 38, en donde se puede observar la tendencia de dicha subunidad a formar oligómeros. Estos agregados pueden ser disociados mediante la incubación con DTT. Una vez establecidas las condiciones para la migración del gel se realizó el replegado y asociación de las subunidades Asa4 y Asa7 en este tipo de electroforesis. Las Figuras 39a y 40a muestra la asociación de ambas subunidades en un subcomplejo que puede ser separado en las subunidades que lo constituyen mediante 2D SDS-PAGE. Al realizar este acercamiento utilizando los fragmentos amino y carboxilo de las subunidades se observa que la asociación sólo está presente al utilizar los extremos carboxilos de cada subunidad (Figuras 39c y 40c).

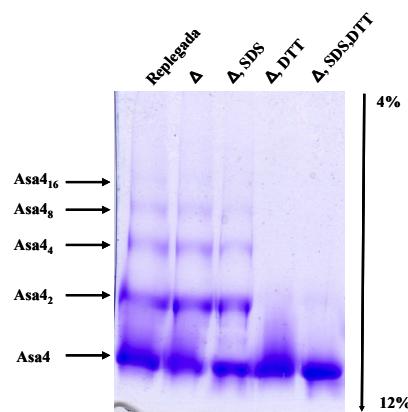


Figura 38. Efecto de la temperatura, SDS, DTT en la migración de la subunidad Asa4 en electroforesis azul nativa. Gel BN-PAGE teñido con azul de Comassie de la subunidad Asa4 incubada en distintas condiciones. Las flechas del lado izquierdo indican la estequiometría de los oligómeros formados. A la derecha se indica el gradiente de poliacrilamida utilizado. Δ: incubación 94°C/5min, SDS: 1% de SDS, DTT: 3 mM de DTT.

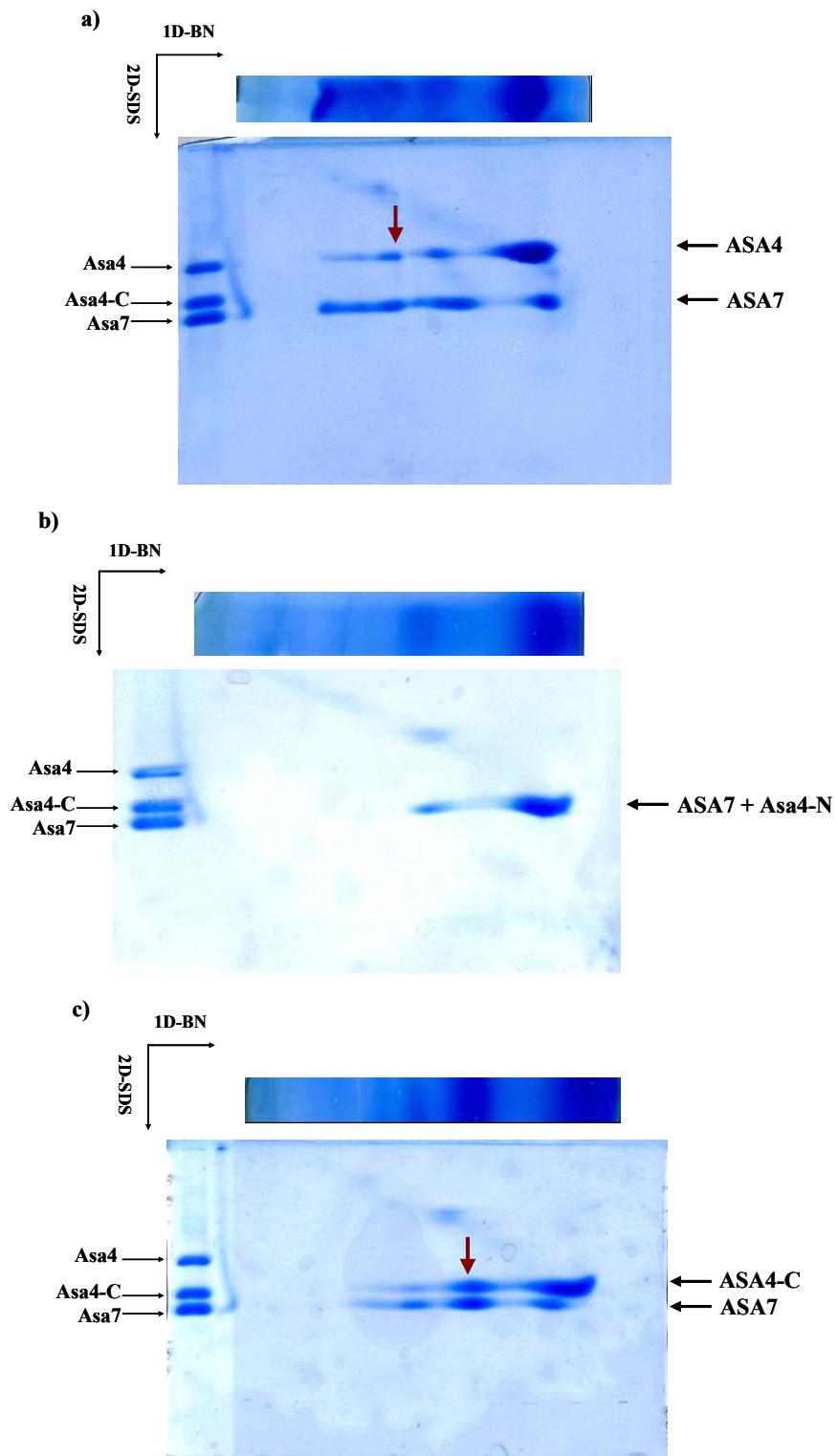


Figura 39. Generación de subcomplejos en geles azules nativos de la subunidad Asa4, Asa7 y fragmentos amino y carboxilo de la subunidad Asa4. Una nanomol de cada subunidad o fragmento se incubaron juntos en un volumen final de 50 μ L y se sometieron a BN-PAGE (banda superior de cada inciso), los posibles subcomplejos formados fueron separados mediante SDS-PAGE en las subunidades que los componen (flecha marrón). a) Asa4 y Asa7, b) Asa4-N y Asa7, c) Asa4-C y Asa7.

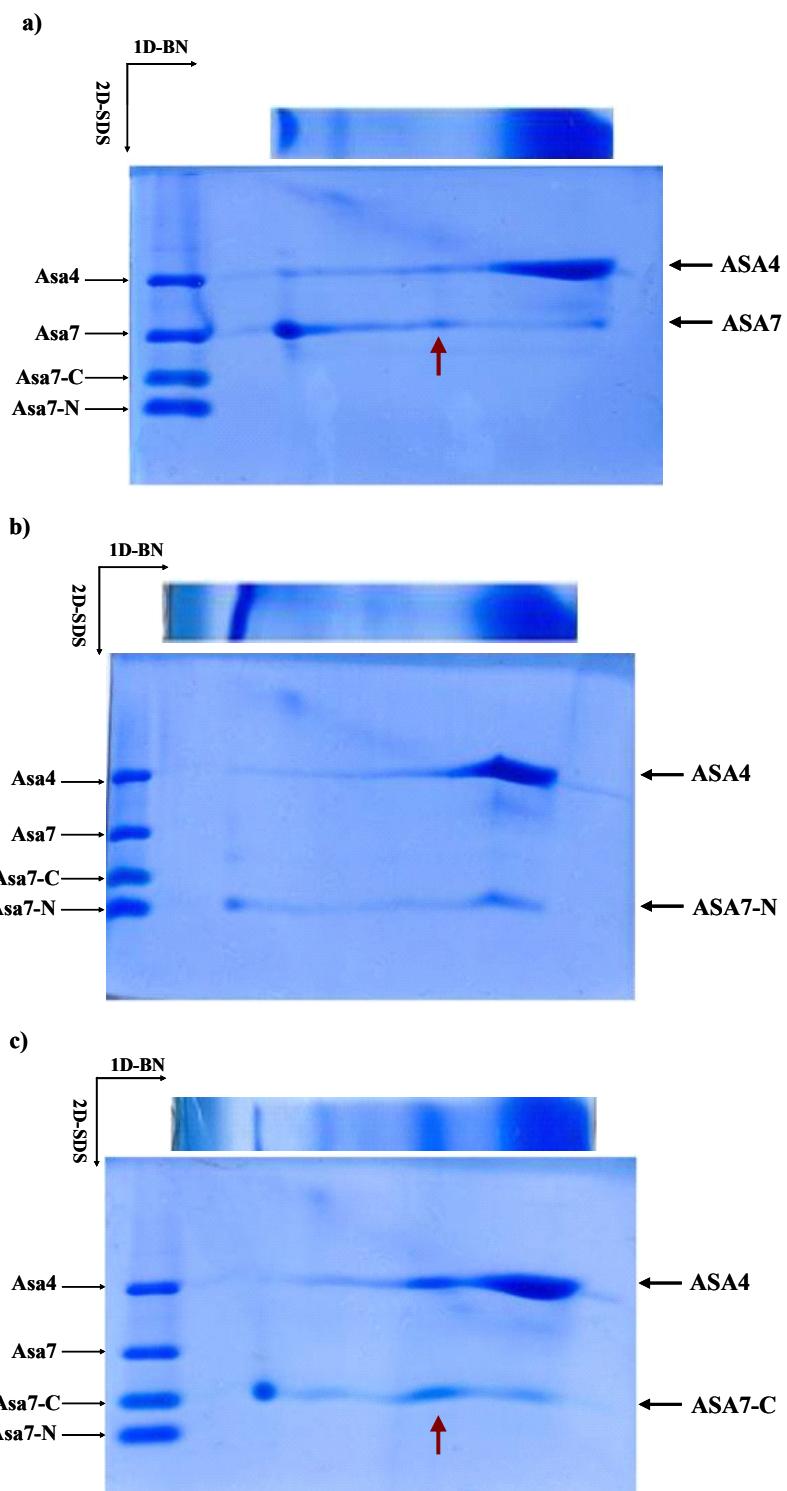


Figura 40. Generación de subcomplejos en geles azules nativos de la subunidad Asa4, Asa7 y fragmentos amino y carboxilo de la subunidad Asa7. Una nanomol de cada subunidad o fragmento se incubaron juntos en un volumen final de 50 μ L y se sometieron a BN-PAGE (banda superior de cada inciso), los posibles subcomplejos formados fueron separados mediante SDS-PAGE en las subunidades que los componen (flecha marrón). a) Asa4 y Asa7, b) Asa4 y Asa7-N, c) Asa4 y Asa7-C.

7.6.4. Purificación del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7

Una vez establecida la interacción entre las subunidades Asa4/Asa7 y las posibles interacciones Asa2/Asa4 y Asa2/Asa7 en los resultados de replegamiento y estabilidad al pH, así como en la inmunorréplica tipo Far-Western, se intentó reasociar a estas tres subunidades para formar un subcomplejo estable. Se utilizaron dos enfoques distintos: cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.

7.6.4.1. Cromatografía de exclusión molecular

Las subunidades recombinantes ASA2, ASA4 y ASA7 purificadas se incubaron juntas, se removió el material agregado por centrifugación y la muestra se inyectó a una columna de exclusión molecular. El subcomplejo formado Asa2/Asa4/Asa7 eluyó como un pico homogéneo, las fracciones de la elución se visualizaron en un gel desnaturalizante (Figura 41). El análisis densitométrico reveló una estequiometría similar a la observada para dichas subunidades en la ATP sintasa de *Polytomella* purificada, por lo que se puede concluir que el subcomplejo reconstituido tiene una estequiometría igual a la presente en la enzima nativa, probablemente 1:1:1.

7.6.4.2. Cromatografía de afinidad

Las subunidades Asa4 (sin etiqueta de histidinas) y Asa7 (con etiqueta de histidinas) se dializaron juntas y se copurificaron con una matriz de Ni-sefarosa. La presencia de Asa4 permitió un replegamiento óptimo de la subunidad Asa7 como ya se describió anteriormente (Figuras 25, 27 y 36). El subcomplejo Asa4/Asa7 purificado se incubó con la subunidad Asa2 (sin etiqueta de histidinas) purificada. El subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 reconstituido se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna y las tres subunidades coeluyeron al aplicar un gradiente de imidazol. Las fracciones obtenidas se visualizaron en un gel desnaturalizante. La tinción de azul de Coomassie mostró un exceso de subunidad Asa4 libre en las fracciones del lavado y la presencia de las tres subunidades en un complejo estable en las fracciones del gradiente (Figura 42). Las bandas teñidas con azul de Coomassie se analizaron por densitometría y se compararon con las subunidades presentes en el complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp (Asa2 y Asa4) y la subunidad Asa7 recombinante purificada.

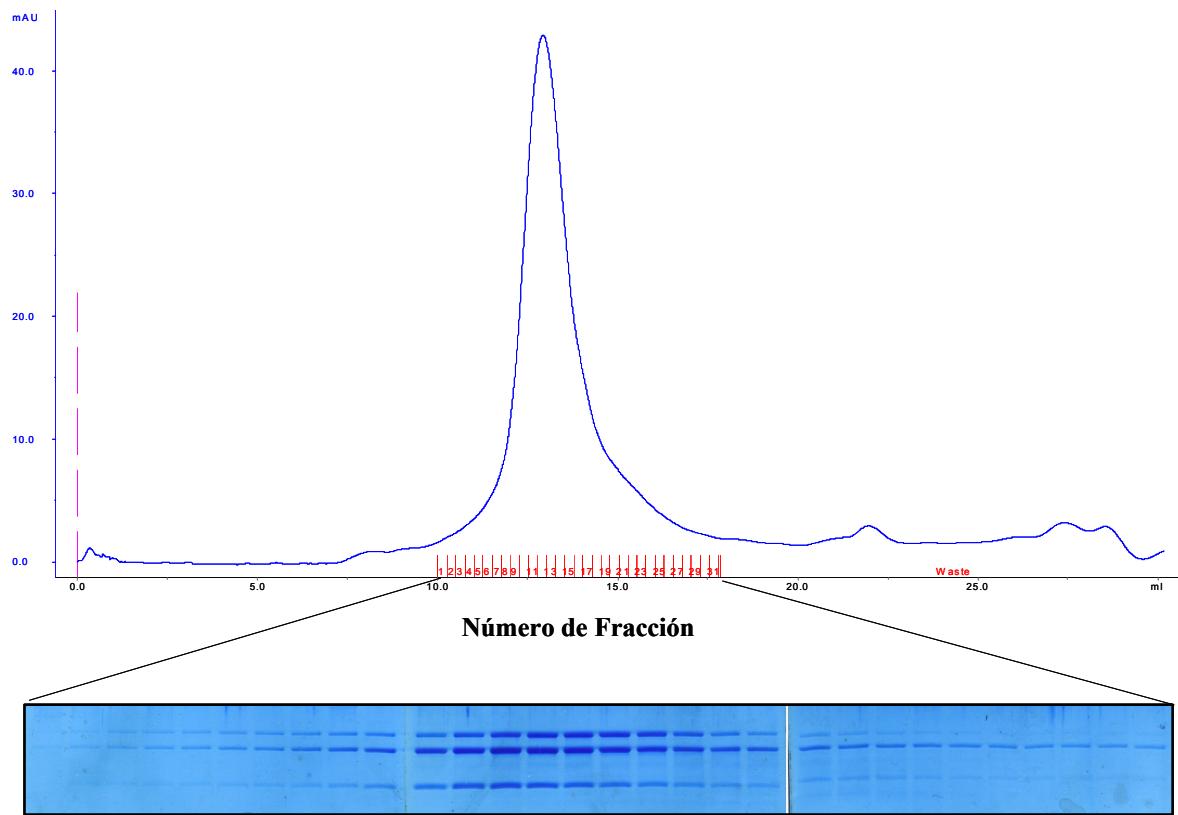


Figura 41. Purificación de un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 mediante cromatografía de exclusión molecular. Las subunidades recombinantes Asa2, Asa4 y Asa7 purificadas fueron incubadas juntas y cargadas a una columna de exclusión molecular. El subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 eluye como se muestra en el cromatograma, las fracciones indicadas fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante.

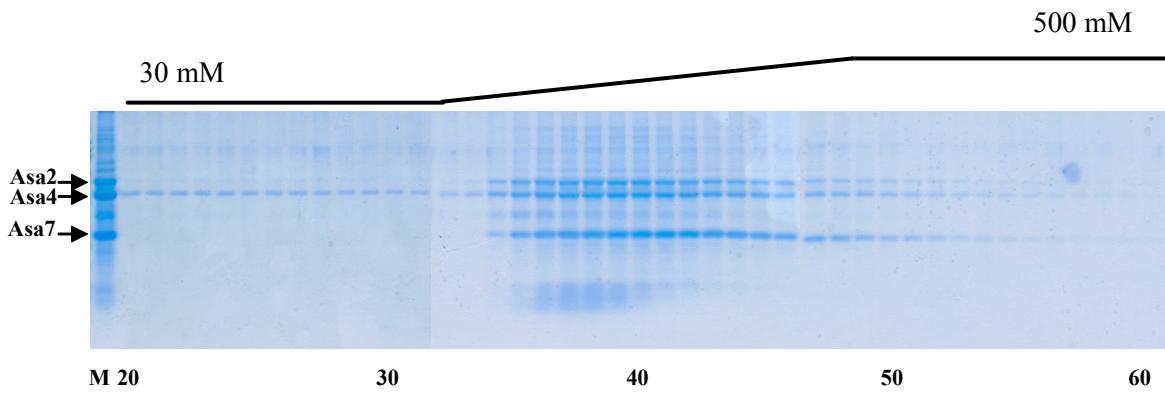


Figura 42. Reconstitución de un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 estable mediante cromatografía de afinidad. Las subunidades recombinantes Asa2 (sin etiqueta de histidinas), Asa4 (sin etiqueta de histidinas) y Asa7 (etiqueta de histidinas) purificadas forman un subcomplejo estable que puede ser recuperado mediante cromatografía de afinidad. El complejo Asa2/Asa4/Asa7 formado eluye cuando un gradiente lineal de imidazol (30-500 mM) es aplicado M: mezcla de subunidades cargada a la columna, los números (20-61) indican las fracciones (1 mL) colectadas de la elución.

A partir de ambas metodologías se puede concluir que las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 pueden interaccionar en un complejo estable con una estequiometría 1:1:1. Lo anterior está de acuerdo con la propuesta previa de que todas las subunidades Asa poseen una estequiometría 1:1 relativa a la subunidad gamma (Cano-Estrada *et al.*, 2010).

7.6.4.4. Modelaje *in silico* de las subunidades Asa2, Asa4, Asa7 y posible estructura en el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp*

La propuesta del modelo generado *in silico* del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 engloba las asociaciones determinadas experimentalmente. En este modelo las subunidades Asa4 y Asa7 interactúan en la base del subcomplejo mientras la subunidad Asa2 se extiende hacia la parte superior del mismo. El modelo propuesto y su ajuste en el mapa de densidad electrónica del dímero de la ATP sintasa obtenido por estudios de microscopía (Cano-Estrada *et al.*, 2010) se muestra en la Figura 43. El volumen del subcomplejo modelado se ajusta a la densidad electrónica del tallo periférico, por lo que se propone que estas subunidades forman la parte superior de este brazo.

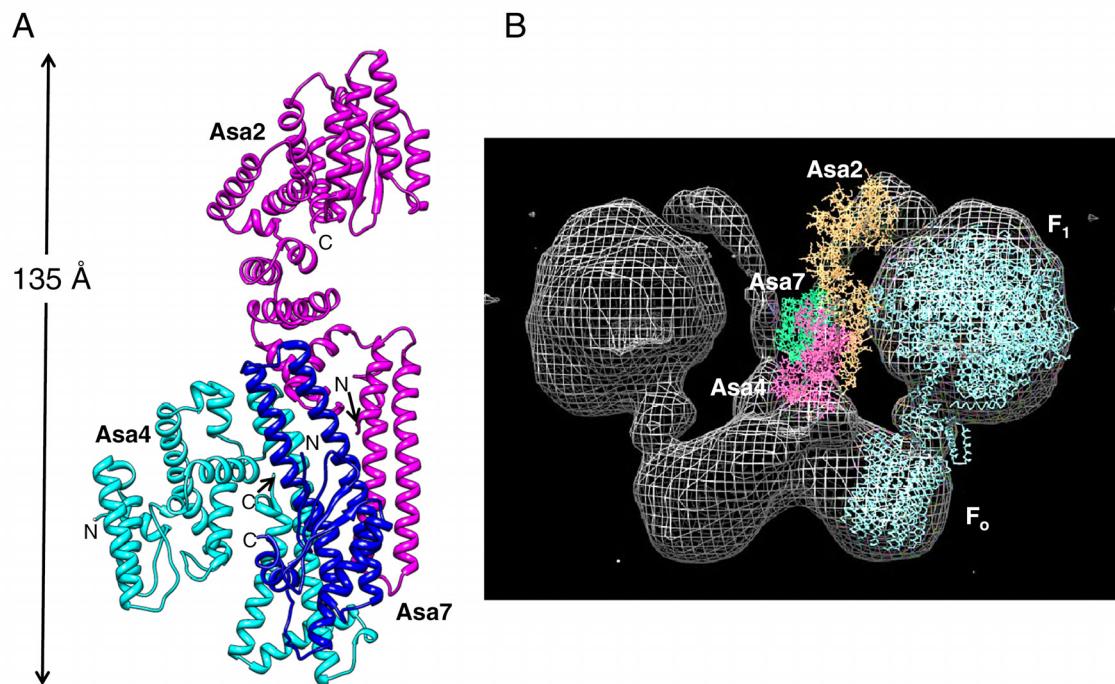


Figura 43. Modelo del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7. **A)** Modelo generado *in silico* del subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7. La subunidad Asa2 se presenta en magenta, Asa4 en cian y Asa7 en azul. Los extremos amino y carboxilo se indican con N y C respectivamente **B)** Ajuste del subcomplejo modelado al mapa tridimensional de densidad del dímero de la ATP sintasa obtenido por microscopía electrónica. La subunidad Asa2 se presenta en naranja, Asa4 en rosa y Asa7 en verde.

8. Discusión

Las subunidades Asas identificadas en la ATP sintasa mitocondrial de las algas cloroficeas parecen encontrarse solamente en este linaje (Lapaille *et al.*, 2010, Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). Estas subunidades forman un brazo periférico robusto en la ATP sintasa de *Polytomella* sp como se observa en las imágenes de microscopía electrónica (Dudkina *et al.*, 2006). En el presente trabajo se investigaron las interacciones proteína-proteína utilizando las subunidades recombinantes Asa purificadas, así como algunos fragmentos de éstas.

En cuanto a la expresión de las proteínas recombinantes, las subunidades Asa4 y Asa8 se acumularon notablemente cuando se utilizó el sistema pQE30 en la cepa XL1-Blue. Por el contrario, las subunidades Asa2, OSCP y Asa7 no presentaron expresión detectable con este sistema. En este mismo sentido, no fue posible expresar a las subunidades Asa7 y OSCP al utilizar los sistemas pET28a en la cepa BL21 (DE3)pLysS, por lo que la expresión de las subunidades Asa1, Asa2, OSCP y Asa7 sólo fue posible en los sistemas pET en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Esta cepa contiene los ARN de transferencia para los codones *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA) y *leuW* (CUA) lo que permite la expresión heteróloga de secuencias provenientes de genomas ricos en guanina y citosina. La secuenciación del genoma mitocondrial de la especie *Polytomella capuana* reveló un contenido elevado de pares de bases de guanina y citosina (57%) (Smith y Lee, 2008a), aún cuando todas las subunidades Asa se codifican en el genoma nuclear, las secuencias amplificadas analizadas también presentan un contenido alto de G-C (Tabla 5). Las secuencias que codifican las subunidades expresadas no contienen los codones *ileY* ni *leuW* y el número de codones *argU* para cada secuencia se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de G-C y número de codones *argU* en las subunidades Asa expresadas

Subunidad	% G-C	<i>argU</i> (AGA)	<i>argU</i> (AGG)
Asa1	57.02	0	6
Asa2	57.96	0	3
Asa4	54.92	1	2
OSCP	54.20	0	3
Asa7	54.97	0	3
Asa8	55.19	0	1

El porcentaje de G-C en las seis secuencias analizadas mantiene un valor mayor al promedio de 50.6% para 3 cepas de *E. coli*. Con base en estos datos se puede proponer que el éxito en la expresión de las subunidades Asa en las tres cepas de *E. coli* utilizadas es debido al número y tipo de codones *argU* y no al porcentaje de G-C en la secuencia. Concluimos que secuencias conteniendo un máximo de 2 codones *argU* (AGG) son susceptibles de ser sobreexpresadas con relativa facilidad.

Las veinte subunidades y fragmentos expresados llevaron invariablemente a la formación de agregados insolubles en la bacteria (cuerpos de inclusión). La cantidad de proteína expresada con respecto a la cantidad de proteína total estimada mediante tinción de Coomassie y densitometría para todos los polipéptidos sobreexpresados en este trabajo se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje péptido inducido/proteína total para la expresión de las subunidades Asa en *E. coli*.

	Proteína	% del total
1	Asa1 28a	35.1
2	Asa1 s/e	28.8
3	Asa2 28a	41.3
4	Asa2 3a	31.5
5	Asa4 28a	32.6
6	Asa4 pQ	54.1
7	Asa4 3a	37.6
8	OSCP 28a	42.3
9	OSCP 3a	32.6
10	Asa7 28a	48.7
11	Asa7 3a	29.7
12	Asa8 pQ	22.9
13	Asa4-N 28a	32.5
14	Asa4-N 3a	30.8
15	Asa4-C 28a	8.8
16	Asa4-C 3a	33.9
17	Asa7-N 28a	49.9
18	Asa7-C 3a	43.5
19	OSCP-N 28a	42.6
20	Ext-beta 28a	19.0

Como puede observarse en la Tabla 6, la variabilidad de expresión de polipéptido a polipéptido es grande y oscila entre un 10 a un 50% de la proteína total de *E. coli* con un valor promedio de 35.0%. Lo anterior se encuentra acorde con los valores de 25-30%

reportados para la formación de cuerpos de inclusión en *E. coli* (Nishimura *et al.*, 1987, Wang *et al.*, 2014). En la mayoría de los casos la detección de proteína sobreexpresada soluble fue prácticamente nula. Por ejemplo, la detección de proteína soluble Asa4 en los extractos bacterianos totales sólo fue posible mediante inmunorréplicas tipo Western (Figura 17). Los agregados insolubles resisten lavados con el detergente no iónico Triton X-100 a concentraciones de hasta un 50% (v/v) en el amortiguador de lavado (Figura 18). Es claro que la formación de estos agregados no se debe a un excedente en la concentración de proteína, es decir a una baja solubilidad de ésta en el amortiguador, ya que no es un fenómeno reversible por dilución y es independiente de la fuerza iónica utilizada durante la lisis (Figura 17). Por lo anterior se puede concluir que todas las subunidades y fragmentos expresados llevan a la formación de cuerpos de inclusión.

La única excepción la presentó el fragmento de la extensión C-terminal de la subunidad beta, ya que este péptido se encontró en la fracción soluble después de la lisis. Esto puede ser debido al alto porcentaje de residuos cargados presentes, 24 negativos (Asp + Glu) y 16 positivos (Arg + Lys), correspondientes al 46% del total de residuos. Al realizar un alineamiento entre esta extensión y la secuencia de la subunidad épsilon, se determinó que 16% de los residuos se encuentran conservados, de los cuales 9 representan residuos cargados. Esta similitud también se encontró al alinear la extensión de la subunidad beta presente en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Atteia *et al.*, 1997). En bacterias la subunidad épsilon se propone como la encargada de la regulación (Klionsky *et al.*, 1984), por lo que la alta similitud entre la extensión de la subunidad beta y la subunidad épsilon, además del alto contenido de residuos cargados, podría significar un papel regulatorio de la extensión de beta sobre la actividad de la enzima.

El lavado de cuerpos de inclusión con el detergente Triton X-100 y posteriores lavados con agua permitió en cada caso el enriquecimiento de la proteína de interés. La relación de las subunidades Asa4 y Asa7 con respecto a la proteína total en los cuerpos de inclusión lavados fue de 60%, lo que indica una alta pureza de las subunidades expresadas en los CI. Este primer paso es importante para poder estandarizar un protocolo de purificación para cada subunidad.

El mecanismo de formación de los CI no está del todo claro (Mitraki, 2010). Entre las causas de la formación pueden encontrarse la agregación de cadenas nacientes mal plegadas (Mitraki *et al.*, 1991) y el intercambio de dominios durante los últimos pasos de plegamiento (Mitraki y King, 1989). Al igual que en los experimentos de Anfinsen, en los cuales la ribonucleasa fue desnaturalizada en presencia de 8M de urea y 2-mercaptoetanol para posteriormente ser renaturalizada al eliminar los agentes desnaturalizantes (Anfinsen, 1973); las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizadas con altas concentraciones de agentes caotrópicos como la urea o el clorhidrato de guanidina y ser renaturalizadas al eliminar los agentes desnaturalizantes con buenos rendimientos (Marston, 1986; Kane y Hartley, 1988). Este fenómeno de desplegamiento y renaturalización parece ser cierto para el caso de las subunidades Asa.

En el presente trabajo se purificaron 16 subunidades y fragmentos a partir de los cuerpos de inclusión correspondientes. Se replegaron las subunidades completas Asa1, Asa2, Asa4 y OSCP, mientras que las subunidades Asa7 y Asa8 así como los fragmentos amino y carboxilo de las subunidades Asa4 y Asa7 se purificaron en condiciones desnaturalizantes. Una de las propiedades seguidas en la estabilidad de las proteínas fue la capacidad de mantenerse en solución al retirar el agente desnaturalizante. En ninguna de las pruebas para determinar las condiciones de replegado fue posible mantener en solución a las subunidades Asa7 y Asa8. Por su parte, el análisis de predicción de hélices trasmembranales e hidrofobicidad predice un segmento hidrofóbico para la subunidad Asa8, lo que podría explicar la razón por la cual la proteína nunca se pudo mantener en solución.

Las subunidades estudiadas se purificaron después de su desplegamiento con 8M de urea. Estos péptidos claramente exhiben interacciones específicas, lo que indica que fueron replegados, parcial o totalmente, en sus conformaciones nativas. Adicionalmente, en el caso de las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 se determinó un porcentaje de estructura secundaria medido por dicroísmo circular de los péptidos purificados (Cano-Estrada, 2012). Lo anterior sugiere que en todos los casos se pudieron aislar proteínas renaturalizadas al menos de forma parcial.

Los datos obtenidos sugieren que las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 interaccionan. La interacción de las subunidades Asa4 y Asa7 es particularmente fuerte y esta mediada por los extremos carboxilos de ambas proteínas (Figuras 39 y 40). Esta interacción fue corroborada a través de 4 metodologías distintas. Al observar los resultados de los experimentos de replegamiento y estabilidad al pH (Figuras 25, 27 y 36) se puede concluir que la presencia de la subunidad Asa4 es indispensable para el plegamiento de la subunidad Asa7.

La presencia de la subunidad Asa7 en la fracción soluble al dializarse en compañía de la subunidad Asa2 (Figuras 24 y 27) sugiere una interacción de ambas subunidades; esta interacción se corroboró mediante copurificación de ambas subunidades por cromatografía de afinidad (Cano-Estrada, 2012). Por su parte, las subunidades Asa2 y Asa4 parecen tener un perfil similar de solubilidad con respecto al pH, por lo que no es posible diferenciar mediante este acercamiento si ambas subunidades se encuentran asociadas. Sin embargo, el resultado de la inmunorréplica tipo Far Western utilizando a la subunidad Asa2 podría sugerir una interacción de ambas subunidades (Figura 30). Esta interacción se observó débilmente en el experimento inverso, es decir, al agregar la subunidad Asa4 durante la incubación (Figura 31). Mediante cromatografía de afinidad fue posible copurificar ambas subunidades y se determinó que la asociación está mediada por el extremo carboxilo de Asa4 (Cano-Estrada, 2012).

Los resultados obtenidos de manera independiente por las metodologías anteriormente señaladas sugieren las asociaciones Asa2/Asa4, Asa4/Asa7 y Asa2/Asa7. En conjunto, estos resultados sentaron la base para la reconstitución de un complejo que contenía a las tres subunidades. Las 3 subunidades se asociaron en un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 que se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad. El subcomplejo reconstituido parece tener una estequiometría 1:1:1, esta misma relación se propuso para las subunidades Asa4, Asa3, Asa5, con respecto a la subunidad gamma determinada por el marcaje fluorescente de cisteínas (Cano-Estrada *et al.*, 2010).

El modelo propuesto para el subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 fue ajustado en el modelo tridimensional de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp obtenido previamente

mediante la reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica (Figura 43) (Cano-Estrada *et al.*, 2010). Al disociar la ATP sintasa purificada con dodecil sulfato de litio (LiDS) y resolverla mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE se observó una asociación de la subunidad Asa2 con la subunidad alfa en el sector F₁, lo que indica que Asa2 debe encontrarse cerca del sector catalítico de la enzima, es decir, en la parte superior del brazo periférico. La orientación del modelo se estableció considerando la proximidad de la subunidad Asa2 con OSCP y la subunidad alfa. Este modelo explica parcialmente la densidad electrónica visualizada en la parte superior del brazo periférico, sin embargo, se deben tomar en cuenta las múltiples variantes asumidas durante el proceso de modelaje como son: *i*) el modelado *in silico* por dominios de las subunidades Asa4 y Asa2 mediante el servidor Roberta y el modelado *ab initio* de la subunidad Asa7 mediante el servidor Quarck, así como la selección del modelo a utilizar *ii*) las variaciones en el acoplamiento de las interacciones proteína-proteína que dependen de los modelos seleccionados así como de las regiones que se encuentran fijas durante el proceso y *iii*) el ajuste en el mapa de densidad electrónica de la ATP sintasa.

En el presente trabajo realizamos varias observaciones: *i*) las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 se asocian de manera estable en un subcomplejo de estequiometría aparente 1:1:1; *ii*) la presencia de las subunidades Asa4 o Asa2 es necesaria para el plegamiento de Asa7; *iii*) la interacción entre las subunidades Asa2 y Asa4 no es tan fuerte como para resistir la separación electroforética mediante BN-PAGE (ya que no fue posible visualizar un subcomplejo mediante esta técnica). Esto podría indicar un papel de “seguro” para la subunidad Asa7 en la asociación entre Asa2 y Asa4. Este papel estabilizador de la subunidad Asa7 ha sido estudiado en el alga *C. reinhardtii* mediante el silenciamiento del gen *Asa7* con RNA de interferencia, lo cual da lugar a una ATP sintasa inestable que disocia el sector F₁ durante la purificación de la enzima (Lapaille *et al.*, 2010). Todos estos datos sugieren que la subunidad Asa7 parece ser fundamental para la estabilización del brazo periférico de la enzima en algas clorofíceas.

Los resultados indican la cercanía de las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 con las subunidades Asa1 y OSCP. La subunidad OSCP se encuentra en la parte superior del brazo

periférico asociada a la subunidad alfa, de forma similar a todas las subunidades OSCP descritas en otros organismos (Rees *et al.*, 2009). En otros estudios de nuestro laboratorio, utilizando algunas de las metodologías aquí mencionadas, hemos determinado la interacción de la subunidad Asa1 con OSCP, y que ésta se encuentra mediada por el extremo carboxilo de la subunidad OSCP (Colina-Tenorio, 2014). Al incubar el complejo V purificado a 60 °C y seguir su disociación en el tiempo mediante geles 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE se observó que las subunidades Asa4, Asa7 y Asa2 se separan del complejo rápidamente, siendo las primeras proteínas que se disocian del resto del complejo (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). Por su parte, la disociación durante la electroforesis nativa de la enzima purificada en 1% de n-Dodecil-β-D-maltósido produjo un subcomplejo que contiene a las subunidades Asa1, Asa2 y OSCP (Figura 57 Anexo 13.3). Lo que sugiere que ambas subunidades Asa se encuentran en la región de unión con la subunidad OSCP y por lo tanto en la parte superior del brazo periférico.

Las predicciones de segmentos de hélices entrecruzadas (coiled-coils) en el servidor CCHMM (http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cc/pred_cchmm.cgi) (Fariselli *et al.*, 2007) para las subunidades Asa1, Asa2, Asa4 y Asa7 arrojaron valores de 30%, 19%, 35% y 32% respectivamente. Este tipo de estructuras se han detectado en el dímero de subunidades E/G del brazo periférico de las A y V ATPasas (Lee *et al.*, 2010) y se proponen formando el dímero de subunidades b en el brazo periférico de la F-ATPasa de *E. coli* (Del Rizzo *et al.*, 2002, Del Rizzo *et al.*, 2006). La presencia de este tipo de estructura cuaternaria en las 4 subunidades Asa mencionadas podría indicar que éstas forman el núcleo estructural del brazo periférico robusto, observado mediante microscopía de partícula única (Dudkina *et al.*, 2005, Dudkina *et al.*, 2006 y Cano-Estrada *et al.*, 2010) y criotomografía electrónica (Dudkina *et al.*, 2010). En resumen, los resultados presentados sugieren que las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7 y OSCP son componentes esenciales del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial en las algas clorofíceas.

La ATP sintasa mitocondrial de las algas presenta una estructura dimérica estable (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009). Las imágenes de microscopía electrónica mostraron la presencia de un brazo robusto en comparación con las enzimas de *B. taurus*, *S. cerevisiae*

y *T. thermophila* (Dudkina *et al.* 2006; Couoh-Cardel *et al.*, 2010; Cano-Estrada *et al.*, 2010, Balaskaran *et al.* 2010). Las subunidades *e* y *g* son las responsables de la dimerización en *S. cerevisiae* (Paumard *et al.*, 2002) y poseen homólogos en *B. taurus* (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011). Sin embargo, no se han identificado homólogos de estas subunidades en las algas clorofíceas. Al disociar la enzima dimérica con 3% de taurodesoxicolato de sodio se observó que las subunidades Asa6 y Asa9 se encuentran muy disminuidas en el complejo monomérico, por lo que se ha propuesto que estas subunidades se encuentran involucradas en la dimerización de la enzima (Cano-Estrada, 2007). El análisis de predicción de hélices trasmembranales e hidrofobicidad predice un segmento hidrofóbico para ambas subunidades. Por otro lado, el uso de agentes entrecruzadores reveló homodímeros de las subunidades Asa4 y Asa6 (Cano-Estrada, 2007; Cano-Estrada *et al.*, 2010). Esta asociación entre subunidades Asa4 se encuentra mediada por puentes disulfuro como se observó mediante geles azules nativos de la subunidad recombinante purificada (Figura 38). Con base en predicción *in silico* de hélices entrecruzadas (coiled-coils) y en la densidad electrónica observada mediante microscopía electrónica se ha propuesto que la unión dimérica de las subunidades Asa4 se lleva a cabo en la región central del brazo periférico de ambos monómeros (van Lis *et al.*, 2007). En conjunto estas observaciones sugieren que la dimerización de la enzima en la región membranal del complejo se lleva a cabo por las subunidades Asa6 y Asa9, mientras la subunidad Asa4 es la encargada de unir los brazos periféricos por la región central de ambos. Estas asociaciones explicarían la resistencia estructural de la ATP sintasa mitocondrial en algas clorofíceas. Con base en todas las interacciones observadas hasta la fecha la propuesta de modelo topológico de las subunidades Asa en el dímero de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp se muestra en la Figura 44. Este modelo da cuenta de todas las vecindades que guardan entre sí las diversas subunidades de la enzima y está basado en los resultados obtenidos en este trabajo y en estudios anteriores.

Actualmente se propone que la organización supramolecular de la ATP sintasa lleva a la formación de racimos de este complejo que tienen un papel crucial en la formación de las crestas mitocondriales (Straus *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2012). Mutantes de levadura que no forman dímeros de la ATP sintasa muestran defectos en la morfología de las crestas

(Paumard *et al.*, 2002). Utilizando microscopía electrónica de super-resolución se han ubicado *in vivo* asociaciones de ATP sintasa a lo largo de las crestas en mitocondrias de *S. cereviceae* (Appelhans *et al.*, 2012). Estos oligómeros de complejo V presentan una muy baja movilidad a través de la cresta (Wilkens *et al.*, 2013). Por su parte, el número y tamaño de las crestas mitocondriales en *S. cerevisiae* aumenta notablemente cuando la célula se encuentra creciendo en condiciones respiratorias (Jiménez *et al.*, 2014).

Polytomella es un organismo aeróbico obligado que presenta crestas mitocondriales con una estructura tubular marcada que han sido observadas mediante criotomografía electrónica (Dudkina *et al.*, 2006; Dudkina *et al.*, 2010). La presencia de estas crestas tubulares puede explicarse por las siguientes observaciones: *i*) El complejo V dimérico posee una gran estabilidad estructural a detergentes, temperatura y presión (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009; Cano-Estrada *et al.*, 2010). *ii*) La estabilidad está dada por la adquisición de las subunidades Asa que forman el brazo periférico robusto de este complejo y estas subunidades se encuentran únicamente en el linaje de estas algas (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; Lapaille *et al.*, 2010). *iii*) Al solubilizar mitocondrias de *Polytomella* sp es posible visualizar diversas asociaciones oligoméricas del complejo V (V_2 , V_4 y V_8) (Figuras 45 y 46 Anexo 13.3). *iv*) Estas asociaciones se mantienen después de la purificación de la enzima y pueden separarse por métodos cromatográficos y de densidad (Figuras 47 y 48 Anexo 13.3). La relación de estas asociaciones no varía notablemente con respecto a la concentración (Figura 49 Anexo 13.3) Son estables a la acción de diversos detergentes y agentes reductores (Figuras 50-52 Anexo 13.3). *v*) La adición del fosfolípido fosfatidilcolina a la enzima purificada no sólo mantiene la estructura oligomérica sino que favorece el paso de dímero a oligómero (Figura 53 Anexo 13.3), lo cual sugiere que esta conformación es estable y favorecida en la ATP sintasa de *Polytomella* sp como se observa al solubilizar con el detergente suave digitonina (Figuras 45 y 46 Anexo 13.3). *vi*) Dos estados oligoméricos (V_2 y V_4) pudieron ser visualizados mediante microscopía electrónica (Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2006; Dudkina *et al.*, 2008; Cano-Estrada *et al.*, 2010; Figura 54 Anexo 13.3). *vi*) Por último, los complejos respiratorios de esta alga presentan alta capacidad de asociación ya que supracomplejos de diversas estequiométrías pueden ser reconstituidos mediante cromatografía de intercambio iónico y enriquecidos

mediante cromatografía de exclusión molecular (Figuras 55 y 56 Anexo 13.3). En conjunto las observaciones mencionadas explicarían la marcada estructura tubular de las crestas mitocondriales observadas en este organismo.

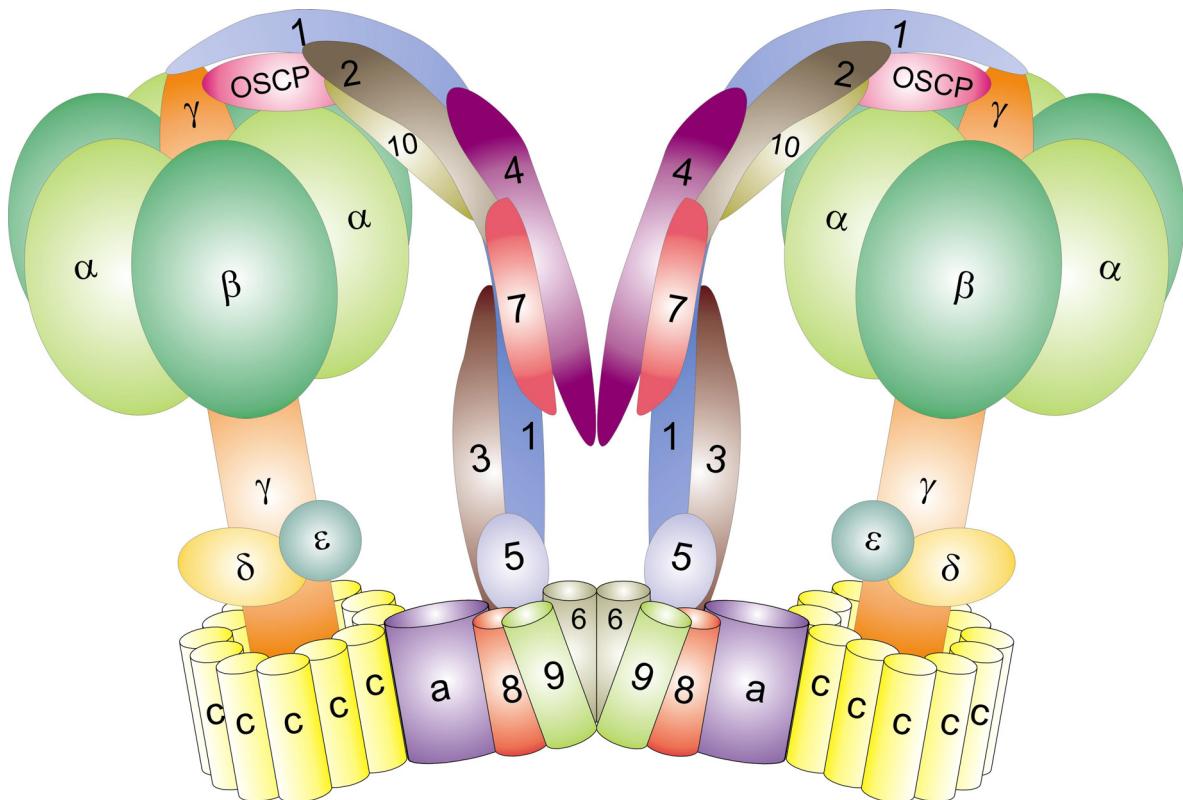


Figura 44. Modelo propuesto de la distribución de las subunidades Asa en el complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp.

9. Resumen de resultados

- Se clonaron y expresaron 20 subunidades o fragmentos del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp.
- Se estandarizaron las condiciones de purificación y/o replegamiento de 17 de los polipéptidos.
- Se realizaron pruebas de interacción por métodos bioquímicos con 6 subunidades recombinantes.
- Se caracterizó con detalle la interacción de las subunidades Asa4 y Asa7 la cual se encuentra mediada por los extremos carboxilos de ambas subunidades.
- Se reconstituyó y purificó un subcomplejo estable que contiene a las subunidades Asa2/Asa4/Asa7.
- Se estandarizó el método de purificación de los complejos I, III, IV y V mitocondriales de *Polytomella* sp.
- Se detectó una nueva subunidad asociada al complejo V denominada Asa10 que se encuentra relacionada con el núcleo catalítico de la enzima (Anexo 13.3).
- Se realizó la caracterización preliminar de los oligómeros del complejo V mitocondrial, así como de asociaciones entre los complejos I, III y IV (Anexo 13.3).

10. Conclusiones

La interacción de las subunidades Asa4 y Asa7 se corroboró mediante 4 técnicas bioquímicas. Estas subunidades interaccionan mediante sus extremos carboxilos respectivos. La presencia de la subunidad Asa4 es necesaria para lograr replegamiento de la subunidad Asa7. El subcomplejo Asa4/Asa7 interacciona con la subunidad Asa2 formando un subcomplejo Asa2/Asa4/Asa7 estable que puede ser purificado mediante dos metodologías cromatográficas. Este subcomplejo tienen una estequiometría 1:1:1. El modelo *in silico* del subcomplejo puede ajustarse a la densidad electrónica del brazo periférico de la ATP sintasa de *Polytomella* sp obtenida por estudios de crío-microscopía. Las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7 y OSCP son componentes estructurales de la región extrínseca a la membrana del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas.

11. Perspectivas

- Reconstituir las subunidades Asa1, Asa2, Asa4, Asa7 y OSCP en un complejo estable.
- Reconstituir el brazo periférico recombinante unido al sector F1 purificado.
- Caracterizar con mayor detalle la interacción Asa1-OSCP.
- Reconstituir el supracomplejo I/III/IV a partir de los complejos purificados (Ver anexo 13.3).
- Continuar con las pruebas de cristalización de las subunidades aisladas, el subcomplejo reconstituido y el complejo aislado de *Polytomella* sp.

12. Bibliografia

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. y Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Appelhans, T., Richter, C.P., Wilkens, V., Hess, S.T., Piehler, J. y Busch, K.B. (2012) Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy. *Nano. Lett.* **12**: 610-616.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. y Schagger, H. (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* **17**: 7170-7178.
- Atteia, A., Dreyfus, G. y Gonzalez-Halphen, D. (1997) Characterization of the alpha and beta-subunits of the F0F1-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**: 275-284.
- Atteia, A., van Lis R., Tielens, A.G. y Martin, W.F. (2013) Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**: 210-223.
- Balabaskaran, N.P., Dudkina, N.V., Kane, L.A., van Eyk, J.E., Boekema, E.J., Mather, M.W. y Vaidya, A.B. (2010) Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS. Biol.* **8**: e1000418
- Belogrudov, G.I. (2009) Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B. *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**: 137-143.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V. y Stuart, R.A. (2002) Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase forms homodimers. *J. Biol. Chem.* **277**: 48484-48489.
- Bulygin, V.V., Duncan, T.M. y Cross, R.L. (2004) Rotor/Stator interactions of the epsilon subunit in *Escherichia coli* ATP synthase and implications for enzyme regulation. *J. Biol. Chem.* **279**: 35616-35621.
- Cano-Estrada, A. (2007) Estudio de la topología de las subunidades ASA1 a 9 de la ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella* sp. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Cano-Estrada, A., Vazquez-Acevedo, M., Villavicencio-Queijeiro, A., Figueroa-Martinez, F., Miranda-Astudillo, H., Cordeiro, Y., Mignaco, J.A., Foguel, D., Cardol, P., Lapaille, M., Remacle, C., Wilkens, S. y González-Halphen, D. (2010) Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 1439-1448.

Cano-Estrada, A. y González-Halphen D. (2011) F₁F₀-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB* 30(3) 98-108.

Cano-Estrada, A. (2012) Interacción de las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 de la ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella* sp. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. *Universidad Nacional Autónoma de México*.

Cardol, P., Gonzalez-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R.F. y Remacle, C. (2005) The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol* **137**: 447-459.

Coskun, U., Chaban, Y.L., Lingl, A., Muller, V., Keegstra, W., Boekema, E.J. y Gruber, G. (2004) Structure and subunit arrangement of the A-type ATP synthase complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii* visualized by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **279**: 38644-38648.

Colina-Tenorio M.L. (2014) Estudio de las interacciones de la subunidad Asa1 en el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Tesis de licenciatura en investigación biomédica básica. *Universidad Nacional Autónoma de México*.

Couoh-Cardel, S.J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. y Garcia-Trejo, J.J. (2010) Structure of dimeric F1F0-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **285**: 36447-36455.

Cross, R.L. y Muller, V. (2004) The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* **576**: 1-4.

Cross, R.L. y Taiz, L. (1990) Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of FoF1 ATPases and synthases. *FEBS Lett.* **259**: 227-229.

Cubas P. (2008) Chlorophyta (algas verdes),
http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_verdes/

Davies, K.M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J.H., Osiewacz, H.D., Rycovska, A., Zickermann, V. y Kuhlbrandt, W. (2011) Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**: 14121-14126.

Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J.D. y Kuhlbrandt, W. (2012) Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**: 13602-13607.

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

- Del Rizzo, P.A., Bi, Y., Dunn, S.D. y Shilton, B.H. (2002) The "second stalk" of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry* **41**: 6875-6884.
- Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. y Walker, J.E. (2006) On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* **25**: 2911-2918.
- Domínguez-Ramírez L. y Tuena de Gómez-Puyou M. (2005) La F₁F₀ ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **8**:18-27.
- Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J. y 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., Sunderhaus, S., Braun, H.P. y Boekema, E.J. (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* **580**: 3427-3432.
- Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Boekema, E.J. y Braun, H.P. (2008) The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**: 419-424.
- Dudkina, N.V., Oostergetel, G.T., Lewejohann, D., Braun, H.P. y Boekema, E.J. (2010) Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 272-277.
- Eubel, H., Jansch, L. y Braun, H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* **133**: 274-286.
- Fariselli P., Molinini D. Casadio R. y Krogh A. (2007) Prediction of Structurally-Determined Coiled-Coil Domains with Hidden Markov Models en: Sepp Hochreiter Roland Wagner (Eds.) Bioinformatics Research and Development First International Conference, BIRD 2007 Berlin, Germany, March 12-14, 2007 Proceedings pp. 292–302.
- Franzen, L.G. y 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.
- Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J. y Brethes, D. (2006) The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry* **45**: 6715-6723.

- Fujikawa, M., Ohsakaya, S., Sugawara, K. y Yoshida, M. (2013) Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ). *Genes Cells*
- Gledhill, J.R. y Walker, J.E. (2005) Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **386**: 591-598.
- Golden, T.R. y 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.
- Gruber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R. y Muller, V. (2001) Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **204**: 2597-2605.
- Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., Gonzalez-Halphen, D. y Uribe-Carvajal, S. (2009) In Yarrowia lipolytica mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**: 75-85.
- Hoffmann, J., Sokolova, L., Preiss, L., Hicks, D.B., Krulwich, T.A., Morgner, N., Wittig, I., Schagger, H., Meier, T. y Brutschy, B. (2010) ATP synthases: cellular nanomotors characterized by LILBID mass spectrometry. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**: 13375-13382.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. y Miyata, T. (1989) Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**: 9355-9359.
- Jimenez, L., Laporte, D., Duvezin-Caubet, S., Courtout, F. y Sagot, I. (2014) Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation. *J. Cell Sci.* **127**: 719-726.
- Kane J. F. y Hartley D.L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **6**:95-101.
- Klionsky, D.J., Brusilow, W.S. y Simoni, R.D. (1984) *In vivo* evidence for the role of the epsilon subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 1055-1060.
- Ko, Y.H., Hullihen, J., Hong, S. y Pedersen, P.L. (2000) Mitochondrial F(0)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F1 motor shielded by F(0), Functional significance, and evidence for an involvement of the unique F(0) subunit F(6). *J. Biol. Chem.* **275**: 32931-32939.
- Koolman J. y Röhm K. H. (2004) Bioquímica Texto y Atlas. 3a Edición. Editorial Médica-Panamericana, Alemania. pp. 121-151, 210-215.

- Lapaille, M., Escobar-Ramirez, A., Degand, H., Baurain, D., Rodriguez-Salinas, E., Coosemans, N., Boutry, M., Gonzalez-Halphen, D., Remacle, C. y Cardol, P. (2010) Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F1FO-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 1630-1644.
- Lee, L.K., Stewart, A.G., Donohoe, M., Bernal, R.A. y Stock, D. (2010) The structure of the peripheral stalk of *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 373-378.
- Madeira, V.M. (2012) Overview of mitochondrial bioenergetics. *Methods Mol. Biol.* **810**: 1-6.
- Marston, F.A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**: 1-12.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. y 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. U. S. A* **102**: 12356-12358.
- Miranda-Astudillo, H., Cano-Estrada, A., Vazquez-Acevedo, M., Colina-Tenorio, L., Downie-Velasco, A., Cardol, P., Remacle, C., Dominguez-Ramirez, L. y Gonzalez-Halphen, D. (2014) Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**: 1-13.
- Mitraki, A. y King, J., (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio/Technology* **7**, 690–699.
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J. y King, J. (1991) Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* **253**: 54-58.
- Mitraki, A. (2010) Protein aggregation from inclusion bodies to amyloid and biomaterials. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **79**: 89-125.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148.
- Morales-Rios, E., Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J.S., Celis, H., Zarco-Zavala, M. y Garcia-Trejo, J.J. (2010) A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1FO ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB J.* **24**: 599-608.
- Muench, S.P., Huss, M., Song, C.F., Phillips, C., Wieczorek, H., Trinick, J. y Harrison, M.A. (2009) Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *J. Mol. Biol.* **386**: 989-999.

- Muench, S.P., Trinick, J. y Harrison, M.A. (2011) Structural divergence of the rotary ATPases. *Q. Rev. Biophys.* **44**: 311-356.
- Muller, V., Ruppert, C. y Lemker, T. (1999) Structure and function of the A1A0-ATPases from methanogenic Archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 15-27.
- Nelson, N. (1994) Energizing porters by proton-motive force. *J. Exp. Biol.* **196**: 7-13.
- Nelson D. L. y Cox M. M. (2005) Lehninger Principios de Bioquímica, 4a edición, Ediciones Omega, pp.690-750.
- Nicastro, D., Frangakis, A.S., Typke, D. y Baumeister, W. (2000) Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J. Struct. Biol.* **129**: 48-56.
- Nishi, T. y Forgac, M. (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 94-103.
- Nishimura N., Komatsubara S., Taniguchi T. y Kisumu M. (1987) Hyperproduction of aspartase of *Escherichia coli* K-12 by the use of a runaway plasmid vector. *Journal of Biotechnology* **6**: 31-40.
- Nurani, G. y Franzen, L.G. (1996) Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Mol. Biol.* **31**: 1105-1116.
- Ohsakaya, S., Fujikawa, M., Hisabori, T. y Yoshida, M. (2011) Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **286**: 20292-20296.
- Paumard, P., Arselin, G., Vaillier, J., Chaignepain, S., Bathany, K., Schmitter, J.M., Brethes, D. y Velours, J. (2002) Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **41**: 10390-10396.
- Radax, C., Sigurdsson, O., Hreggvidsson, G.O., Aichinger, N., Gruber, C., Kristjansson, J.K. y Stan-Lotter, H. (1998) F-and V-ATPases in the genus *Thermus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 12-22.
- Rees, D.M., Leslie, A.G. y 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.
- Rodriguez-Salinas, E., Riveros-Rosas, H., Li, Z., Fucikova, K., Brand, J.J., Lewis, L.A. y Gonzalez-Halphen, D. (2012) Lineage-specific fragmentation and nuclear relocation of the mitochondrial cox2 gene in chlorophycean green algae (Chlorophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* **64**: 166-176.

- Schagger, H., Cramer, W.A. y von, J.G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**: 220-230.
- Schäfer, G., Engelhard, M. y Müller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 570-620.
- Schagger, H. y Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**: 1777-1783.
- Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**: 154-159.
- Shao, E., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. y Forgac, M. (2003) Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **278**: 12985-12991.
- Smith, D.R. y Lee, R.W. (2008a) Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella capuana*: a linear molecule with an unprecedented GC content. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 487-496.
- Smith, D.R. y Lee, R.W. (2008b) Nucleotide diversity in the mitochondrial and nuclear compartments of *Chlamydomonas reinhardtii*: investigating the origins of genome architecture. *BMC. Evol. Biol.* **8**: 156
- Stewart, A.G., Lee, L.K., Donohoe, M., Chaston, J.J. y Stock, D. (2012) The dynamic stator stalk of rotary ATPases. *Nat. Commun.* **3**: 687
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G. y Walker, J.E. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 672-679.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R.R. y Kuhlbrandt, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* **27**: 1154-1160.
- Stryer, L. (1995) Biochemistry. **5th**: 483-484.
- Thomas, D., Bron, P., Weimann, T., Dautant, A., Giraud, M.F., Paumard, P., Salin, B., Cavalier, A., Velours, J. y Brethes, D. (2008) Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol. Cell* **100**: 591-601.
- Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M. y 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. U. S. A* **98**: 6560-6564.

- van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernandez, G. y Gonzalez-Halphen, D. (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol* **132**: 318-330.
- van Lis, R., Gonzalez-Halphen, D. y 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-Hernandez, G., Groth, G. y Atteia, A. (2007) New insights into the unique structure of the F0F1-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **144**: 1190-1199.
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C. y Gonzalez-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.
- Villavicencio-Queijeiro, A., Vázquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de, G.M., Mignaco, J.A., Freire, M.M., Scofano, H.M., Foguel, D., Cardol, P., Remacle, C. y Gonzalez-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.
- Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B. y Muller, V. (2009) Three-dimensional structure of A1A0 ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **284**: 10110-10119.
- Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C.D. y van der Laan, M. (2010) Stepwise assembly of dimeric F(1)F(o)-ATP synthase in mitochondria involves the small F(o)-subunits k and i. *Mol. Biol. Cell* **21**: 1494-1504.
- Walker, J.E. y Dickson, V.K. (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 286-296.
- Wang, G., Han, J., Wang, S., y Li, P. (2014) Expression and purification of recombinant human bone morphogenetic protein-7 in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **44**: 16-25.
- Weber, J. (2006) ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 1162-1170.
- Wilkins, V., Kohl, W. y Busch, K. (2013) Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *J. Cell Sci.* **126**: 103-116.

Wise, J.G. y Vogel, P.D. (2008) Subunit b-dimer of the *Escherichia coli* ATP synthase can form left-handed coiled-coils. *Biophys. J.* **94:** 5040-5052.

Wise, J.G. y Vogel, P.D. (2009) Accommodating discontinuities in dimeric left-handed coiled coils in ATP synthase external stalks. *Biophys. J.* **96:** 2823-2831.

Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M. y Schagger, H. (2006) Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1757:** 1066-1072.

Zhang, Z., Zheng, Y., Mazon, H., Milgrom, E., Kitagawa, N., Kish-Trier, E., Heck, A.J., Kane, P.M. y Wilkens, S. (2008) Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* **283:** 35983-35995.

13. ANEXOS

13.1 Protocolos

Índice de protocolos

6.1. Amplificación de los cDNA de las subunidades ASA y clonación en vectores de expresión	79
6.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	79
6.1.1. Geles de agarosa (1%)	80
6.1.2. Adición de adenina al extremo del producto de PCR	80
6.1.3. Ligación en el vector pGEM-T Easy (Promega)	81
6.1.4. Transformación en <i>E. coli</i> por choque térmico	81
6.1.5. Preparación de células ultracompetentes	81
6.1.6. Miniprep (Amortiguador TENS-Acetato de sodio)	82
6.1.7. Obtención de producto y ligación en vectores de expresión	83
6.2. Expresión de las proteínas ASA recombinantes en <i>Escherichia coli</i> .	85
6.2.1. Pruebas de expresión	85
6.2.2. Sobreexpresión de proteínas para purificación	85
6.2.3. Rompimiento celular para purificación de proteína recombinante en cuerpos de inclusión	86
6.3. Lavado de cuerpos de inclusión	87
6.4. Purificación de las subunidades recombinantes.	88
6.4.1. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (Ni) en condiciones desnaturalizantes (<i>OSCP 28a, Asa7 28a, Asa8, Asa4-N 28a, Asa4-C 28a, Asa7-N 28a, Asa7-C 28a, OSCP-N 28a</i>)	90
6.4.2. Purificación y replegado de proteínas por cromatografía de afinidad (<i>Asa1 28a, Asa2 28a, Asa4 pQ, Asa4 28a</i>) y en condiciones nativas (<i>Ext-beta</i>)	91
6.4.3. Cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharose (<i>Asa2 3a, Asa4 3a</i>)	92
6.4.4. Cromatografía de intercambio aniónico Source 15Q 10/100 o MonoQ 10/100 (<i>Asa4 pQ, Asa4 28a, Asa4 3a, Ext-beta</i>)	93
6.4.5 Cromatografía de intercambio catiónico Source 15S 5/50 (<i>OSCP 3a</i>)	94
6.4.6 Cromatografía de exclusión molecular (<i>Asa7 3a</i>)	95
6.4.7. Limpieza y regeneración de las columnas HisTrap FF	96
6.4.8. Limpieza y regeneración de las columnas Source 15Q MonoQ, Source 15S	97
6.4.9. Limpieza y regenerado de columna DEAE-Sepharose	98
6.4.10. Limpieza de columna Sephadryl S-300	98
6.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP	99
6.6. Estudio de interacción entre las subunidades por métodos bioquímicos	100
6.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH	100
6.6.2. Inmunorréplica tipo Far-Western	101
6.6.3. Generación de subcomplejos en geles azules nativos	102
6.6.4. Purificación del complejo Asa2/Asa4/Asa7 estable	103
6.6.4.1. Cromatografía de exclusión molecular	103
6.6.4.2. Cromatografía de afinidad	104
Anexo 13.3. Oligomerización de la ATP sintasa y supracomplejos mitocondriales	106
1. Complejo V mitocondrial	106
1.1.Intentos de separación de los oligómeros V ₄ y V ₂	107
1.1.1. Exclusión molecular	107

1.1.2. Gradiente de densidad	107
1.2. Efecto de diversos agentes sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial	108
1.2.1. Efecto de concentración	108
1.2.2. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la oligomerización del complejo	108
1.2.2.1. Efecto del n-dodecil-β-D-maltósido (LM)	108
1.2.2.2. Efecto del CHAPS	109
1.2.2.3. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la oligomerización del complejo	109
1.2.3. Efecto de fosfolípidos sobre la oligomerización del complejo	109
1.3. Visualización de oligómeros de la ATP sintasa mediante microscopía electrónica	110
2. Supracomplejos de la cadena de transporte de electrones (Anexo 13.3)	111
2.1. Solubilización de mitocondrias con n-dodecil-β-D-maltósido y digitonina	111
2.2. Caracterización de los supracomplejos reconstituidos mediante cromatografía de intercambio iónico.	111
2.3. Separación de los supracomplejos reconstituidos mediante cromatografía de exclusión molecular.	112
2.4. Purificación de los complejos mitocondriales mediante cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido	113
2.5. Purificación de los complejos I y IV mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido	114
2.6. Zimografía en gel de los complejos respiratorios	115
2.7. Cuantificación de proteína total mediante el método de Lowry-Markwell	116
2.8. Tinción de plata para geles de poliacrilamida	117
 Anexo 13.4. Exploración sobre las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial	
1. Subunidad Asa4	118
2. Complejo V mitocondrial	119
2.1. Protocolo de purificación de complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp	119
2.2. Pruebas de cristalización	120

6.1. Amplificación de los cDNA de las subunidades ASA y clonación en vectores de expresión

6.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR de las secuencias codificantes de las subunidades Asa se efectuó a partir de una genoteca de cDNA del alga *Polytomella sp* o de construcciones previamente realizadas utilizando la ACCUZYME DNA Polymerase (Bioline) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia codificante

	Volumen (μ L)
DNA templado (~200 ng/ μ L)	2
Cebador-F (~200 μ g/ μ L)	2
Cebador-R (~200 μ g/ μ L)	2
Amortiguador PCR10X (15 mM MgCl ₂)	5
dNTPs(10 mM cada uno)	2
Polimerasa (2.5 U/ μ L)	0.5
H ₂ O	36.5

Se experimentó con diferentes temperaturas de alineamiento, número y duración de los ciclos y se determinaron las condiciones óptimas para una buena amplificación, en general se obtuvieron los productos deseados utilizando temperaturas de alineamiento entre 50-55 °C (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones generales de amplificación para las secuencias codificantes de las subunidades Asa partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella sp*

Proceso	Temperatura (°C)	Duración (min)	No. de Repeticiones
Desnaturalización	94	3	1
Desnaturalización	94	1	
Alineamiento	50-55	2	
Elongación	72	2	
Elongación	72	10	1

Los productos obtenidos deben visualizarse mediante electroforesis en agarosa.

Geles de agarosa (1%)

- 1) Disolver con calentamiento 1 g de agarosa en 100 mL de amortiguador TAE
- 2) Dejar enfriar a 60 °C
- 3) Agregar 1 µL de solución de bromuro de etidio (10 mg/mL)
- 4) Colocar el peine y dejar solidificar

6.1.2. Adición de adenina al extremo del producto de PCR

El vector pGEM-T Easy está especialmente diseñado para la ligación de productos de PCR, contiene extremos de timinas en el centro del sitio múltiple de clonación, por lo que para un mejor rendimiento en la ligación es conveniente que el producto de PCR contenga nucleótidos de adenina en ambos extremos de la cadena. El protocolo de adición de adenina al extremo del producto de PCR es el siguiente:

1. Separar el producto de PCR en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE.
2. Cortar y purificar la banda de interés a partir del gel utilizando el Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit o su equivalente y eluir en un volumen final de 30 µL.
3. Realizar la mezcla de reacción siguiente:

Mezcla de reacción para la adición de adenina utilizando el Qiagen *Taq* PCR Kit:

Amortiguador PCR 10X (15 mM MgCl ₂)	5 µL
Amortiguador Q	10 µL
dNTPs (10 mM de cada uno)	1 µL
<i>Taq</i> polimerasa (5U/µL)	0.5 µL
Producto de PCR	30 µL
H ₂ O	5.5 µL

4. Incubar a 72°C/30 min.
5. Purificar la banda de interés a partir del gel utilizando el Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit o su equivalente y eluir en volumen final de 30 µL.

6.1.3. Ligación en el vector pGEM-T Easy (Promega)

En general, el producto a ligar en el pGEM se recupera a concentración de entre 10-100 ng/ μ L, por lo que los volúmenes en la reacción de ligación deben ser ajustados.

Preparar la mezcla de reacción:

Amortiguador de ligación 2X	5 μ L
pGEM-T Easy vector (50 ng/ μ L)	1 μ L
DNA (100 ng/ μ L)	0.5 μ L
T4 DNA ligasa (3U/ μ L)	1 μ L
H ₂ O	2.5 μ L

Una vez realizada la ligación transformar esta construcción en *E. coli*

6.1.4. Transformación en *E. coli* por choque térmico

Este método se basa en la incorporación de ADN exógeno en una cepa receptora a través de un choque térmico a 42 °C empleando el siguiente protocolo:

- 1) Atemperar el vector o la ligación en hielo
- 2) Descongelar células competentes en hielo
- 3) Colocar 50 μ L de células competentes en un tubo estéril
- 4) Agregar 1 μ L del vector purificado (todo en caso de ser una reacción de ligación)
- 5) Incubar 30 min en hielo
- 6) Incubar 2 min a 42 °C
- 7) Incubar 2 min en hielo
- 8) Adicionar 200 μ L de medio LB líquido
- 9) Incubar 1 h a 37°C
- 10) Sembrar en una caja Petri con medio LB + Antibiótico de selección + IPTG y x-gal
- 11) Incubar de 18 -24 h a 37°C

6.1.5. Preparación de células ultracompetentes (todo el procedimiento en estéril)

- 1) Hacer un cultivo de 4 mL de 16 horas de la cepa de *E. coli* de interés
- 2) Tomar una alícuota de 150 μ L del cultivo anterior e inocular 20 mL de medio LB

- 3) Agregar 200 μ L de una solución 1M MgCl₂ y 1M MgSO₄
- 4) Incubar a 20 °C, con agitación a 200 rpm hasta obtener un densidad óptica de 0.5 a $\lambda = 600$ nm
- 5) Bajar las células por centrifugación a 3500 rpm en un rotor JA 25.50, 10 min, a 4°C
- 6) Descartar el sobrenadante
- 7) Resuspender en 5 mL de amortiguador TB estéril
- 8) Incubar en hielo 10 min
- 9) Repetir pasos 5-8
- 10) Bajar las células a 3500 rpm 10 min a 4°C
- 11) Descartar el sobrenadante
- 12) Resuspender en 2 mL de TB estéril
- 13) Adicionar 140 μ L de dimetilsulfóxido
- 14) Alicuotar (200 μ L) en tubos Eppendorf
- 15) Sumergir 1 min en nitrógeno líquido
- 16) Guardar a -70 hasta su uso

A partir de las colonias obtenidas en la transformación realizar parches en una caja de cultivo nueva y sembrar medio líquido para extracción de ADN cromosomal.

6.1.6. Miniprep (Amortiguador TENS-Acetato de sodio)

Se basa en una lisis alcalina, neutralización y la posterior separación de restos celulares y ADN cromosomal por centrifugación. Finalmente el ADN es precipitado con etanol, lavado y resuspendido en agua. El protocolo es:

- 1) Sembrar una porción de caja Petri o 5 mL de medio LB + antibiótico
- 2) Incubar 16-20 horas a 37 °C
- 3) Tomar con un palillo estéril parte del cultivo o recuperar las células por centrifugación
- 4) Depositar en 50 μ L de H₂O estéril
- 5) Resuspender con vórtex
- 6) Adicionar 300 μ L de amortiguador TENS y agitar en vórtex

- 7) Dejar la lisis 5 min a temperatura ambiente
- 8) Adicionar 150 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 y agitar con vórtex
- 9) Centrifugar 2 min a 14000 rpm en un rotor JA 25.50
- 10) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
- 11) Adicionar 900 μ L de EtOH al 100% preincubado a -20°C
- 12) Centrifugar 2 min a 14000 rpm en un rotor JA 25.50
- 13) Descartar el sobrenadante
- 14) Lavar el botón con 1 mL de EtOH al 70% preincubado a -20°C
- 15) Centrifugar 2 min a 14000 rpm en un rotor JA 25.50
- 16) Descartar el sobrenadante y dejar secar al aire
- 17) Resuspender en 30 μ L de agua

Verificar la presencia del inserto mediante restricción con endonucleasa. Para construcciones en el pGEM-T Easy la restricción se puede realizar con las enzimas EcoRI o NotI que liberan el inserto, adicionalmente a las enzimas utilizadas en los cebadores. Para el caso de otros vectores usar las enzimas utilizadas en los cebadores.

6.1.7. Obtención de producto y ligación en vectores de expresión

Obtener DNA cromosomal mediante el sistema Wizard Plus SV Minipreps (Promega) o QIAGEN plasmid Midi Kit. Realizar la restricción de aproximadamente 3 μ g de los vectores a utilizar (construcción para obtener inserto y plásmido receptor), separar los fragmentos en electroforesis de agarosa y purificar los fragmentos de interés. Realizar la ligación como se indica:

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la ligación en vectores de expresión

	Volumen (μ L)
Amortiguador de ligación 10X	3
Vector (~200 ng/ μ L)	8
Inserto (~20 ng/ μ L)	16
T ₄ DNA ligasa (3 U/ μ L)	1
H ₂ O c.b.p.	30

1. Incubar la reacción a 16 °C durante 12-16 horas
2. Transformar en *E. coli* DH5α
3. Realizar parches y búsqueda de transformantes con el inserto de interés

Una vez verificada la presencia del inserto en el vector de expresión purificar nuevamente plásmido con el sistema Wizard Plus SV Minipreps (Promega) y transformar en *E. coli* cepas XL1-Blue o BL21-CodonPlus(DE3)RIL dependiendo del sistema de expresión utilizado. Seleccionar transformantes y realizar pruebas de expresión.

6.2. Expresión de las proteínas ASA recombinantes en *Escherichia coli*.

6.2.1. Pruebas de expresión

1. Seleccionar 8 colonias de la caja de transformación en la cepa de expresión y hacer parches en una caja nueva.
2. Inocular frascos con 30 mL de medio LB adicionado con los antibióticos necesarios
3. Incubar a 37 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.4 a 600 nm
4. Tomar una muestra de 300 µL
5. Adicionar ITPG a una concentración de 0.1 mM a partir de una solución 1M
6. Incubar a 37 °C durante 12 horas tomando muestras cada 3 horas
7. Visualizar las muestra mediante SDS-PAGE comparando con el extracto de la cepa de interés inducida con IPTG en las mismas condiciones

En caso de ser evidente la sobreexpresión de la proteína esperada seleccionar la colonia que mayor expresión presente y guardar una muestra adicionada con glicerol (30 y 50%) a -70 °C para su conservación. En el caso contrario seleccionar una colonia y realizar pruebas de inducción a distintas temperaturas (20, 30 y 37 °C), concentraciones de IPTG (0.01, 0.1 y 1 mM) y tiempos de inducción (1-12 horas).

Generalmente las condiciones de 0.1 mM de IPTG, 37 °C, 6-8 horas, produjeron una acumulación adecuada de las subunidades o fragmentos de proteína utilizados en este trabajo.

6.2.2. Sobreexpresión de proteínas para purificación

En general funciona para la mayoría de las Asas (todo en asepsia)

1. Poner un cultivo (30 mL de medio LB) a partir de 30 µL del glicerol 30% con los antibióticos necesarios.
2. Incubar 12 h a 37 °C con agitación a 250 rpm

3. Inocular 1 matraz Erlenmeyer de 2L con 500 mL de medio LB con todo el precultivo.
4. Incubar a 37°C, 250 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.5 a 600nm (aproximadamente 2-4 horas).
5. Mezclar con 1500 mL de medio LB adicionado con antibióticos y repartir en 4 matraces de 2 L (500 mL por matraz).
6. Incubar a 37°C, 250 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.4 a 600 nm (aproximadamente 2-4 horas).
7. Inducir con isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración de 0.1 mM final.
8. Incubar a 37°C con agitación a 250 rpm durante 12-16 horas.
9. Bajar el cultivo centrifugando a 7000 rpm por 25 min.
10. Resuspender y pasar todo el botón a 2 tubos falcon de 50 mL
11. Recuperar las células y congelar las pastillas a -75°C hasta su uso.

6.2.3. Rompimiento celular para purificación de proteína recombinante en cuerpos de inclusión

Todo el procedimiento a 4 °C

Utilizar los 2 tubos de células congeladas equivalentes a 2 L de cultivo inducido

1. Resuspender cada botón celular en 30 mL de PBS (500) conteniendo Triton X-100 al 1%
2. Pasar toda la muestra (60 mL) a un recipiente de acero inoxidable congelado a -20°C previamente
3. Sonicar la muestra 3-5 min a 5 Watts de potencia en pulsos de 50% (hasta alcanzar 30-40 min totales) hasta observar cambio significativo en la muestra. EVITAR QUE SE CALIENTE LA MUESTRA
4. Separar la muestra en dos tubos (equivalente a 1L de cultivo)
5. Centrifugar la muestra 10 min a 10 000 rpm y recuperar fracciones soluble e insoluble (Cuerpos de inclusión crudos)
6. Visualizar ambas fracciones mediante SDS-PAGE
7. Guardar los cuerpos de inclusión crudos a -70 °C hasta su uso

6.3. Lavado de cuerpos de inclusión

Todo el procedimiento a 4 °C

Realizar cada paso con 1 tubo de CI crudos (Equivalente a 1L de cultivo)

Resuspender los CI en 30 mL de PBS (500) + Triton X-100 al 5%

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm (Rotor JA 25.50) a 4 °C

Guardar todo el sobrenadante (TRITON 1) y proseguir con la pastilla (CI)

Resuspender los CI en 30 mL de agua fría y filtrada

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4 °C

Guardar todo el sobrenadante (AGUA 1) y proseguir con la pastilla (CI)

Resuspender los CI en 20 mL de PBS (500) + Triton X-100 al 5%

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm (Rotor JA 25.50) a 4 °C

Guardar todo el sobrenadante (TRITON 2) y proseguir con la pastilla (CI)

Resuspender los CI en 25 mL de agua fría y filtrada

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm (Rotor JA 25.50) a 4 °C

Guardar todo el sobrenadante (AGUA 2) y proseguir con la pastilla (CI)

Resuspender los CI en 20 mL de agua fría y filtrada

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm (Rotor JA 25.50) a 4 °C

Guardar todo el sobrenadante (AGUA 3) y proseguir con la pastilla (CI)

Resuspender los CI en 20 mL de agua fría y filtrada

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm (Rotor JA 25.50) a 4 °C

Guardar todo el sobrenadante (AGUA 4) y proseguir con la pastilla (CI)

Guardar los CI lavados a -70 °C, hasta su uso

6.4. Purificación de las subunidades recombinantes

Cromatografía

Todas las columnas y equipos utilizados en la cromatografía provinieron de GE Healthcare Life Sciences.

- La cromatografía de afinidad se realizó con las columnas:
 - HisTrap FF crude 1 mL
 - HisTrap FF crude 5 mL
- La cromatografía de intercambio iónico se realizó con las columnas:
 - MonoQ 10/100
 - Source 15Q 10/100: Matriz Source 15Q en columna Tricorn 10/100
 - DEAE-Sepharose : Matriz DEAE-Sepharose FF en columna XK 16/40
 - Source 15S 5/50 : Matriz Source 15S en columna Tricorn 5/50
- La cromatografía de exclusión molecular se realizó con las columnas:
 - Superose 6 10/300 GL
 - Superose 12 10/300 GL
 - Sephadryl S-300: Matriz Sephadryl S-300 en columna XK 16/70
- Los equipos utilizados fueron:
 - ÄKTA FPLC: Bombas P-920, detector UPC-900, válvula de inyección INV-907, colector Frac-920
 - Peristaltic Pump P-1

Las subunidades fueron purificadas de acuerdo con la siguiente tabla:

Subunidad/ Fragmento	pQE30 (+HisTag)	pET28a (+HisTag)	pET3a (-HisTag)
Asa1	—	Af (r)	—
Asa2	NE	Af (r)	IE (a)
Asa4	Af (r)/IE	Af (r)/IE	IE (a)/IE (a)
OSCP	NE	Af (d)	IE (c)
Asa7	NE	Af (d)	EM
Asa8	Af (d)	—	—
Asa4-N	—	Af (d)	—
Asa4-C	—	Af (d)	—
Asa7-N	—	Af (d)	—
Asa7-C	—	Af (d)	—
OSCP-N	—	Af (d)	—
Ext-Beta	—	Af (n)/IE	—

Af: Cromatografía de afinidad a Ni²⁺, (r) Replegado, (d) Condiciones desnaturalizantes, (n) Condiciones nativas, IE: Cromatografía de intercambio iónico (a) aniónico, (c) catiónico, EM: Cromatografía de exclusión molecular, (—): No realizado, NE: No expresado.

6.4.1. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (Ni) en condiciones desnaturalizantes (OSCP 28a, Asa7 28a, Asa8, Asa4-N 28a, Asa4-C 28a, Asa7-N 28a, Asa7-C 28a, OSCP-N 28a)

Todo el procedimiento a 4 °C

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna 0.3 MPa o 0.5 Mpa con restrictor de flujo

Todos los lavados y equilibrio se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

1. Resuspender los CI lavados (equivalente a 1L de cultivo) en 30 mL de PBS (500) 8U
2. Incubar con agitación leve durante 8-12 h a 4°C
3. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar lo no disuelto
4. Diluir con PBS (500) a una concentración final de urea 4M
5. Agregar imidazol a una concentración final de 10 mM de imidazol de una solución 1M de imidazol en el mismo amortiguador

En bomba peristáltica

6. Equilibrar una columna HisTrap FF Crude 5 mL con PBS (500) 4U
7. Recircular la muestra a un flujo de 1 mL/min 12 horas

En FPLC

8. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
 - a. Bomba A: PBS (500) 4U
 - b. Bomba B: PBS (500) 4U 500I
9. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador A
10. Conectar la columna
11. Lavar la columna hasta línea base con PBS (500) 4U
12. Lavar con 4 volúmenes de columna (VC) a 10% de amortiguador B
13. Eluir la proteína con un gradiente 10→100% de amortiguador de B de 10 VC
14. Colectar fracciones de 4 mL
15. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE y seleccionar las enriquecidas con la proteína de interés.
16. Reunir las fracciones enriquecidas, hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -70°C hasta su uso

6.4.2. Purificación y replegado de proteínas por cromatografía de afinidad (*Asa1* 28a, *Asa2* 28a, *Asa4 pQ*, *Asa4 28a*) y en condiciones nativas (*Ext-beta*)

Todo el procedimiento a 4 °C

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna 0.3 MPa o 0.5 Mpa con restrictor de flujo

Todos los lavados y equilibrio se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

1. Resuspender los CI lavados (equivalente a 1L) en 30 mL de PBS (500) 8U
2. Incubar con agitación leve durante 8-12 h a 4°C
3. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar lo no disuelto
4. Diluir con PBS (500) a una concentración final de urea 4M
5. Agregar imidazol a una concentración final de 10 mM de imidazol de una solución 1M de imidazol en el mismo amortiguador

En bomba peristáltica

6. Equilibrar una columna HisTrap FF Crude 5 mL con PBS (500) 4U
7. Recircular la muestra a un flujo de 1 mL/min 12 horas

En FPLC

8. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
 - a. Bomba A: PBS (500) 4U
 - b. Bomba B: Amortiguador de replegamiento
9. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador A
10. Conectar la columna
11. Lavar la columna hasta línea base con PBS (500) 4U
12. Replegar con gradiente de 0→100% de amortiguador B de 10 VC
13. Equilibrar la bomba A con amortiguador de elución
14. Eluir la proteína con un gradiente 100→0% de amortiguador de B de 10 VC
15. Colectar fracciones de 4 mL
16. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE y seleccionar las enriquecidas con la proteína de interés.
17. Reunir las fracciones enriquecidas, hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -70°C hasta su uso o continuar con el siguiente paso de purificación.

6.4.3. Cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharose (Asa2 3a, Asa4 3a)

Todo el procedimiento a 4 °C

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna 0.5 Mpa o 0.7 Mpa con restrictor de flujo

Todos los lavados y equilibrio se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

1. Resuspender los CI lavados (equivalente a 1L de cultivo) en 30 mL de PBS (500 8U)
2. Incubar con agitación leve durante 8-12 h a 4°C
3. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar lo no disuelto
4. Diluir 1:2 con amortiguador de replegamiento
5. Dializar la muestra contra 2L de amortiguador de replegamiento
6. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar el material agregado

En FPLC

7. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
 - a. Bomba A: Amortiguador de replegamiento
 - b. Bomba A: Amortiguador de replegamiento con 500 mM NaCl
8. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador A
9. Conectar la columna
10. Equilibrar la columna con amortiguador A
11. Cargar la muestra a la columna (por la bomba A o por la válvula de inyección)
12. Lavar la columna hasta línea base con amortiguador A
13. Eluir la proteína con un gradiente 0→100% de amortiguador de B de 10 VC
14. Colectar fracciones de 4 mL
15. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE y seleccionar las enriquecidas con la proteína de interés.
16. Reunir las fracciones enriquecidas, hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -70°C hasta su uso o realizar siguiente paso de purificación.

6.4.4. Cromatografía de intercambio aniónico Source 15Q 10/100 o MonoQ 10/100 (Asa4 pQ, Asa4 28a, Asa4 3a, Ext-beta)

Todo el procedimiento a 4 °C

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna: 2 MPa o 2.2 Mpa con restrictor de flujo (Source 15Q). 4 Mpa o 4.2 Mpa con restrictor de flujo (MonoQ)

Todos los lavados y equilibrio se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

La muestra proviene de:

Replegamiento/purificación en HisTrap FF 5 mL (Asa4 pQ, Asa4 28a)

DEAE-sepharose (Asa4 3a)

Cromatografía de afinidad en condiciones nativas (Ext-beta)

Dializar la muestra contra 2 L de amortiguador de replegamiento o diluir 1:10 en el mismo amortiguador

En FPLC

1. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
 - a. Bomba A: Amortiguador de replegamiento
 - b. Bomba B: Amortiguador de replegamiento con 500 mM NaCl
2. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador A
3. Conectar la columna
4. Equilibrar la columna con amortiguador A
5. Cargar la muestra a la columna (por la bomba A o por la válvula de inyección)
6. Lavar la columna hasta línea base con amortiguador A
7. Eluir la proteína con un gradiente 0→100% de amortiguador de B de 20 VC
8. Colectar fracciones de 2 mL
9. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE y seleccionar las enriquecidas con la proteína de interés.
10. Reunir las fracciones enriquecidas, hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -70°C hasta su uso.

6.4.5 Cromatografía de intercambio catiónico Source 15S 5/50 (OSCP 3a)

Todo el procedimiento a 4 °C

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna: 2 MPa o 2.2 Mpa con restrictor de flujo

Todos los lavados y equilibrio se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

1. Resuspender los CI lavados (equivalente a 0.5 L de cultivo) en 30 mL de PBS (500 8U)
2. Incubar con agitación leve durante 8-12 h a 4°C
3. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar lo no disuelto
4. Diluir 1:2 con amortiguador de replegamiento
5. Dializar la muestra contra 2L de amortiguador de replegamiento
6. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar el material agregado

En FPLC

7. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
 - a. Bomba A: Amortiguador de replegamiento
 - b. Bomba B: Amortiguador de replegamiento con 500 mM NaCl
8. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador A
9. Conectar la columna
10. Equilibrar la columna con amortiguador A
11. Cargar la muestra a la columna (por la bomba A o por la válvula de inyección)
12. Lavar la columna hasta línea base con amortiguador A
13. Eluir la proteína con un gradiente 0→100% de amortiguador de B de 20 VC
14. Colectar fracciones de 0.5 mL
15. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE y seleccionar las enriquecidas con la proteína de interés.
16. Reunir las fracciones enriquecidas, hacer alícuotas de 0.5 mL y congelar a -70°C hasta su uso.

6.4.6 Cromatografía de exclusión molecular (*Asa7 3a*)

Todo el procedimiento a 4 °C

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna: 0.15 MPa o 0.3 Mpa con restrictor de flujo

Todos los lavados y equilibrio se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

1. Resuspender los CI lavados (equivalente a 1 L de cultivo) en 30 mL de PBS (500)
8U
2. Incubar con agitación leve durante 8-12 h a 4°C
3. Centrifugar a 17000 xg/10 min para eliminar lo no disuelto
4. Concentrar hasta 1 mL

En FPLC

5. Equilibrar la bomba A con el amortiguador PBS (500) 8U
6. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador PBS (500) 8U
7. Conectar la columna
8. Equilibrar la columna con amortiguador PBS (500) 8U
9. Cargar la muestra a la columna por la válvula de inyección
10. Eluir la muestra a un flujo de 1 mL/min
11. Colectar fracciones de 1 mL
12. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE y seleccionar las enriquecidas con la proteína de interés.
13. Reunir las fracciones enriquecidas, hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -70°C hasta su uso.

6.4.7. Limpieza y regeneración de las columnas HisTrap FF

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la(s) columna(s) (0.5 Mpa)

Todos los lavados se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

Colocar las columnas en flujo reverso

Velocidad de flujo 1-2 mL/min

1. Lavar con agua
2. Remover el Ni con amortiguación de quelación
3. Lavar con agua
4. Eliminar uniones iónicas con NaCl 2 M
5. Lavar con agua
6. Eliminar proteínas precipitadas con NaOH 1 M
7. Incubar 4-6 h a temperatura ambiente
8. Recambiar la solución de NaOH 1 M
9. Incubar 4-6 h a temperatura ambiente
10. Recambiar la solución de NaOH 1 M
11. Incubar 12-16 h a temperatura ambiente
12. Lavar con agua
13. Eliminar material unido por interacciones hidrofóbicas con isopropanol al 30%
14. Lavar con Agua
15. Recargar la columna con NiSO₄ 0.1 M
16. Lavar con Agua
17. Guardar la columna en EtOH 20% hasta su uso

6.4.8. Limpieza y regeneración de las columnas Source 15Q MonoQ, Source 15S

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna (2 Mpa: Source 15Q y Source 15S, 4 Mpa; MonoQ)

Todos los lavados se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

Colocar las columnas en flujo reverso

Velocidad de flujo 1-2 mL/min

1. Lavar con agua
2. Eliminar material unido por uniones iónicas con NaCl 2 M
3. Lavar con agua
4. Eliminar material unido por proteínas precipitadas con NaOH 1 M
5. Lavar con agua
6. Eliminar material unido por uniones iónicas con NaCl 2 M
7. Lavar con agua
8. Eliminar material unido por interacciones hidrofóbicas con isopropanol al 30%
9. Lavar con agua
10. Guardar la columna en EtOH 20% hasta su uso

6.4.9. Limpieza y regenerado de columna DEAE-Sepharose

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna 0.5 Mpa

Todos los lavados se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

Colocar la columna en flujo reverso

Velocidad de flujo 1-2 mL/min

1. Lavar con agua
2. Eliminar uniones iónicas con NaCl 2 M
3. Lavar con agua
4. Eliminar proteínas precipitadas con NaOH 1 M
5. Lavar con agua
6. Eliminar uniones iónicas con NaCl 2 M
7. Lavar con agua
8. Eliminar interacciones hidrofóbicas con isopropanol al 30%
9. Lavar con agua
10. Guardar la columna en EtOH 20% hasta su uso

6.4.10. Limpieza de columna Sephadryl S-300

Siempre tomar en cuenta la presión máxima sobre la columna 0.15 Mpa o 0.3 Mpa con restrictor de flujo

Todos los lavados se llevan a cabo hasta obtener una línea base estable

Colocar la columna en flujo reverso

Velocidad de flujo 1-2 mL/min

1. Lavar con agua
2. Lavar con NaOH 0.5 M
3. Lavar con agua
4. Guardar la columna en EtOH 20% hasta su uso

6.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP

1. Purificar las subunidades Asa2 28a, Asa7-C 28a y OSCP 28a como se describe en el Anexo 13.1.-6.4 Purificación de las subunidades recombinantes.
2. Realizar un SDS-PAGE con Azul de Coomassie en el amortiguador de cátodo.
3. Cargar 50 µg por carril del gel
4. Realizar la separación a 100 V
5. Cortar las subunidades al finalizar la separación
6. Moler en mortero cada subunidad agregando TBS
7. Dividir en alícuotas equivalentes a 50 µg
8. Guardar las alícuotas a 20 °C hasta su uso
9. Tomar muestra por punción en la vena de la oreja a un conejo hembra
10. Separar el suero y guardar a -70°C hasta su uso
11. Descongelar una alícuota y mezclar con adyuvante completo de Freund (1:1)
12. Inocular intramuscularmente al conejo
13. Esperar 3 semanas
14. Descongelar 1 alícuota y mezclar con adyuvante incompleto de Freund (1:1)
15. Inocular intramuscularmente al conejo
16. Esperar 3 semanas
17. Repetir los pasos 12-14, dos veces más
18. Tomar muestra de sangre por punción en la vena de la oreja
19. Separar el suero
20. Probar por inmunorréplica tipo Western contra la subunidad utilizada
21. En caso de observar la presencia de anticuerpos específicos proceder con el punto 22, en caso contrario, repetir los puntos 12-14, dos veces más
22. Realizar toma de sangre a blanco
23. Separar el suero
24. Precipitar las inmunoglobulinas con sulfato de amonio al 40%
25. Resuspender en ¼ del volumen del suero inicial
26. Separar en alícuotas de 100 µL
27. Guardar a -70 °C hasta su uso
28. Realizar la titulación del anticuerpo contra la subunidad nativa en el complejo

6.6. Estudio de interacción entre las subunidades por métodos bioquímicos

6.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Preparar cuerpos de inclusión de las subunidades *Asa1*, *Asa2*, *Asa4*, *OSCP*, *Asa7* y *Asa8* a partir de 2 L de cultivo
2. Lavar los cuerpos de inclusión
3. Resuspender en 10 mL de PBS (500) 8U
4. Determinar la concentración de proteína
5. Realizar un SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie
6. Realizar densitometría de la tinción de cada banda
7. Determinar el porcentaje de la banda de interés en los cuerpos de inclusión lavados
8. Ajustar la concentración de cada subunidad a 0.1 mM
9. Perforar la tapa de un tubo Eppendorf de 2 mL
10. Colocar 2 nanomoles de cada subunidad aislada o en pares
11. Llevar a 220 µL con PBS (500) 8U
12. Colocar un pedazo de membrana que cubra la tapa del tubo y cerrar
13. Colocar en 250 mL del amortiguador correspondiente evitando la formación de burbujas en la membrana
14. Dializar a 4°C toda la noche
15. Tomar una muestra de 30 µL de cada muestra
16. Centrifugar a 10000 rpm/10 min
17. Separar pastilla y sobrenadante
18. Visualizar en un SDS-PAGE

6.6.2. Inmunorréplica tipo Far-Western

1. Cargar muestras de complejo V y la proteína de interés en un SDS-PAGE
2. Correr la electroforesis
3. Teñir un carril de ATPasa y otro de la proteína recombinante con azul de Coomassie
4. Transferir los carriles de interés a una membrana de nitrocelulosa
5. Teñir la membrana con rojo de Ponceau
6. Marcar cuidadosamente las bandas visibles con una aguja
7. Bloquear con solución de leche al 10% en TTBS 8-12 horas*
8. Lavar con TTBS 5 minutos, 2 veces
9. Incubar 3 horas cada banda con cantidades crecientes de la proteína recombinante
10. Lavar con TTBS 5 minutos, 2 veces
11. Incubar 3 horas con el anticuerpo primario correspondiente a la dilución deseada en 1% de leche en TTBS
12. Lavar con TTBS 5 minutos, 2 veces
13. Incubar 2 horas con el anticuerpo secundario a dilución 1:8000 en 1% de leche en TTBS
14. Lavar con TTBS 5 minutos, 2 veces
15. Agregar solución de revelado
16. Dejar reaccionar hasta visualizar las bandas
17. Detener la reacción enjuagando con agua

*Los volúmenes de incubación son de 5 mL para un carril, 10 mL para dos carriles, 20 mL para mayor número de carriles.

6.6.4. Generación de subcomplejos en geles azules nativos

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Tomar 2 nanomoles de cada subunidad o fragmento, así como la mezcla de ambos en un tubo Eppendorf
2. Agregar 1 µL de solución SDS 10%
3. Agregar 1 µL de solución de azul de Coomassie *Serva blue G* 5%
4. Agregar 1 µL de solución de DTT 100 mM
5. Incubar a 94 °C durante 10 minutos
6. Cargar las muestras a un BN-PAGE al 12% de acrilamida (fragmentos de Asa4) o 14% (fragmentos de Asa7)
7. Correr el gel a 80 V durante 1.5 h
8. Correr el gel a 200 V hasta el fin de la separación
9. Cortar las bandas de interés y realizar segunda dimensión desnaturizante

6.6.4. Purificación del complejo Asa2/Asa4/Asa7 estable

6.6.4.1. Cromatografía de exclusión molecular

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Colocar 5 mg de las subunidades Asa2, Asa4 y Asa7 purificadas
2. Llevar a 1.3 mL con amortiguador ASAS
3. Incubar 30 minutos en hielo
4. Centrifugar a 18000 xg 10 minutos para eliminar material agregado
5. Concentrar en un *Centricon centrifugal filter 10 000 NMWL* hasta 100 µL
6. Centrifugar a 18000 xg 10 minutos para eliminar material agregado

En FPLC

1. Equilibrar la bomba A con el amortiguador ASAS
2. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador ASAS
3. Conectar la columna Superose 12 10/300
4. Equilibrar la columna con amortiguador ASAS a un flujo de 0.5 mL/min
5. Cargar la muestra a la columna por la válvula de inyección
6. Eluir la muestra a un flujo de 1.3 mL/min
7. Colectar fracciones de 0.5 mL
8. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE
9. Hacer análisis densitométrico de las bandas presentes en cada fracción.
10. Reunir las fracciones con complejo (Asa2/Asa4/Asa7), hacer alícuotas de 0.5 mL y congelar a -70°C hasta su uso.

6.6.4.2. Cromatografía de afinidad

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Mezclar 10 mg de cada subunidad purificada (Asa4 3a y Asa7 28a)
2. Dializar contra dos litros de PBS (200) ASAS
3. Centrifugar la muestra a 17000 xg 10 minutos para eliminar material agregado
4. Agregar 500 µL de matriz Ni-Sepharose FF
5. Incubar 3 horas a 4 °C
6. Centrifugar a 2000 xg / 5 minutos y retirar el sobrenadante
7. Lavar 20 veces con 1 mL mismo amortiguador
8. Separar el subcomplejo Asa4/Asa7 con 2 lavados de 5 mL de 500 mM en el mismo amortiguador
9. Agregar 38 mg de Asa2 3a purificada
10. Dializar contra dos litros de PBS (200) ASAS
11. Centrifugar la muestra a 17000 xg 10 minutos para eliminar material agregado

En bomba peristáltica

12. Equilibrar una columna HisTrap FF Crude 1 mL con PBS (200) ASAS
13. Recircular la muestra a un flujo de 1 mL/min 12 horas

En FPLC

14. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
 - a. Bomba A: PBS (200) ASAS
 - b. Bomba B: PBS (200) ASAS + 500 mM Imidazol
15. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador A
16. Conectar la columna
17. Lavar la columna hasta línea base con Amortiguador A
18. Eluir el complejo Asa2/Asa4/Asa7 con un gradiente 0→100% de amortiguador de B de 20 VC

19. Colectar fracciones de 1 mL
20. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE
21. Hacer análisis densitométrico de las bandas presentes en cada fracción.
22. Reunir las fracciones con complejo, hacer alícuotas de 0.5 mL y congelar a -70°C hasta su uso.

Anexo 13.3. Oligomerización de la ATP sintasa y supracomplejos mitocondriales

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Preparar mitocondrias de *Polytomella sp* como se indica en el punto 13.4. *Exploración sobre las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial* de este anexo
2. Ajustar la concentración de proteína a 10 mg/mL
3. Solubilizar 250 mg de mitocondrias con n-dodecil-β-D-maltósido (2 mg detergente/mg proteína) a partir de una solución madre de 20 mg/mL
4. Centrifugar a 90000 xg durante 20 minutos (30 000 rpm/20 min/type 60 Ti)
5. Recuperar el sobrenadante
6. Diluir 3 veces en amortiguador A
7. Cargar en Source 15Q 10/100 GL (VC 8 mL) a un flujo de 1 mL/min, colectar lo no unido a la columna
8. Realizar el siguiente programa de elución
 - a. 15% (75 mM NaCl) (6 VC) Fracción: 6 mL
 - b. 30 → 50% (75-250 mM NaCl) (20 VC) Fracción: 2 mL
 - c. 50% (250 mM NaCl) (10 VC) Fracción: 2 mL
 - d. 50 → 100% (250-500 mM NaCl) (20 VC) Fracción: 2 mL
 - e. 100% (500 mM) (10 VC) Fracción: 2 mL
9. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE/BN-PAGE

1. Complejo V mitocondrial

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Juntar las fracciones enriquecidas con ATP sintasa (V₄/V₂) (aproximadamente 50 mL)
2. Dividir la muestra en dos partes
3. Concentrar las fracciones con ATPasa hasta un volumen de 4 mL en *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL*
4. Agregar glicerol a >30% y ATP a 1 mM (concentración final)
5. Concentrar hasta un volumen de 1000 μL

1.1.Intentos de separación de los oligómeros V₄ y V₂

La muestra obtenida en el punto 8.1 se utilizó para la separación de oligómeros de ATP sintasa

1.1.1. Exclusión molecular (los datos en paréntesis son en caso de dos columnas conectadas en serie)

Todo el procedimiento a 4 °C

En FPLC

1. Equilibrar la bomba A con el amortiguador Superose
2. Equilibrar la tubería y detector con amortiguador Superose
3. Conectar una o dos columna Superose 6 10/300
4. Equilibrar la(s) columna(s) con amortiguador Superose a un flujo de 0.5 mL/min (0.1 mL/min)
5. Cargar la muestra (400 µL) a la columna por la válvula de inyección
6. Eluir la muestra a un flujo de 0.25 mL/min (0.1 mL/min)
7. Colectar fracciones de 0.5 mL
8. Visualizar las fracciones en BN-PAGE
9. Reunir fracciones con V₄ y V₂

1.1.2. Gradiente de densidad

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Preparar soluciones de 10, 20, 30, 40 y 50% de glicerol en amortiguador de solubilización por dilución de una solución madre de 50% en el mismo amortiguador.
2. Colocar con cuidado 1 mL de solución 50% en el fondo del tubo
3. Colocar muy despacio por las paredes del tubo 1 mL de solución 40%
4. Colocar muy despacio por las paredes del tubo 1 mL de solución 30%
5. Colocar muy despacio por las paredes del tubo 1 mL de solución 20%
6. Colocar muy despacio por las paredes del tubo 1 mL de solución 10%
7. Colocar muy despacio por las paredes del tubo 500 µL de la muestra de V₄/V₂

8. Centrifugar a 40 000 xg durante 17 h en rotor SW41Ti
9. Colectar fracciones de 500 µL
10. Visualizar las fracciones mediante BN-PAGE

1.2. Efecto de diversos agentes sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial

1.2.1. Efecto de concentración

Todo el procedimiento a 4 °C

1. Seleccionar muestras enriquecidas con tetrámeros y dímeros a partir de las fracciones de la cromatografía de exclusión (1.2 mL totales), tomar muestra
2. Concentrar las muestras hasta un volumen de 0.2 mL en un *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL*, tomar muestra
3. Continuar la concentración hasta un volumen de 0.1 mL, tomar muestra
4. Visualizar las muestras mediante BN-PAGE

1.2.2. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la oligomerización del complejo

1.2.2.1. Efecto del n-dodecil-β-D-maltósido (LM)

1. Colocar de muestra V₄/V₂ y cantidades crecientes de n-dodecil-β-D-maltósido como se indica en la siguiente tabla:

[LM]	Muestra V ₄ /V ₂ (µL)	Amortiguador de solubilización (µL)	Solución madre de LM a 20% (µL)	Solución madre de LM a 2% (µL)	Solución madre de LM a 0.2% (µL)
0.01%	10	10	-	-	-
0.02%	10	8	-	-	2
0.04%	10	6	-	-	4
0.08%	10	2	-	-	8
0.1%	10	-	-	-	10
0.5%	10	5	-	5	-
1%	10	-	-	10	-
10%	10	-	10	-	-

2. Incubar las muestras durante 2 h a 4 °C
3. Visualizar las muestras durante 2 h a 4 °C

1.2.2.2. Efecto del CHAPS

1. Colocar de muestra V_4/V_2 y cantidades crecientes de CHAPS como se indica en la siguiente tabla:

[LM]	Muestra V_4/V_2 (μL)	Amortiguador de solubilización (μL)	Solución madre de LM a 10% (μL)	Solución madre de LM a 1% (μL)	Solución madre de LM a 0.1% (μL)
0.01%	10	8	-	-	2
0.1%	10	8	-	2	-
0.5%	10	-	-	10	-
1.0%	10	8	2	-	-
5.0%	10	-	10	-	-

2. Incubar las muestras durante 2 h a 4 °C
3. Visualizar las muestras durante 2 h a 4 °C

1.2.2.3. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la oligomerización del complejo

1. Colocar de muestra V_4/V_2

Muestra V_4 (μL)	Amortiguador de solubilización (μL)	Solución madre de LM a 1% (μL)	Solución madre de OG a 1% (μL)	Solución madre de βM a 5% (μL)	Incubación (°C)
10	10	-	-	-	4 °C
10	6	4	-	-	4 °C
10	6	4	-	-	25 °C
10	2	4	-	4	4 °C
10	2	4	-	4	25 °C
10	6	-	4	-	4 °C
10	6	-	4	-	25 °C
10	2	-	4	4	4 °C
10	2	-	4	4	25 °C
10	10	-	-	-	65 °C 3 min

2. Incubar 1.5 horas
3. Visualizar las muestras en BN-PAGE

1.2.3. Efecto de fosfolípidos sobre la oligomerización del complejo

Preparación de la suspensión de fosfatidilcolina de soya (FC)

1. Pesar 10 mg de fosfatidilcolina de soya (Fluka BioChemika)
2. Agregar 1 mL de EtOH

3. Agitar en vórtex
4. Agregar 9 mL de agua con 0.01% de n-dodecil-β-D-maltósido
5. Sonicar 1 min a 5 Watts de potencia en pulsos de 50%
6. Utilizar esta dispersión de acuerdo con la siguiente tabla:

[FC] mM	Muestra V ₄ /V ₂ (μL)	Solución de FC 1 mg/mL (μL)	Solución de FC 100 μg/mL (μL)	Solución de FC 10 μg/mL(μL)	Amortiguador de solubilización (μL)
0	10	0	-	-	40
2 x 10 ⁻³	10	-	-	10	30
5 x 10 ⁻³	10	-	-	25	15
0.01	10	-	5	-	35
0.02	10	-	10	-	30
0.04	10	-	20	-	20
0.1	10	5	-	-	35
0.2	10	10	-	-	30
0.3	10	15	-	-	25
0.4	10	20	-	-	20

7. Incubar 60 minutos a 4 °C
8. Visualizar las muestras en BN-PAGE

1.3. Visualización de oligómeros de la ATP sintasa mediante microscopía electrónica

1. Seleccionar la muestra con mezcla de V₄/V₂ (aproximadamente 0.5 mg/mL)
2. Diluir 40 veces en agua
3. Colocar 6 μL de esta solución sobre una rejilla cubierta de carbono ionizada
4. Dejar unir durante 1 minuto
5. Lavar 2 veces la muestra con agua
6. Teñir con solución de acetato de uranilo al 1% durante 1 minuto
7. Visualizar las rejillas en microscopio

2. Supracomplejos de la cadena de transporte de electrones

2.1. Solubilización de mitocondrias con n-dodecil-β-D-maltósido y digitonina

1. Preparar mitocondrias de *Polytomella sp* como se indica en el punto *13.4. Exploración sobre las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial* de este anexo
2. Ajustar la concentración de proteína a 10 mg/mL
3. Solubilizar 2 mg de mitocondrias (200 µL) con n-dodecil-β-D-maltósido o digitonina (2 mg detergente/mg proteína) a partir de una solución madre de 100 mg/mL (40 µL)
4. Incubar en hielo durante 30 minutos (agitarse con la punta de una pipeta cada 5 minutos)
5. Centrifugar a 14000 xg durante 20 minutos
6. Recuperar el sobrenadante
7. Preparar un gel nativo de gradiente de poliacrilamida del 3-10% (adicinar 20 µL de la solución madre de digitonina a cada mezcla del gel)
8. Cargar varios carriles del gel y realizar la migración electroforética
9. Cortar las bandas de la 1D BN-PAGE
10. Realizar tinción de actividad para los complejos I, IV y V a una banda correspondiente a cada detergente
11. Separar cada complejo en sus subunidades mediante 2D SDS-PAGE de una banda del 1D BN-PAGE
12. Realizar tinción de plata al 2D SDS-PAGE

2.2. Caracterización de los supracomplejos reconstituidos mediante cromatografía de intercambio iónico.

1. Reunir las fracciones correspondientes a los picos 2 y 3 de la elución
2. Concentrar cada muestra hasta un volumen final de 2 mL con un *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL*
3. Preparar un gel nativo de gradiente de poliacrilamida del 3-10%

4. Cargar varios carriles del gel y realizar la migración electroforética
5. Cortar las bandas de la 1D BN-PAGE
6. Realizar tinción de actividad para los complejos I y IV a una banda correspondiente a cada muestra
7. Transferir 3 bandas de la primera dimensión a una membrana de PVDF
8. Realizar una inmunorréplica tipo Western a cada membrana utilizando anticuerpos contra los complejos I, III y IV
9. Separar cada complejo en sus subunidades mediante 2D SDS-PAGE de una banda del 1D BN-PAGE
10. Realizar tinción de plata al 2D SDS-PAGE

2.3. Separación de los supracomplejos reconstituidos mediante cromatografía de exclusión molecular.

1. Concentrar la muestra del pico 3 hasta un volumen de 1 mL con un *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL*
2. Equilibrar la columna Sephadryl S-300 17/70 con el amortiguador correspondiente a un flujo de 0.5 mL/min
3. Cargar la muestra (1000 µL) a la columna por la válvula de inyección
4. Eluir la muestra a un flujo de 0.5 mL/min
5. Colectar fracciones de 1.0 mL
6. Visualizar fracciones mediante BN-PAGE
7. Seleccionar las fracciones enriquecidas con los complejos de interés
8. Preparar un gel nativo de gradiente de poliacrilamida del 3-10% de 10 pozos
9. Cargar varios carriles del gel y realizar la migración electroforética
10. Cortar las bandas de la 1D BN-PAGE
11. Realizar tinción de actividad para los complejos I y IV a una banda correspondiente a cada muestra
12. Separar cada complejo en sus subunidades mediante 2D SDS-PAGE de tres bandas del 1D BN-PAGE

13. Realizar tinción de Coomassie al 2D SDS-PAGE
14. Transferir 2 geles 2D SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa
15. Realizar una inmunorréplica tipo Western a cada membrana, utilizando anticuerpos contra los complejos I y IV

2.4. Purificación de los complejos mitocondriales mediante cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido

1. Preparar mitocondrias de *Polytomella sp* como se indica en el punto 13.4. *Exploración sobre las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial* de este anexo
2. Ajustar la concentración de proteína a 10 mg/mL
3. Solubilizar 250 mg de mitocondrias con n-dodecil-β-D-maltósido (2 mg detergente/mg proteína) a partir de una solución madre de 20 mg/mL
4. Centrifugar a 90000 xg durante 20 minutos (30 000 rpm/20 min/type 60 Ti)
5. Recuperar el sobrenadante
6. Diluir 3 veces en amortiguador A
7. Cargar en Source 15Q 10/100 GL (VC 8 mL) a un flujo de 1 mL/min, colectar lo no unido a la columna
8. Eluir la columna mediante un gradiente de 0-100% de amortiguador B a un flujo de 1.5 mL/min
9. Colectar fracciones de 3 mL
10. Visualizar las fracciones en SDS-PAGE/BN-PAGE
11. Seleccionar las fracciones que contengan a los complejos de interés
12. Preparar un gel nativo de gradiente de poliacrilamida del 4-12% de 10 pozos
13. Cargar varios carriles del gel y efectuar la migración electroforética
14. Cortar las bandas de la 1D BN-PAGE
15. Realizar tinción de actividad para los complejos I y IV a una banda correspondiente a cada muestra
16. Separar cada complejo en sus subunidades mediante 2D SDS-PAGE de tres banda del 1D BN-PAGE
17. Realizar tinción de Coomassie al 2D SDS-PAGE

2.5. Purificación de los complejos I y IV mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido

1. Concentrar la muestra del pico 2 de la cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido hasta un volumen de 0.5 mL con un *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL*
2. Equilibrar la columna Superose 6 10/300 GL con el amortiguador correspondiente a un flujo de 0.5 mL/min
3. Cargar la muestra (500 µL) a la columna por la válvula de inyección
4. Eluir la muestra a un flujo de 0.25 mL/min
5. Colectar fracciones de 0.5 mL
6. Visualizar fracciones mediante BN-PAGE
7. Realizar tinción de actividad para los complejos I y IV
8. Separar las subunidades de los complejos mediante SDS-PAGE
9. Transferir los geles SDS a una membrana de nitrocelulosa
10. Realizar inmunorréplica tipo Western utilizando un anticuerpo contra la subunidad COX2B del complejo IV

2.6 Zimografía en gel de los complejos respiratorios

1. Separar la muestra mediante BN-PAGE
2. Cortar las bandas de interés

2.6.1 NADH/NBT oxido reductasa

3. Incubar las bandas en 20 mL de solución de Tris 10 mM pH 7
4. Adicionar 100 µL de una solución de NADH 100 mM
5. Adicionar 100 µL de una solución de NBT 15 mg/mL
6. Incubar 15-30 minutos con agitación leve
7. Escasear el gel en el momento
8. Detener la reacción incubando con solución de metanol 50%

2.6.2 Citocrome c oxidasa

3. Incubar las bandas en 20 mL de solución de fosfatos 50 mM pH 7.4
4. Adicionar 250 µL de una solución de citocromo *c* de corazón caballo 10 mg/mL
5. Adicionar 250 µL de una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclohidrato 20 mg/mL
6. Incubar 1-2 horas con agitación leve
7. Escanear el gel en el momento
8. Detener la reacción incubando con solución de metanol 50%

2.6.3. Hidrólisis de ATP

3. Incubar las bandas en amortiguador de glicina 270 mM, tris 35 mM pH 8.4 durante 3 horas
4. Cambiar las bandas a un amortiguador de glicina 270 mM, tris 35 mM, MgSO₄ 14 mM, Pb(NO₃)₂ 0.2% pH 8.4 durante 15 minutos
5. Agregar 100 mg de ATP disuelto al momento en 1 mL del amortiguador del punto 3
6. Incubar 4 – 12 horas con agitación leve
7. Escanear el gel en el momento
8. Detener la reacción incubando con solución de metanol 50%

2.7 Cuantificación de proteína total mediante el método de Lowry-Markwell

Soluciones:

- 1) Na_2CO_3 20%
- 2) Tartrato de Na/K 1%
 CuSO_4 0.5%
- 3) NaOH 0.8 N
- 4) SDS 10%
- 5) Solución 1 mg/mL de albumina sérica de bovino libre de ácidos grasos (ABS)

Solución A:

- 1/8 de solución de Na_2CO_3 20%
- 1/8 de solución de Tartrato de Na/K 1%/ CuSO_4 0.5%
- 1/4 de solución de NaOH 0.8 N
- 1/4 de solución de SDS 10%
- 1/4 de agua

Solución B:

- 1/6 de solución comercial *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent* (sigma)
- 5/6 de agua

Procedimiento

1. Prepara una curva de calibración con 6 puntos entre 0-100 μg de ABS
2. Tomar entre 20-80 μg de muestra (entre 0-100 μL) en tubos nuevos
3. Llevar a 100 μL con agua
4. Agregar 1 mL de solución A
5. Agitar en vortex
6. Incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos
7. Agregar 0.5 mL de solución B
8. Agitar en vortex
9. Incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 45 minutos
10. Leer la absorbancia a 750 nm

2.8 Tinción de plata para geles de poliacrilamida

Soluciones

Fijadora **100 mL**

Metanol	50 mL
Ácido acético glacial	12 mL
Formaldehído 37%	50 µL

Solución de tiosulfato **100 mL**

Tiosulfato de sodio 200 µg/mL	20 mg
-------------------------------	-------

Solución de nitrato plata **100 mL**

Nitrato de plata	0.2 g
Formaldehído 37%	75 µL

Solución reveladora **100 mL**

Carbonato de sodio	6 g
Formaldehído 37 %	50 µL
Solución de tiosulfato	2 mL

Procedimiento

1. Incubar el gel toda la noche con 100 mL de una solución fijadora
2. Lavar 10 minutos con etanol al 50% 3 veces
3. Incubar con 100 mL de solución de tiosulfato de sodio preparada al momento
4. Lavar 10 segundos con agua 3 veces
5. Incubar 2:00 horas con 100 mL de nitrato de plata
6. Lavar 1 minuto con agua 2 veces
7. Incubar con solución reveladora hasta obtener la intensidad de bandas deseada
8. Escasear el gel inmediatamente
9. Detener la reacción con 1 mL de ácido acético glacial

Anexo 13.4. Exploración sobre las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial

1. Subunidad Asa4

Todo el procedimiento a 4 °C

2. Purificar la subunidad Asa4 pQ como se describe en el Anexo 13.1, puntos 6.4.2 y 6.4.4.
3. Determinar la concentración de las fracciones eluídas de la MonoQ (aproximadamente 0.5 mg/mL)
4. Concentrar en un *Centriprep YM-10, 10 kDa NMWL* (Millipore) hasta una concentración final de 10 mg/mL
5. Centrifugar a 18000 xg/10 min para remover el material agregado
6. Utilizar una placa de cristalización de 96 pozos con 3 gotas en cada pozo
7. Colocar 100 µL de cada amortiguador en el pozo correspondiente de los sistemas Cristal Screen e Index Screen (Hampton Research)
8. Colocar **rápidamente** 1 µL de cada amortiguador en el espacio correspondiente a cada gota
9. Colocar **rápidamente** 1 µL de la solución de Asa4 concentrada
10. Cerrar **rápidamente** la placa asegurando un aislamiento de cada pozo
11. Incubar a 4°C
12. Observar cada día y anotar las observaciones

2. Complejo V mitocondrial

Todo el procedimiento a 4 °C

2.1. Protocolo de purificación de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp

- 1.** Cultivar 35 L de *Polytomella* sp en medio *Polytomella*.
- 2.** Bajar a 7500 xg por 10 min (5000 rpm/JA 10)
- 3.** Lavar con amortiguador de sacarosa
- 4.** Bajar a 7500 xg por 25 min (JA 25.50)
- 5.** Descartar sobrenadante y el botón de almidón
- 6.** Resuspender en amortiguador de sacarosa (80-100 mL)
- 7.** Dividir en dos (50 mL) * **repetir los pasos 8-15 para cada muestra**
- 8.** Romper 6 veces con el vástago de teflón
- 9.** Centrifugar 7500 xg por 15 min (JA 25.50)
- 10.** Guardar el sobrenadante y resuspender el botón (células no rotas) volver a romper
- 11.** Romper 6 veces con el vástago
- 12.** Centrifugar 7500 xg por 15 min (JA 25.50)
- 13.** Guardar el sobrenadante
- 14.** Reunir ambos sobrenadantes y centrifugar a 17500 xg por 20 min (12000 rpm/JA 25.50)
- 15.** Guardar el botón (mitocondrias)
- 16.** Centrifugar el sobrenadante a 17500 xg por 20 min (12000 rpm/JA 25.50)
- 17.** Guardar el botón (mitocondrias)
- 18.** Resuspender en la mínima cantidad de amortiguador y juntar ambos botones
- 19.** Determinar la concentración de proteína (aproximadamente 25-40 mg/mL)
- 20.** Diluir a una concentración de 10 mg/mL en amortiguador de solubilización
- 21.** Solubilizar 250 mg de mitocondrias con n-Dodecil-β-D-maltósido (2 mg detergente/mg proteína) a partir de una solución madre de 10 mg/mL
- 22.** Incubar con agitación leve en hielo por 30 minutos
- 23.** Centrifugar a 90000 xg durante 20 minutos (30 000 rpm/20 min/type 60 Ti)
- 24.** Recuperar el sobrenadante

- 25.** Diluir 3 veces en amortiguador A
- 26.** Cargar en Source 15Q 10/100 GL (VC 8 mL) a un flujo de 1 mL/min, colectar lo no unido a la columna
- 27.** Lavar con 20% de amortiguador B (50 mM NaCl) (2VC) colectar fracciones de 6 mL
- 28.** Lavar con 30% de amortiguador B (75 mM NaCl) (2VC) colectar fracciones de 6 mL
- 29.** Eluir con un gradiente 30 – 100% de amortiguador B (20VC) colectar fracciones de 2 mL
- 30.** Visualizar las fracciones en SDS-PAGE/BN-PAGE
- 31.** Reunir fracciones con ATPasa (aproximadamente 50 mL)
- 32.** Dividir en dos (25 mL) * **Repetir los pasos 32 – 37 para cada muestra**
- 33.** Concentrar las fracciones con ATPasa a 4 mL en *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL*
- 34.** Agregar glicerol a >30% y ATP a 1 mM (concentración final)
- 35.** Concentrar hasta 400 µL
- 36.** Inyectar a columna Superose 6 10/300 GL (VC 24 mL) equilibrada con amortiguador superose
- 37.** Correr la columna a 0.25 mL/min
- 38.** Colectar fracciones de 500 µL
- 39.** Visualizar las fracciones en SDS-PAGE/BN-PAGE
- 40.** Reunir fracciones con ATPasa de ambas inyecciones
- 41.** Determinar la concentración de proteína

2.2. Pruebas de cristalización

1. Concentrar las fracciones con ATPasa en un *Centricon centrifugal filter 100 000 NMWL NUEVO* hasta 8 mg/mL
2. Centrifugar 18000 xg/10 min para eliminar material agregado
3. Utilizar esta solución para pruebas de cristalización mediante un equipo *Cartesian Honeybee Nano Dispensor 961* (Genomics Solutions)

13.2 Soluciones

A. Biología molecular

Amortiguador TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
Ajustar pH 8.5	

Amortiguador TENS

Amortiguador TE	1X
NaOH	0.1 N
SDS	0.5%

Amortiguador TAE (50X)

Trizma Base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5M (pH8.0)	100 mL

Amortiguador TAE (1X)

Diluir amortiguador TAE (50X) 1:50 en agua destilada

Amortiguador TB

100 mL

18) Pipes	0.3 g
19) CaCl ₂ *2H ₂ O	0.22 g
20) KCl	1.86 g

21) Ajustar a pH 6.7 con KOH 1 N

22) Agregar 1.09g de MnCl₂

23) Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm

24) Guardar a 4 °C

Medio LB líquido

1 L

Bactotriptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Esterilizar por autoclave a 121°C, 15 lb por 25 min

Medio LB sólido

1 L

Bactotriptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g

Esterilizar por autoclave a 121°C, 15 lb por 25 min

Dejar enfriar aproximadamente a 50°C *

Vaciar en cajas Petri

* Agregar antibiótico en caso de ser necesario

Medio LB + IPTG y x-gal

Preparar cajas de medio LB sólido con ampicilina.

Agregar 10 µL de una solución 1 M de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranósido)

Agregar 20 µL de una solución 50mg/mL de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido)

Antibióticos	Solución madre	Concentración de uso
Ampicilina	100 mg/mL en H ₂ O	100 µg/mL
Kanamicina	50 mg/mL en H ₂ O	50 µg/mL
Cloranfenicol	34 mg/mL en EtOH	34 µg/mL
Tetraciclina	12.5 mg/mL en EtOH/H ₂ O	12.5 µg/mL

Amortiguador de carga DNA (Loading Dye)

Azul de bromofenol	0.25 %
Xilen-cianol FF	0.25 %
Glicerol	30 %

Disolver en agua y guardar alícuotas a -20°C.

Gel de agarosa 1%

Disolver un gramo de agarosa en 100 mL de amortiguador TAE

Bromuro de etidio

Disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua.

B. Electroforesis

SDS-PAGE

Solución de carga

SDS	10 %	25 mL
Glicerol	30 %	2.5 g
Tris	100 mM	7.5 g
Azul de Coomassie	0.3 %	1.25 g
Mercaptoetanol	4 %	75 mg
Ajustar a pH 6.8		1 mL

Solución madre de acrilamida

Acrilamida	30 %	100 mL
Bis-acrilamida	0.98 %	30 g

Filtrarla y guardar a 4°C

Amortiguador electroforético

Tris	3 M	500 mL
HCl	1 N	181.7 g
SDS	0.3 %	40.3 ml

1.5 g

Mezclas para los geles SDS-PAGE

	Gel separador			Gel concentrador
	10%	12%	14%	4%
Solución madre de acrilamida	2.5 mL	3.0 mL	3.5 mL	400 µL
Amortiguador electroforético	4 mL	3.5 mL	3.0 mL	800 µL
Glicerol 79.5%	1 mL	1 mL	1 mL	
Agua				1.85 mL
Persulfato de Amonio 10%		40 µL		40 µL
TEMED		5 µL		5 µL

Amortiguador cátodo

Tris	0.1 M	3 L
Tricina	0.1 M	36.3 g
SDS	0.1 %	53.8 g

3 g

Amortiguador cátodo con azul de Coomassie

Tris	0.1 M	3 L
Tricina	0.1 M	36.3 %
SDS	0.05 %	53.8 %
Azul de Coomassie (SERVA Blue G)	0.05 %	1.5 %

1.5 %

Amortiguador ánodo

3 L

Tris-HCl pH 8.9	0.1 M	36.4 g
--------------------	-------	--------

Solución teñidora

EtOH	50 %
Ácido acético	10 %
Coomassie Blue R-250	0.1 %

Solución desteñidora

10% de ácido acético en agua

Solución teñidora de rojo de Ponceau

0.1% de rojo de Ponceau en 5% de ácido acético

BN-PAGE

Solución madre de acrilamida 40%	100 mL
Acrilamida	40 %
Bis-acrilamida	1.2 %

Filtrarla y guardar a 4°C

Solución madre de acrilamida 48%	100 mL
Acrilamida	48 %
Bis-acrilamida	1.5 %

Filtrarla y guardar a 4°C

Amortiguador 3X	pH 7.0	100mL
Ácido ε-aminocaproico	1.5 M	19.4 g
Bis-Tris	150 mM	3.14 g

Amortiguador de cátodo

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

Amortiguador de ánodo	pH 7.0	1L
Bis-Tris	50 mM	10.46 g

Amortiguador de carga	pH 7.0	50 mL
Ácido ε-aminocaproico	750 mM	4.92 g
Bis-Tris	50 mM	0.52 g

Azul de Coomassie Serva G al 5% en agua

Mezclas para los geles BN-PAGE de gradiente (Solución madre de acrilamida 48%)

	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
Agua	2.48	2.38	2.28	2.18	2.1	2	1.9	1.8	1.7
3X	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504
Acrilamida	0.172	0.272	0.372	0.46	0.56	0.66	0.76	0.86	0.96
Glicerol	0.322	0.322	0.322	0.322	0.322	0.322	0.322	0.322	0.322
APS	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TEMED	5	5	5	5	5	5	5	5	5

	11%	12%	13%	14%	15%	16%	17%	18%	Conc
Agua	0.66	0.56	0.496	0.396	0.296	0.196	0.1	0	1.75
3X	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1.504	1
Acrilamida	1.02	1.12	1.2	1.3	1.39	1.49	1.58	1.68	0.25
Glicerol	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	-
APS	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TEMED	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Mezclas para los geles BN-PAGE para visualizar supracomplejos (3-10%)

	Gel separador		Gel concentrador
	3 %	10 %	3 %
Agua	2.28 mL	0.56 mL	1.775 mL
Amortiguador 3X	1.508 mL	1.508 mL	1 mL
Solución madre de acrilamida 40%	0.372 mL	1.12 mL	0.225 mL
Glicerol 80%	0.322 mL	1.285 mL	
Persulfato de amonio 10%	20 µL	20 µL	20 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL

C. Cromatografía

6.4.1. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (Ni) en condiciones desnaturalizantes (*OSCP 28a, Asa7 28a, Asa8, Asa4-N 28a, Asa4-C 28a, Asa7-N 28a, Asa7-C 28a, OSCP-N 28a*)

PBS(500)	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM	690 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
PBS(500) 8U	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM	690 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
Urea	8 M	48.1 g
PBS(500) 1000I	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM	690 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
Imidazol	1000 mM	6.8 g
PBS(500) 4U	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM	690 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
Urea	8 M	24 g
PBS(500) 4U 500I	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM	690 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
Urea	8 M	24 g
Imidazol	500 mM	3.4 g

6.4.2. Purificación y replegado de proteínas por cromatografía de afinidad (*Asa1 28a, Asa2 28a, Asa4 pQ, Asa4 28a*) y en condiciones nativas (*Ext-beta*)

El EDTA y el DTT se agregan en los tubos de la elución a partir de una solución madre 20X

Amortiguadores de replegamiento

Asa1	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 Mm	690 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
Urea	0.5 M	3.0 g
Glicerol	2 %	2 mL
Tween	0.5 %	500 µL

Asa2 CEDGN(500)	pH 10	100 mL
CAPS	50 mM	1.105 g
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
NaCl	500 mM	2.9 g
Tween 20	0.05 %	50 µL

Asa4 CEDGN(500)	pH 10	100 mL
CAPS	50 mM	1.105 g
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
NaCl	500 mM	2.9 g
Tween 20	0.05 %	50 µL

Ext beta PBS(500)	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM

Amortiguadores de elución

Asa1 FEDGNU 500I	pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 mM	690 mg
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
NaCl	500 mM	2.9 g
Urea	0.5 M	3.0 g
Glicerol	2 %	2 mL
Tween	0.5 %	500 µL
Imidazol	500 mM	3.4 g

Asa2 CEDGN(500) 500 I	pH 10	100 mL
CAPS	50 mM	1.105 g
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
NaCl	500 mM	2.9 g
Tween 20	0.05 %	50 µL
Imidazol	500 mM	3.4 g

Asa4 CEDGN(500) 500I pH 10	100 mL
CAPS 50 mM	1.105 g
EDTA 0.5 mM	18.2 mg
DTT 1 mM	15.4 mg
Glicerol 2 %	2 mL
NaCl 500 mM	2.9 g
Tween 20 0.05 %	50 µL
Imidazol 500 mM	3.4 g

Ext beta PBS(500) pH 7.8	100 mL
NaH ₂ PO ₄ 50 mM	690 mg
NaCl 500 mM	2.9 g
Imidazol 500 mM	3.4 g

6.4.3. Cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sepharose (*Asa2 3a, Asa4 3a*)

Amortiguador de diáisis (replegamiento)

Asa2 CEDGN(0) pH 10	100 mL
CAPS 50 mM	1.105 g
EDTA 0.5 mM	18.2 mg
DTT 1 mM	15.4 mg
Glicerol 2 %	2 mL
Tween 20 0.05 %	50 µL

Asa4 CEDGN(0) pH 10	100 mL
CAPS 50 mM	1.105 g
EDTA 0.5 mM	18.2 mg
DTT 1 mM	15.4 mg
Glicerol 2 %	2 mL
Tween 20 0.05 %	50 µL

Amortiguador de elución

Asa2 CEDGN(500) pH 10	100 mL
CAPS 50 mM	1.105 g
EDTA 0.5 mM	18.2 mg
DTT 1 mM	15.4 mg
Glicerol 2 %	2 mL
NaCl 500 mM	2.9 g
Tween 20 0.05 %	50 µL

Asa4 CEDGN(500)	pH 10	100 mL
CAPS	50 mM	1.105 g
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
NaCl	500 mM	2.9 g
Tween 20	0.05 %	50 µL

**6.4.4. Cromatografía de intercambio aniónico Source 15Q 10/100 o MonoQ 10/100
(Asa4 pQ, Asa4 28a, Asa4 3a, Ext-beta)**

Asa4 pQ, Asa4 28a, Asa4 3a

CEDGN(0)	pH 10	100 mL
CAPS	50 mM	1.105 g
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
Tween 20	0.05 %	50 µL

CEDGN(500)	pH 10	100 mL
CAPS	50 mM	1.105 g
EDTA	0.5 mM	18.2 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
NaCl	500 mM	2.9 g
Tween 20	0.05 %	50 µL

Ext-beta

TBS (0)	pH 8.0	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g

TBS(500)	pH 8.0	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
NaCl	500 mM	2.9 g

6.4.5 Cromatografía de intercambio catiónico Source 15S 5/50 (OSCP 3a)

Amortiguador de replegamiento

MEDGNT(0)	pH 6	100 mL
Mes	20 mM	0.43 g
EDTA	1 mM	36.4 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
Tween 20	0.05 %	50 µL

Amortiguador de elución

MEDGNT(500)	pH 6	100 mL
Mes	20 mM	0.43 g
EDTA	1 mM	36.4 mg
DTT	1 mM	15.4 mg
Glicerol	2 %	2 mL
Tween 20	0.05 %	50 µL
NaCl	500 mM	2.9 g

Limpieza y regeneración de las columnas

Amortiguador de quelación	pH 7.4	100 mL
NaH ₂ PO ₄	50 Mm	690 mg
EDTA	50 mM	1.87 g
NaCl	500 mM	2.9 g

NaCl	2 M	11.6 g
NaOH	1 M	5 g
NaOH	0.5 M	2.5 g
Isopropanol	30 %	30 mL
NiSO ₄	0.1 M	1.55 g
EtOH	20 %	20 mL

6.5. Generación de anticuerpos contra las subunidades Asa2, Asa7-C y OSCP

Amortiguador de transferencia		1L
Tris	25 mM	3 g
Glicina	192 mM	14.4 g
MetOH	20 %	200 mL
SDS	0.1 %	1 g

Amortiguador salino de Tris (TBS) pH 7.5		1 L
Tris	20 mM	2.4 g
NaCl	0.5 M	29.2 g

Amortiguador salino de Tris y Tween (TTBS) pH 7.5		1 L
Tris	20 mM	2.4 g
NaCl	0.5 M	29.2 g
Tween-20	0.05 %	0.5 mL

Amortiguador de revelado	pH 9.8
NaHCO ₃	0.1 M
MgCl ₂	1 mM

BCIP

60 mg de BCIP en 2.8 mL de dimetil formamida (DMF) y 1.2 mL H₂O

NBT

30 mg NBT en 4 mL H₂O

Solución reveladora

20 mL de solución de revelado

Adicionar 200 µL de BCIP

Adicionar 200 µL de NTB

6.6. Estudio de interacción entre las subunidades por métodos bioquímicos

6.6.1. Replegamiento y estabilidad al pH

pH 2

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	500 mM

pH 4

CH ₃ COO ⁻ Na ⁺	20 mM
NaCl	500 mM

pH 6

Mes	20 mM
NaCl	500 mM

pH 7

MOPS	20 mM
NaCl	500 mM

pH 8

Tris	20 mM
NaCl	500 mM

pH 10

CAPS	20 mM
NaCl	500 mM

6.6.2. Inmunorréplica tipo Far-Western

La incubación con la proteína recombinante se realiza en los siguientes amortiguadores:

Asa1	Amortiguador de replegamiento
Asa2	Amortiguador de replegamiento
Asa4	Amortiguador de replegamiento
OSCP	Amortiguador de replegamiento
Asa7	TTBS (500)
Asa8	TTBS (500)

6.6.5. Generación de subcomplejos en geles azules nativos

SDS 10 %

Azul de Coomassie *Serva blue G* 5 %

DTT **100 mM**

Amortiguador de incubación **pH 7.0**
Ácido ϵ -aminocaproico 750 mM
Bis-Tris 50 mM

6.6.4. Purificación del complejo Asa2/Asa4/Asa7 estable

6.6.4.1. Cromatografía de exclusión molecular

Amortiguador ASAS **pH 8.0**
Tris 50 mM
NaCl 200 mM
Glicerol 2 %
Ácido ϵ -amoniacaproico 50 mM
DTT 1 mM
EDTA 0.25 mM
Urea 0.25 M
Tween 20 0.05 %

6.6.4.2. Cromatografía de afinidad

Amortiguador de diáisis

PBS (500)T **pH 7.8**
NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl 500 mM
Tween 20 0.05 %

Amortiguador de unión

PBS(200)T **pH 7.8**
NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl 200 mM
Tween 20 0.05 %

Amortiguador de elución

PBS(200)TI **pH 7.8**
NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl 200 mM
Tween 20 0.05 %
Imidazol 500 mM

Oligomerización de la ATP sintasa y supracomplejos mitocondriales (Anexo 13.3)

Medio <i>Polytomella</i>		2L
Acetato de Na	29.4 mM	8 g
Bactotriptona	0.2 %	4 g
Extracto de levadura	0.2 %	4 g
Amortiguador sacarosa	pH 7.4	1L
Tris	20 mM	2.43 g
Sacarosa	0.37 M	
KEDTA	4 mM	
Amortiguador de solubilización	pH 8.4	50 mL
Tris	50 mM	0.304 g
NaCl	100 mM	292 mg
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 mM	12.3 mg
Glicerol	10 %	5 mL
PMSF	1 mM	8.71 mg
TLCK	50 µg/mL	2.5 mg
Amortiguador A	pH 8.4	100mL
Tris	50 mM	0.608 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 mM	25 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	0.01 %	10 mg
Amortiguador B		100mL
Tris	50 mM	0.608 g
NaCl	500 mM	2.92 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 mM	25 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	0.01 %	10 mg
Amortiguador Superose 6	pH 8.4	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
NaCl	150 mM	0.88 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 mM	25 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	0.01 %	10 mg
ATP	2 mM	110 mg

Separación de los supracomplejos reconstituidos mediante cromatografía de exclusión molecular.

Amortiguador Sephadryl S-300	pH 8.4	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
NaCl	200 mM	1.16 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM	36 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	0.01 %	10 mg

Purificación de los complejos mitocondriales mediante cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido

Amortiguador de solubilización	pH 8.4	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
NaCl	100 mM	584 mg
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM	34 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg

Amortiguador A	pH 8.4	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM	36 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	1 %	1 g

Amortiguador B	pH 8.4	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM	36 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	1 %	1 g
NaCl	500 mM	2.92 g

Purificación de los complejos I y IV mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de 1% de n-dodecil-β-D-maltósido

Amortiguador Superose 6	pH 8.4	100 mL
Tris	50 mM	0.608 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM	36 mg
Glicerol	10 %	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 µg/mL	5 mg
LM	1 %	1 g
NaCl	200 mM	1.16 g

13.3 Oligomerización de la ATP sintasa y caracterización de los supracomplejos mitocondriales de *Polytomella* sp.

Oligomerización de la ATP sintasa y supracomplejos mitocondriales

Se prepararon mitocondrias a partir de cultivos de *Polytomella* sp., se solubilizaron en las condiciones antes descritas utilizando los detergentes n-dodecil- β -D-maltósido y digitonina, se separó la fracción insoluble por centrifugación (20000 xg) y las muestras se cargaron en varios carriles de un gel nativo. Posteriormente, a una banda correspondiente a cada detergente se le realizó tinción de actividad para complejo I, complejo IV y complejo V. Una última banda se sometió a una segunda dimensión desnaturizante a fin de identificar las subunidades correspondientes a cada complejo.

1. Complejo V mitocondrial (en colaboración con la Dra. Marie-France Giraud del *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires*, Bordeaux, Francia)

Para obtener resultados favorables en las pruebas de cristalización es necesario cumplir con tres requisitos en la muestra: *i*) alta pureza, *ii*) cantidades suficientes (normalmente mg) y *iii*) monodispersión en la muestra. Con la metodología de purificación estandarizada es posible purificar 5-8 mg de proteína en 48 horas, con una alta pureza. Sin embargo, la muestra purificada presenta una mezcla de oligómeros (V_4 y V_2), por lo que se diseñaron dos metodologías para su separación y se estudió su estabilidad frente a algunos detergentes, agentes reductores y fosfolípidos.

Las fracciones enriquecidas con ATP sintasa obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio iónico fueron visualizadas en electroforesis nativa y desnaturizante, posteriormente se mezclaron y se concentraron a fin de efectuar experimentos de purificación o disociación de oligómeros de ATP sintasa.

1.1 Intentos de separación de los oligómeros V_4 y V_2

1.1.1 Cromatografía de exclusión molecular

La muestra con dímeros y tetrámeros se concentró hasta 4 mL, se agregó glicerol a una concentración final del 40% y se continuó concentrando hasta un volumen final de 500 μ L. Esta muestra se inyectó a una columna Superose 6 10/300 GL que se eluyó con un flujo de 0.25 mL/min. Para mejorar la resolución se utilizaron dos columnas de exclusión molecular conectadas en serie (Superose 6 10/300 GL y Superose 6 PrepGrade 10/300) y se realizó la

elución de la muestra a un flujo de 0.1 mL/min. Las fracciones fueron analizadas mediante electroforesis nativa.

1.1.2. Gradiente de densidad

La muestra conteniendo dímeros y tetrámeros de ATP sintasa obtenidos de la columna de exclusión molecular se concentró hasta un volumen de 500 µL y posteriormente se cargó en un gradiente discontinuo de glicerol de 10-50% en pasos de 10% en el mismo amortiguador. La separación se llevó a cabo en un rotor SW41Ti (Beckman Coulter) a 40 000 $\times g$ durante 17 h. Finalmente se colectaron fracciones y se visualizaron mediante electroforesis nativa.

1.2. Efecto de diversos agentes sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial

1.2.1. Efecto de concentración de proteína sobre la oligomerización del complejo

Para determinar el efecto de la concentración de proteína sobre la formación de oligómeros, muestras de 1.2 mL enriquecidas con tetrámeros y tetrámeros/dímeros fueron concentradas a 0.2 mL (factor de concentración 6 veces) y posteriormente a 0.1 mL (factor de concentración 12 veces). Alícuotas de estas muestras se analizaron mediante electroforesis nativa para estimar las proporciones de dímeros/tetrámeros.

1.2.2. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la oligomerización del complejo

Muestras con una mezcla de dímeros y tetrámeros se incubaron 2 horas con concentraciones crecientes de n-dodecil-β-D-maltósido y CHAPS (0.01-10% y 0.05-2% respectivamente) a 4 °C; posteriormente las muestras se resolvieron por BN-PAGE. Para descartar que la asociación de oligómeros se debiera a la formación de puentes disulfuro inespecíficos durante la solubilización/purificación, muestras enriquecidas con tetrámeros de ATP sintasa se incubaron en presencia de 0.5% β-mercaptopetanol, incluyendo 0.1% de n-dodecil-β-D-maltósido y n-octil-p-D-glucopiranósido durante 1.5 horas a temperaturas de 4 °C y 25 °C.

1.2.3. Efecto de fosfolípidos sobre la oligomerización del complejo

Muestras enriquecidas con dímeros/oligómeros se incubaron a 4 °C con concentraciones crecientes de 2.5×10^{-3} a 0.5 mg/mL de fosfatidilcolina de soya (Fluka BioChemika) durante 1 hora, posteriormente las muestras fueron visualizadas en electroforesis nativa.

1.3. Visualización de oligómeros de la ATP sintasa mediante microscopía electrónica (en colaboración con la Dra. Bénédicte Salin del *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires*, Bordeaux, Francia)

La muestra conteniendo mezcla dímeros/tetrámeros (0.5 mg/mL) se diluyó 40 veces en Tris 20 mM pH 8.4, una alícuota de 6 µL se aplicó sobre una rejilla de cubierta de carbono ionizada. La muestra se lavó 2 veces con agua y posteriormente se tiñó con acetato de uranilo al 1% por 1 min. Las rejillas se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión HITACHI H7650 que operó a 120 kV acoplado a una cámara GATAN de 11 MPx.

2. Supracomplejos de la cadena de transporte de electrones.

Al analizar las fracciones de elución de la columna de intercambio aniónico descrita en la purificación de ATPasa y compararlas con el cromatograma de UV se identificaron tres posibles picos adicionales al complejo V. Estas muestras se visualizaron mediante BN-PAGE y se realizaron tinciones de actividad de los complejos I y IV. Las fracciones de cada pico se mezclaron, se concentraron a un volumen de 2 mL y se visualizaron mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Carriles de la electroforesis nativa correspondientes a cada muestra se tiñeron para visualizar actividad de los complejos I y IV. Para detectar la presencia de cada complejo en las asociaciones observadas se utilizaron inmunorréplicas tipo Western utilizando anticuerpos específicos contra subunidades de cada complejo.

Una muestra que contenía los complejos I, III y IV se concentró hasta 1 mL y se cargó a una columna de exclusión molecular para FPLC (Sephacryl S-300 16/70). Las fracciones se analizaron mediante BN-PAGE y se llevó a cabo tinción de actividad para los complejos I y IV. Se separaron fracciones que presentaron los complejos I/IV juntos y complejos III y IV. Estas muestras se visualizaron mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se efectuó tinción de actividad para los complejos I y IV y la presencia de cada uno fue corroborada mediante inmunorréplica tipo Western.

A fin de separar las asociaciones observadas de los complejos I, III y IV se aumentó la concentración de detergente hasta 1% durante toda la purificación. Las fracciones de la elución de la columna de intercambio aniónico se visualizaron mediante BN-PAGE y SDS-PAGE. Las fracciones que contenían al complejo V fueron visualizadas mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Por otro lado, las fracciones que contenían los complejos I y IV se concentraron hasta un volumen de 500 µL y se cargaron a una columna de exclusión molecular (Superose 6 10/300). Las fracciones de esta elución fueron visualizadas mediante BN-PAGE y se realizaron tinciones de actividad para los complejos I y IV.

Resultados

Los complejos mitocondriales solubilizados con n-dodecil- β -D-maltósido y digitonina se visualizaron mediante BN-PAGE (Figura 45a). Las tinciones de azul de Coomassie y actividad de los complejos I, IV y V revelaron una diferencia en la distribución de los complejos respiratorios y la ATP sintasa. El complejo V establece asociaciones oligoméricas definidas (dímero, tetrámero, octámero) las cuales se mantienen estables al utilizar digitonina. Estas asociaciones oligoméricas son catalíticamente activas e hidrolizan ATP (Figura 45b).

En el caso del complejo I se detectan dos posibles asociaciones en la tinción de actividad. Al solubilizar con n-dodecil- β -D-maltósido se observó la forma monomérica de este complejo con una masa aproximada de 1000 kDa, y una banda de mayor masa molecular cuando se solubiliza con digitonina (Figura 45c) que fue identificada como el supracomplejo I/III₂/IV₂ con base en su masa molecular. Por su parte, el complejo IV posee una amplia asociación con los complejos I y III (Figura 45d), formando supracomplejos con diferentes estequiométrias.

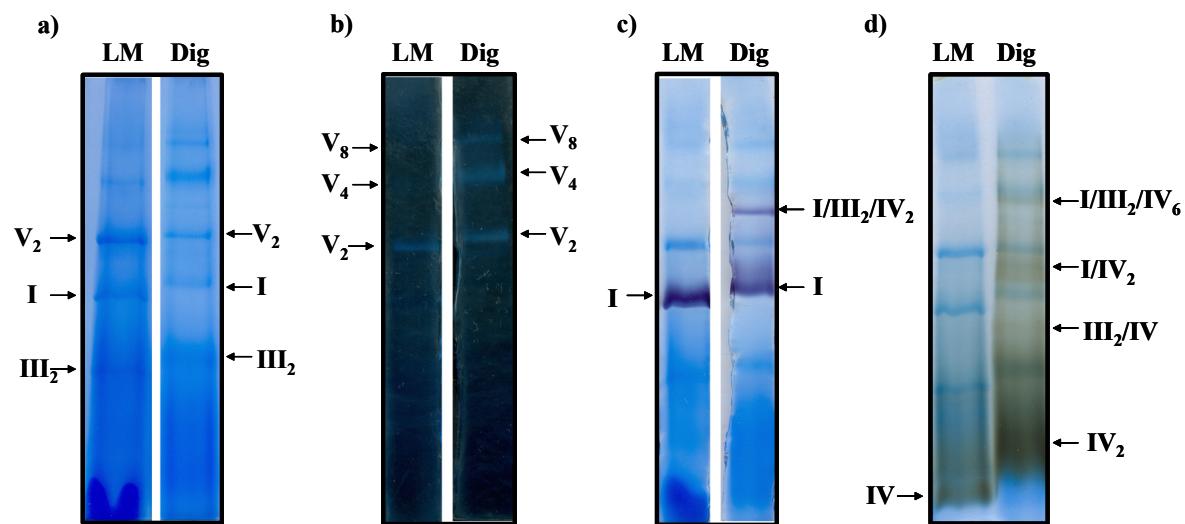


Figura 45. BN-PAGE de mitocondrias de *Polytomella* sp solubilizadas con n-dodecil- β -D-maltósido y digitonina, tinción de actividad para los complejos I, IV y V. Dos miligramos de mitocondrias fueron solubilizadas en las mismas condiciones con n-dodecil- β -D-maltósido (a) y digitonina (b) en una relación 2 mg de detergente/mg de proteína. Las muestras fueron visualizadas mediante BN-PAGE. a) BN-PAGE teñido con azul de Coomassie, se indican los complejos I, III y IV. b) Tinción de actividad de hidrólisis de ATP, se señalan los oligómeros de complejo V. c) Tinción de actividad de NADH deshidrogenasa, se señalan las bandas que contienen al complejo I. d) Tinción de actividad de citocromo *c* oxidasa, se observa el complejo IV monomérico, dímerico y algunas asociaciones con complejos I y III. Las estequiometrías de los supracomplejos están basadas en Guerrero-Castillo *et al.* (2008).

1. Complejo V mitocondrial

Las subunidades presentes en cada uno de los complejos mitocondriales se separaron mediante 2D SDS-PAGE (Figura 46). En el caso de la ATP sintasa se observó una banda entre las subunidades Asa2 y Asa4 en los tres oligómeros del complejo (V_2 , V_4 , V_8). Este péptido también se detectó rutinariamente asociado a la enzima purificada para pruebas de cristalización o para los experimentos de inmunorréplica tipo Far-Western. Como ya se describió, la purificación de la enzima se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular. Este polipéptido se encuentra asociado al complejo V en geles nativos después de solubilizar las mitocondrias con diversos detergentes y también está presente después de la purificación. Con base en estas observaciones se puede proponer que se trata de una nueva subunidad asociada a la ATP sintasa no descrita anteriormente y que aquí denominamos Asa 10. La secuenciación del amino terminal de esta subunidad mediante degradación de Edman arrojó la secuencia: *A/S-V-L-A-E-P-L-M/F-V-G-(A)* en donde (A) representa un dato dudoso. Esta secuencia no es suficiente para identificar a la proteína correspondiente en las bases de datos reportadas. La razón por la cual esta subunidad pasó desapercibida en las caracterizaciones previas de la enzima puede deberse a su pobre tinción con azul de Coomassie, por lo que se le consideraba un contaminante.

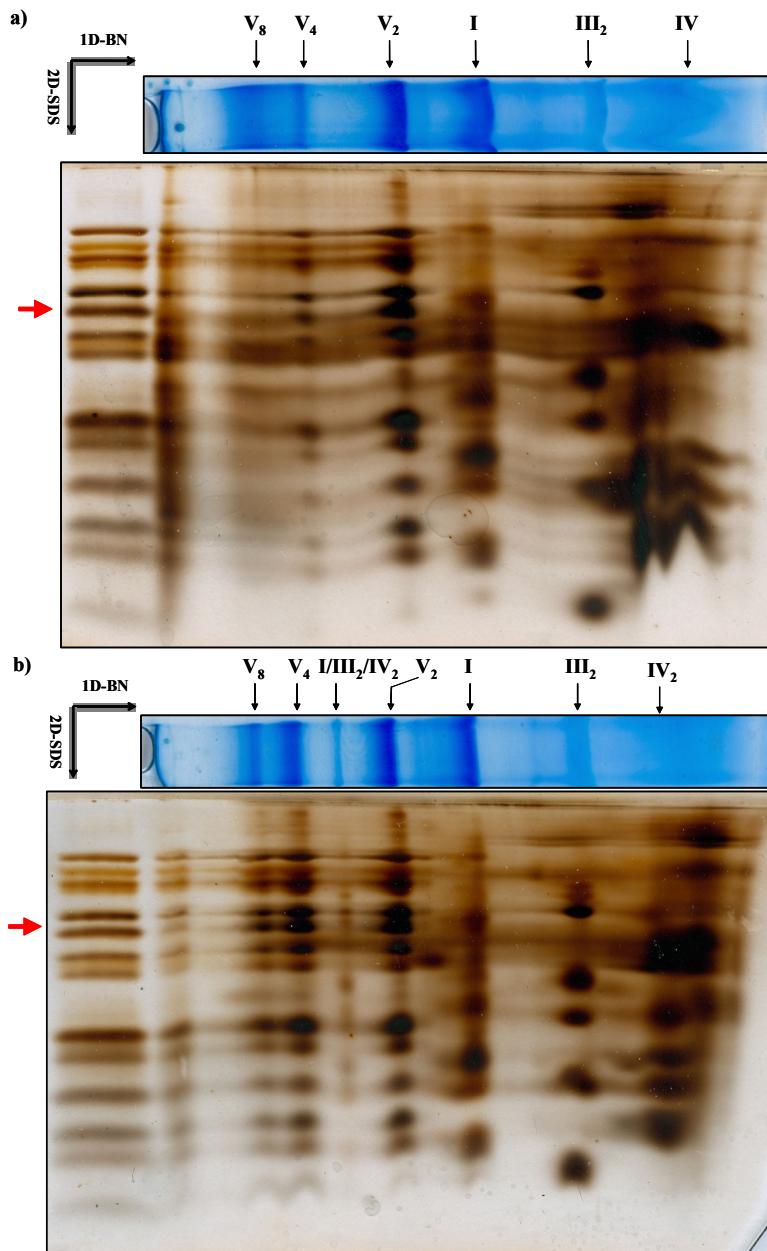


Figura 46. Separación de los complejos mitocondriales solubilizados con n-dodecil- β -D-maltósido y digitonina mediante electroforesis azul nativa y segunda dimensión desnaturizante. Dos miligramos de mitocondrias fueron solubilizadas en las mismas condiciones con n-dodecil- β -D-maltósido (a) y digitonina (b) en una relación 2 mg de detergente/mg de proteína. Las muestras se separaron mediante BN-PAGE y posteriormente cada banda fue separada mediante 2D SDS-PAGE. Se observan las subunidades correspondientes a los complejos indicados en la parte superior. Como marcador de masas moleculares se utilizó a la ATP sintasa purificada de *Polytomella* sp. La flecha roja de la izquierda indica la subunidad Asa 10 no descrita anteriormente.

1.1. Intentos para lograr la separación de los oligómeros V₄ y V₂

Como ya se mencionó, la presencia de una especie sola en solución es necesaria para realizar las pruebas de cristalización, por lo que se requiere la separación de los dos estados oligoméricos de la ATP sintasa purificada. Se efectuaron dos aproximaciones distintas: cromatografía de exclusión molecular y gradiente de densidad.

1.1.1. Exclusión molecular

La muestra con tetrámeros y dímeros de la ATP sintasa se cargó a una columna de exclusión molecular Superose 6 10/300. Las fracciones de la elución se analizaron mediante electroforesis azul nativa. Se observó una separación de las asociaciones oligoméricas del complejo V (Figura 47 a). Esta separación puede ser optimizada utilizando dos columnas conectadas en serie (Figura 47 b); sin embargo, esta estrategia resulta en una disociación de la enzima hacia sus formas monoméricas.

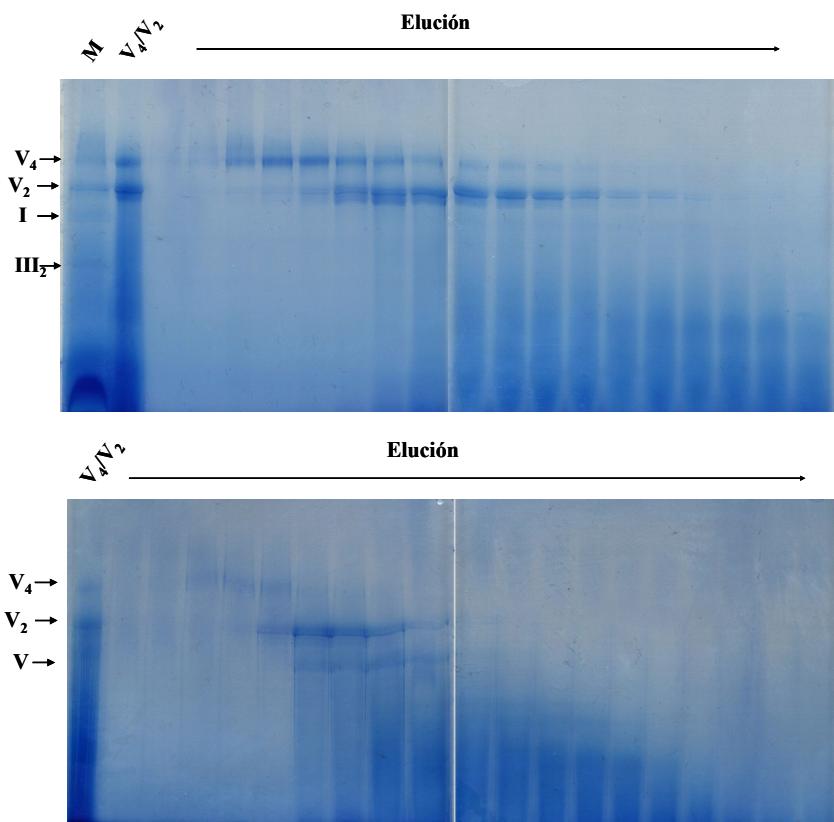


Figura 47. Separación de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp mediante cromatografía de exclusión molecular. Una mezcla de tetrámeros y dímeros se cargó a una (a) o dos (b) columnas Superose 6 10/300. Las fracciones de la elución se visualizaron mediante BN-PAGE. M: Mitocondrias solubilizadas. V₄/V₂: mezcla de tetrámero y dímero cargada a la columna.

1.1.2. Gradiente de densidad

Una mezcla con tetrámeros y dímeros de la ATP sintasa se cargó a un gradiente de densidad formado por soluciones de distintas concentraciones de glicerol. Las fracciones del gradiente se visualizaron mediante BN-PAGE. Aunque la separación no fue completa, se observaron fracciones enriquecidas con dímero, tetrámero y también fue posible observar asociaciones de oligómeros de más alto peso enriquecidos en las fracciones correspondientes a 30% de glicerol (Figura 48).

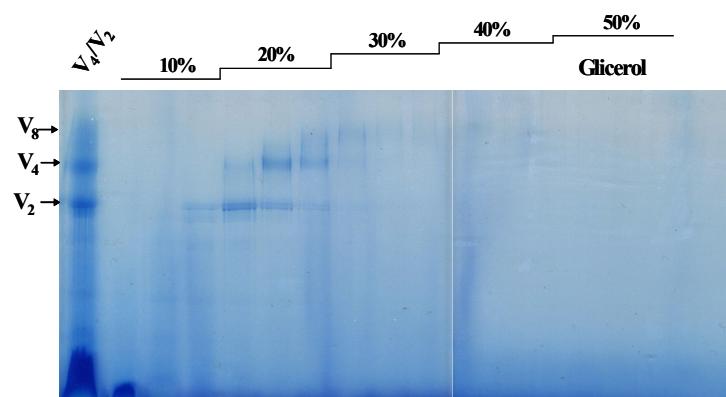


Figura 48. Separación de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp mediante gradiente de densidad. Una mezcla de tetrámero y dímero se cargó en un gradiente escalonado de glicerol. Las fracciones de la elución se visualizaron mediante BN-PAGE. V_4/V_2 : mezcla de tetrámeros y dímeros cargada a la columna. Los valores indican la concentración aproximada de glicerol en las fracciones.

1.2. Efecto de diversos agentes sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial

1.2.1 Efecto de concentración de proteína sobre la oligomerización del complejo V

Dos muestras de complejo V, una enriquecida con tetrámero y otra conteniendo una mezcla tetrámeros/dímeros, se concentraron por separado 12 veces. Las muestras se analizaron por BN-PAGE y no se observó una diferencia significativa en la relación dímero/tetrámero en ninguna de las muestras (Figura 49).

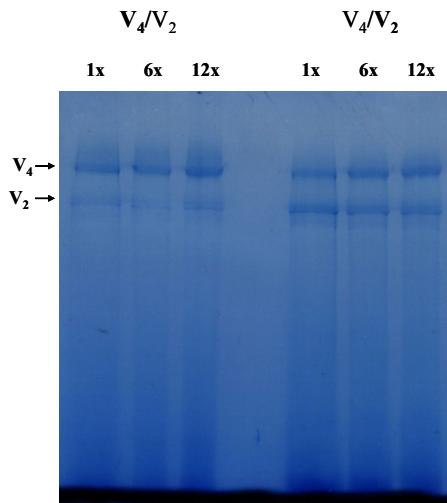


Figura 49. Efecto de concentración de proteína sobre la oligomerización del complejo V de *Polytomella* sp. Dos muestras, una enriquecida con tetrámeros (Líneas 1-3) y una mezcla tetrámero/dímero (Líneas 4-6) se concentraron 6 y 12 veces, muestras de cada punto se cargaron a un BN-PAGE. Los números indican el factor de concentración en cada paso.

1.2.2. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la oligomerización del complejo V

Una mezcla con tetrámeros y dímeros se incubó con cantidades crecientes de los detergentes n-dodecil- β -D-maltósido y CHAPS. La presencia de estados oligoméricos de la ATP sintasa mitocondrial se mantuvo en todas las concentraciones probadas (Figura 50 y 51).

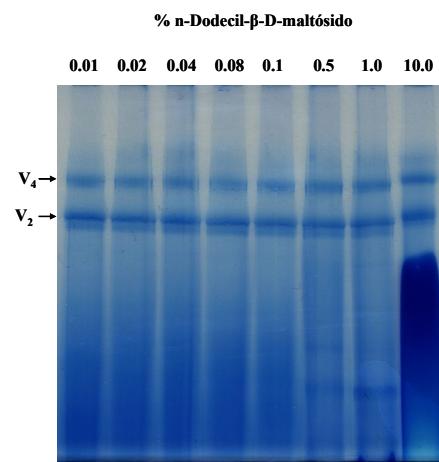


Figura 50. Efecto del n-dodecil- β -D-maltósido sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. Una mezcla de tetrámero y dímero se incubó con concentraciones crecientes del detergente a 4 °C, posteriormente sometida a BN-PAGE. Los números indican la concentración (% m/v) de detergente.

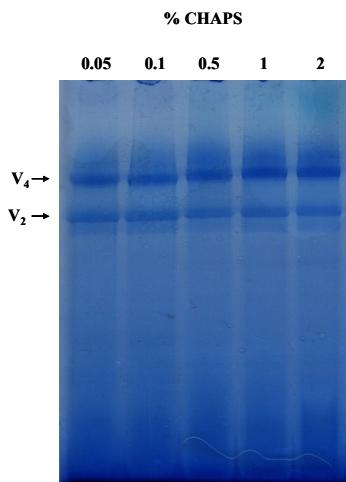


Figura 51. Efecto del CHAPS sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. Una mezcla de tetrámero y dímero se incubó con concentraciones crecientes del detergente a 4 °C, posteriormente sometida a BN-PAGE. Los números indican la concentración (% m/v) de detergente.

Una muestra enriquecida con tetrámeros de ATPasa se incubó a dos temperaturas (4 y 25 °C) con β-mercaptopetanol en presencia de n-dodecil-β-D-maltósido y n-octil-p-D-glucopiranósido. Las muestras se visualizaron por BN-PAGE. El agente reductor no causó un efecto sobre la distribución de oligómeros. En contraste con lo anterior, la temperatura tiene un efecto notable sobre la disociación de los oligómeros de ATPasa hacia la formación de monómeros, este efecto es más pronunciado cuando se agrega n-dodecil-β-D-maltósido (Figura 52).

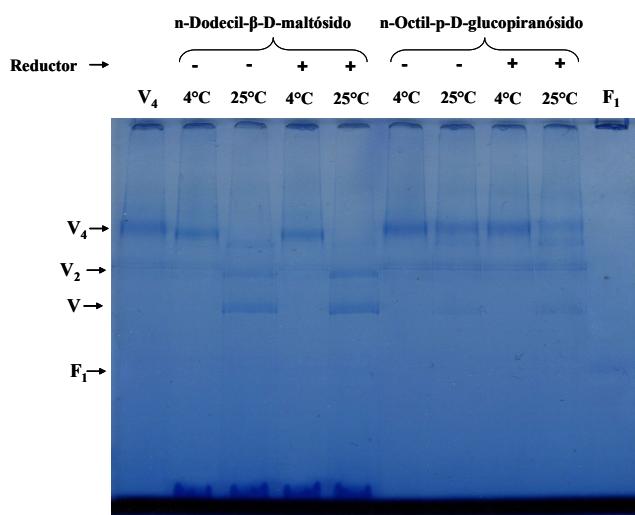


Figura 52. Efecto de agentes reductores, temperatura y detergentes sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. Una muestra de tetrámeros (Línea 1) se incubó con β-mercaptopetanol a dos temperaturas en presencia de n-dodecil-β-D-maltósido (Líneas 2-5) y n-octil-p-D-glucopiranósido (Líneas 6-9), las muestras fueron visualizadas mediante BN-PAGE. A la izquierda se indican los estados de oligomerización del complejo V. Línea 10: sector F1 de la ATP sintasa disociada a 60°C/3 min.

1.2.3. Efecto de fosfolípidos sobre la oligomerización del Complejo V

Una mezcla de oligómeros de ATPasa se incubó con concentraciones crecientes de fosfatidilcolina de soya, posteriormente las muestras se visualizaron mediante BN-PAGE. No se observó un efecto notable en la disociación; sin embargo, a altas concentraciones, es posible observar un incremento en la relación de oligómeros respecto a dímeros (Figura 53).

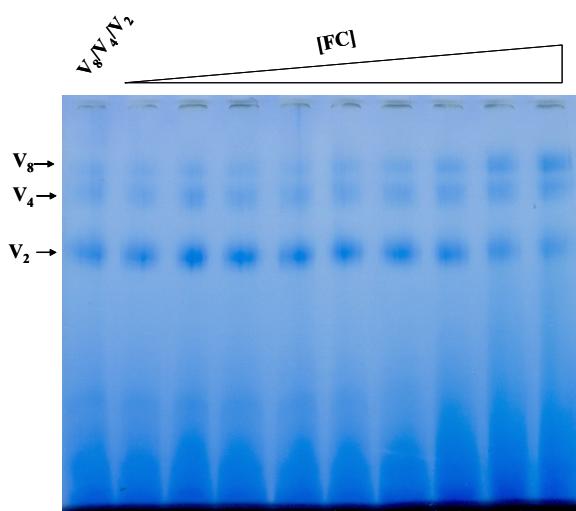


Figura 53. Efecto de la fosfatidilcolina sobre la relación de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. Muestras de una mezcla de oligómeros de complejo V ($V_8/V_4/V_2$) se incubaron a 4 °C con concentraciones crecientes de fosfatidilcolina (FC) (2×10^{-3} – 0.4 mg/mL). Las muestras fueron visualizadas por BN-PAGE.

1.3. Visualización de oligómeros de la ATP sintasa mediante microscopía electrónica (en colaboración con la Dra. Bénédicte Salin del *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires*, Bordeaux, Francia)

Una muestra de la mezcla de oligómeros de ATP sintasa se preparó para visualización mediante microscopía electrónica de transmisión. En las imágenes obtenidas fue posible observar estructuras diméricas y tetraméricas (Figura 54 a y b) y también estructuras que podrían corresponder a un tetrámero que ha perdido un sector F₁ (Figura 54 c), así como posibles asociaciones en otras estructuras oligoméricas (Figura 54 d y e).

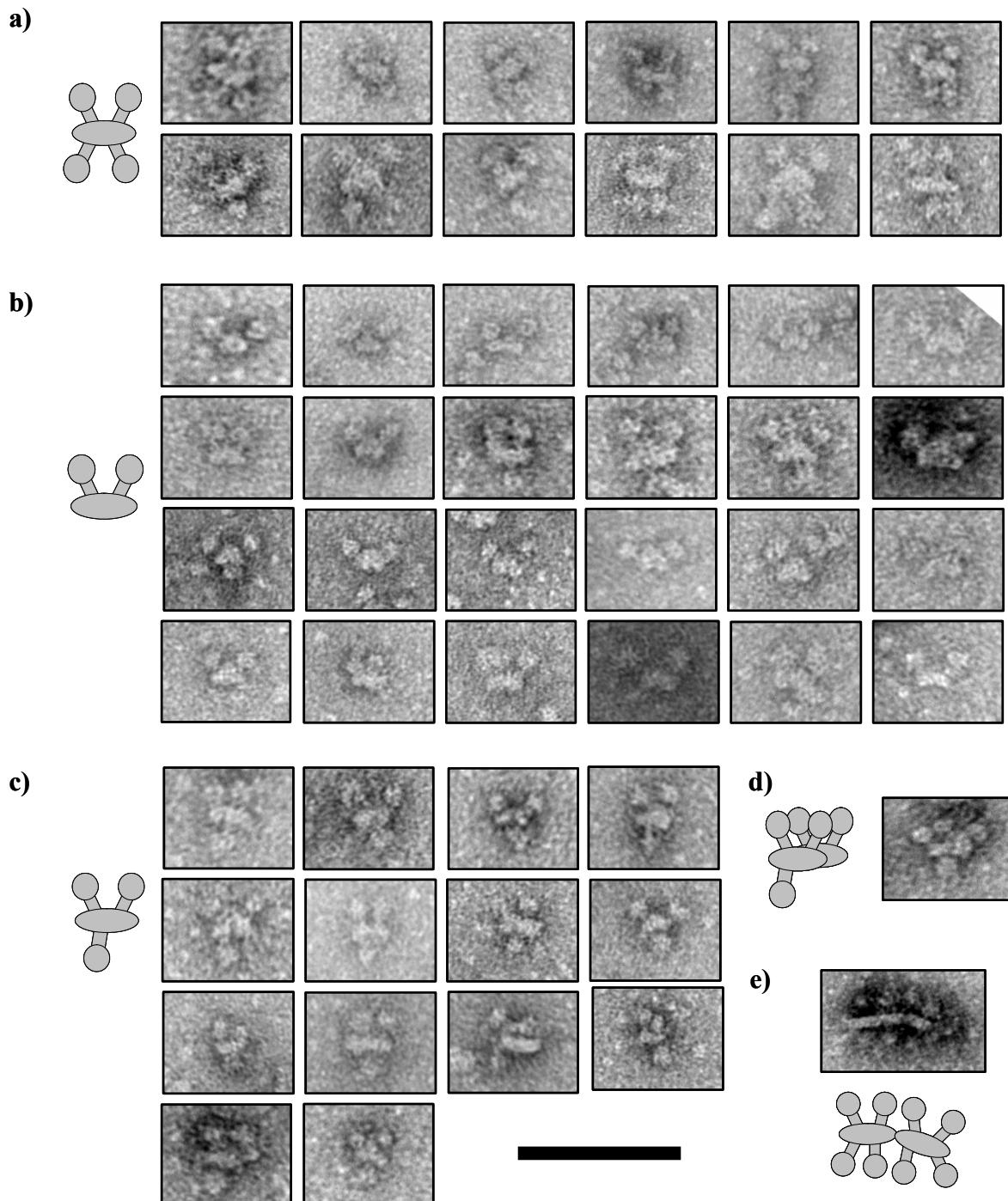


Figura 54. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión colectadas de oligómeros de complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. Se observan distintos oligómeros agrupados en tetrámeros (a), dímeros (b) tetrámeros carentes de un sector F₁ (c) y otros oligómeros (d) y (e). La barra negra indica una distancia de 100 nm.

2. Supracomplejos de la cadena de transporte de electrones

El perfil de elución de la columna de intercambio aniónico se dividió en 4 señales principales (Figura 55a). La primera corresponde al complejo V mitocondrial (Figura 55b), mientras que las dos siguientes contienen a los complejos respiratorios. El último pico no contiene proteína, la señal observada podría deberse a la unión de ácidos nucleicos que son separados de la columna a altas concentraciones de NaCl. La tinción de actividad para los complejos I y IV se detectó en ambos picos de elución (Figura 55 c y d). El complejo III se visualizó mediante tinción de las subunidades separadas en SDS-PAGE ya que el patrón electroforético de este complejo es conocido (Figura 55 d).

La presencia de la actividad de los complejos I y IV en ambas regiones de la elución sugiere asociaciones de distintas estíquias de los complejos respiratorios que se separan de la columna a distintas fuerzas iónicas. Muestras concentradas de cada pico de elución se visualizaron mediante BN-PAGE y se les realizó tinción de actividad para los complejos I y IV. Las subunidades presentes en los complejos asociados se visualizaron mediante 2D SDS-PAGE (Figura 55 c y d).

En el pico 2 se puede observar a los complejos I y IV libres así como asociaciones de diversas estíquias entre estos complejos. La migración en BN-PAGE del complejo I purificado da como resultado una disociación de este complejo en sus dominios membranal (MD) y catalítico (CD) (Figura 55c). En la Figura 55c se puede observar la actividad de oxidasa asociada al dominio catalítico del complejo I. Por otro lado, se detectó la actividad de NADH deshidrogenasa (NDH) sin asociación a la de citocromo *c* oxidasa (COX) en bandas de mayor masa molecular que el complejo I completo, lo que indica una posible asociación de este complejo con el complejo III.

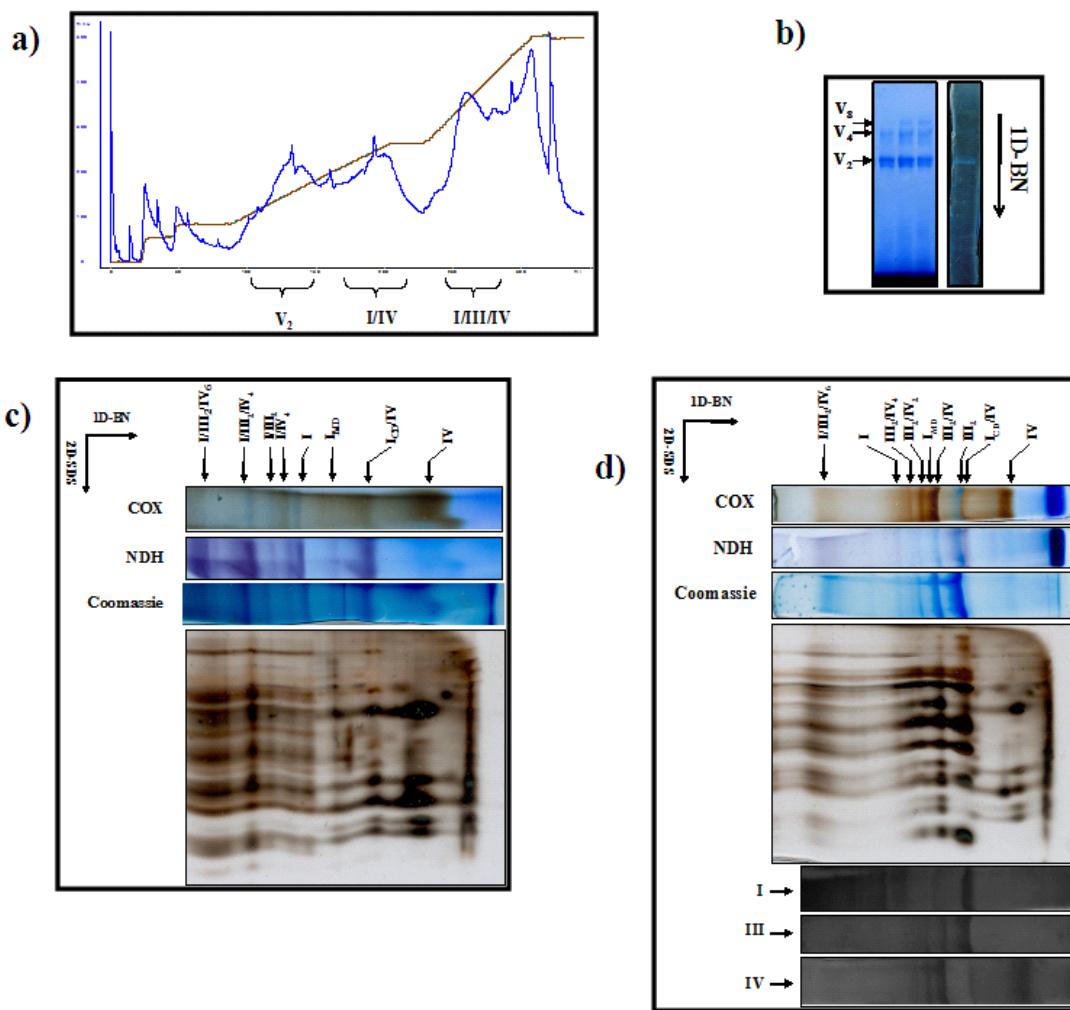


Figura 55. Reconstitución de supracomplejos respiratorios en cromatografía de intercambio iónico visualizados mediante BN-PAGE. Los complejos mitocondriales solubilizados con n-dodecil-β-D-maltósido se cargaron en una columna de intercambio aniónico (Source 15Q 10/100). Durante la cromatografía los complejos aislados se reasociaron formando supracomplejos de distintas estíquimetrías que se eluyeron con un gradiente escalonado de 0-500 mM NaCl. **a)** Cromatograma de elución de la columna, en azul se muestra el perfil de absorción UV (280 nm), en café se muestra la conductividad del gradiente de NaCl. Se indican los complejos presentes en cada pico de elución. **b)** BN-PAGE de las fracciones de elución correspondientes al primer pico. Se señalan tres estados oligoméricos del complejo V (V₈, V₄ y V₂). A la derecha se muestra la tinción de actividad para hidrólisis de ATP de una de las bandas. **c)** Asociaciones supramoleculares de los complejos respiratorios presentes en el segundo pico de elución. Se separaron los complejos presentes mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se observan las tinciones de actividad de NADH deshidrogenasa (NDH) y citocromo *c* oxidasa (COX), así como la tinción de Coomassie del BN-PAGE. Abajo se muestra la separación de las subunidades presentes en cada supracomplejo mediante 2D SDS-PAGE revelada con tinción de plata. Las flechas indican las estíquimetrías propuestas para cada supracomplejo. **d)** Asociaciones supramoleculares de los complejos respiratorios presentes en el tercer pico de elución. Se separaron los complejos presentes mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se muestran las tinciones de actividad de NADH deshidrogenasa (NDH) y citocromo *c* oxidasa (COX), así como la tinción con Coomassie del BN-PAGE. Al centro se muestra la separación de las subunidades presentes en cada supracomplejo mediante 2D SDS-PAGE revelada con tinción de plata. Abajo se muestra la identificación de cada complejo asociado mediante inmunorriboproycción tipo Western utilizando anticuerpos específicos para los complejos I, III y IV. Las flechas indican las estíquimetrías propuestas para cada supracomplejo.

con masa molecular cercana a la del complejo III dimérico. Además de las asociaciones entre los complejos III y IV, se puede observar una banda de masa molecular cercana a la del tetrámero de complejo V (3.2 MDa) que presenta las actividades de NDH y COX asociadas, lo que indica, probablemente, la reconstitución de un supracomplejo que contiene a los complejos I/III₂/IV₆.

Las asociaciones entre los complejos I, III y IV observadas en la elución de la cromatografía de intercambio aniónico se conservaron después de separar la muestra en una columna de exclusión molecular. Al analizar las fracciones de elución mediante BN-PAGE se observó que las asociaciones que contienen complejo I están presentes en las primeras fracciones, mientras que las asociaciones entre los complejos III y IV se encontraron más adelante en la elución (Figura 56a). Los supracomplejos reconstituidos se separaron en la elución en distintas estequiométrias. La presencia de cada complejo se detectó mediante tinción de actividad, inmunorréplica tipo western o su separación en subunidades mediante 2D SDS-PAGE. Las estequiométrias propuestas para las asociaciones entre complejos I/IV y III/IV se muestran en las Figuras 56b y 56c, respectivamente.

La purificación en presencia de 1% de n-D-dodecil-β-maltósido dio como resultado dos señales principales durante el gradiente de elución (Figura 57a). El primer pico está constituido por complejo V y el segundo por una mezcla de los complejos I y IV (Figuras 57a y b). El complejo III no pudo ser detectado en ninguna de las fracciones de la elución, lo que probablemente indica una disociación total del complejo durante la purificación a altas concentraciones de detergente.

Al separar las muestras mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE se observó que la muestra correspondiente al complejo V presenta al complejo disociado en sus formas dimérica, monomérica y el sector F₁ con algunos estados intermedios (Figura 57b). Esta disociación continuó con el tiempo en las muestras incubadas en hielo.

Una disociación similar se observó en el complejo I al ser separado mediante BN-PAGE. La disociación produjo los dominios membranal (MD) y catalítico (CD) (Figura 57c). Por

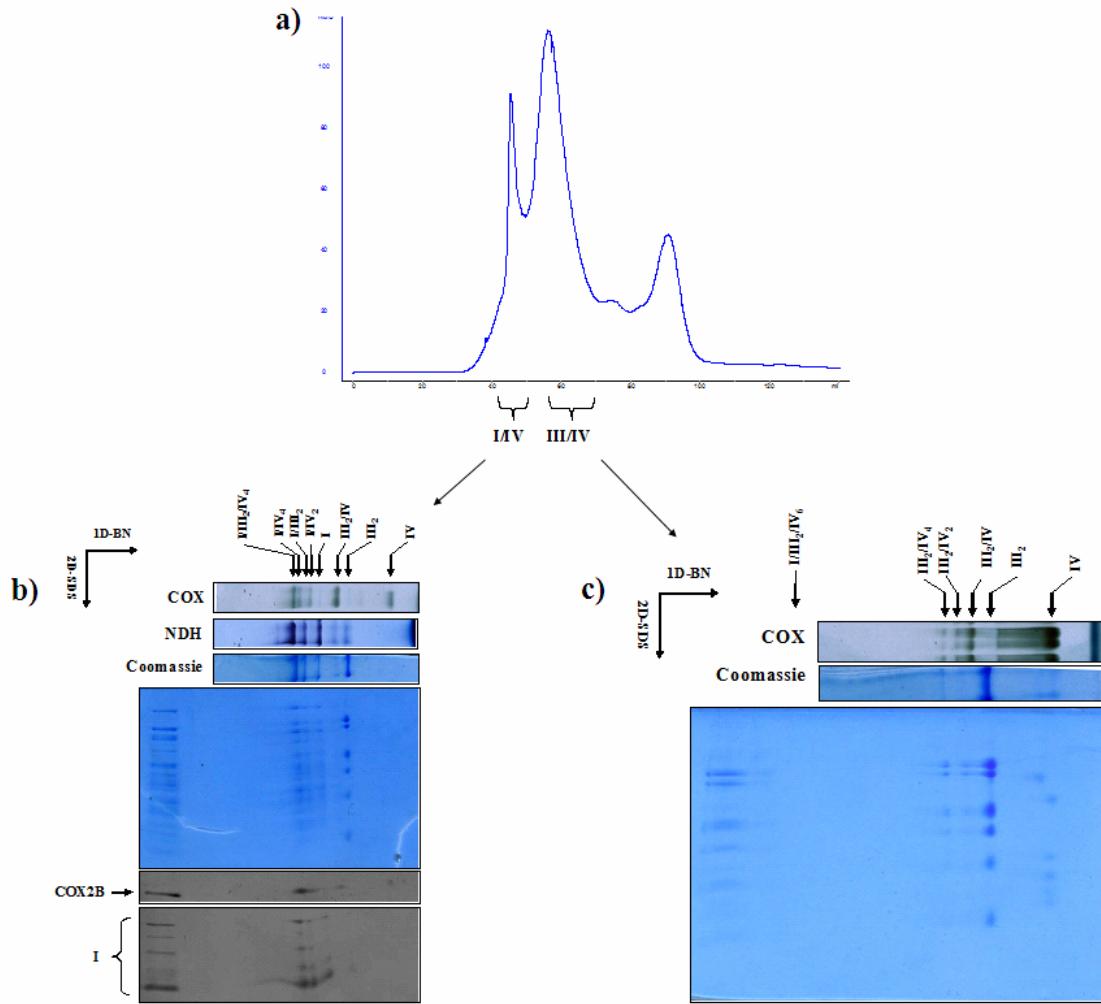


Figura 56. Separación de supracomplejos respiratorios en chromatografía de exclusión molecular visualizados mediante BN-PAGE. Las fracciones que contenían a los complejos I, III y IV se mezclaron y se concentraron para ser inyectadas en una columna de exclusión molecular (Sephacryl S-300 16/70) en donde se separaron asociaciones de complejos I/III/IV y III/IV. **a)** Cromatograma de elución de la columna, en azul se muestra el perfil de absorción UV (280 nm). Se indican los complejos presentes en cada pico de elución. **b)** Asociaciones supramoleculares de los complejos respiratorios presentes en el primer pico de elución. Se separaron los complejos presentes mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se observan las tinciones de actividad de NADH deshidrogenasa (NDH) y citocromo *c* oxidasa (COX), así como la tinción de Coomassie del BN-PAGE. Abajo se muestra la identificación de cada complejo asociado mediante inmunorreplica tipo Western utilizando anticuerpos específicos para los complejos I y IV. Las flechas indican las estequiometrías propuestas para cada supracomplejo. **c)** Asociaciones supramoleculares de los complejos respiratorios presentes en el segundo pico de elución. Se separaron los complejos presentes mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se observa la tinción de actividad de citocromo *c* oxidasa (COX) y la tinción de Coomassie del BN-PAGE. Abajo se muestra la separación de las subunidades presentes en cada supracomplejo mediante 2D SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie. Las flechas indican las estequiometrías propuestas para cada supracomplejo.

su parte, se observó la presencia del complejo IV en el mismo pico de elución. Esta coelución en la cromatografía de intercambio iónico de ambos complejos sugiere una posible asociación que es estable en la concentración de detergente utilizada; sin embargo, esta asociación se pierde durante la electroforesis nativa.

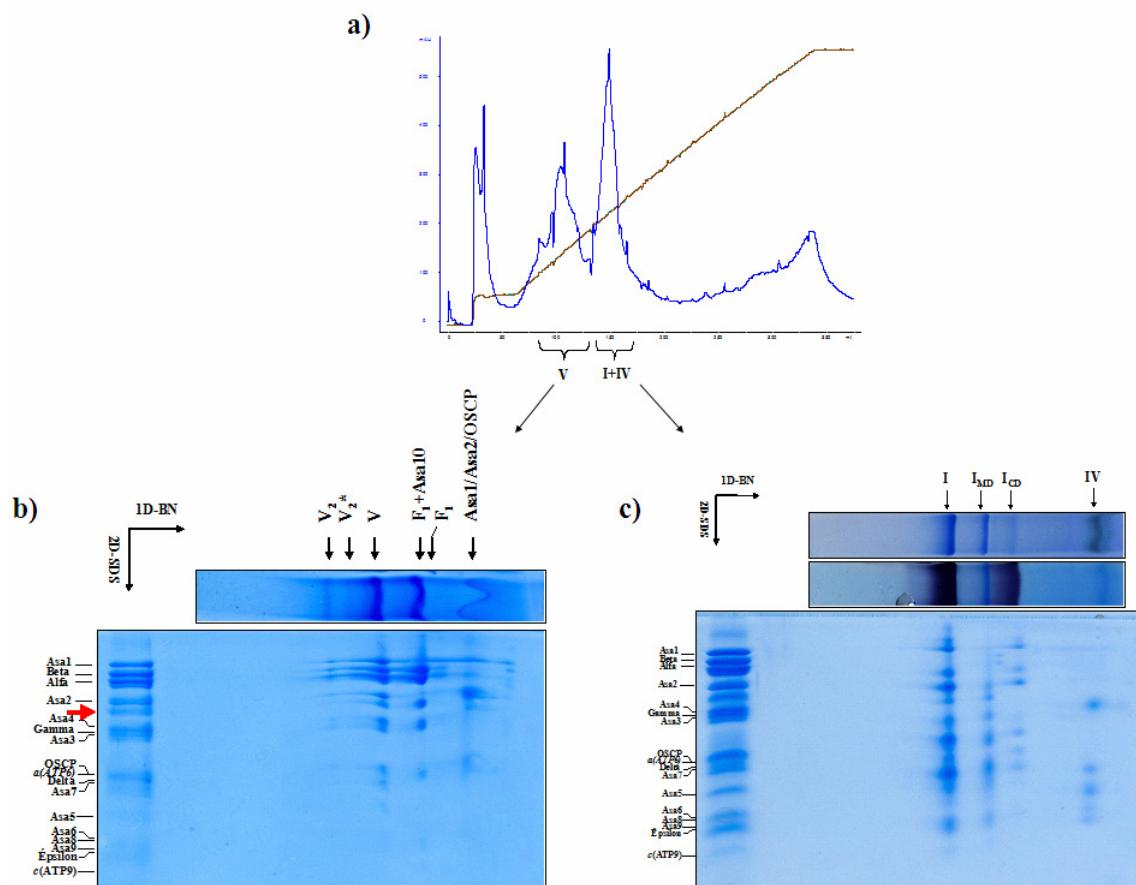


Figura 57. Purificación de los complejos I, IV y V mediante cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de detergente. Los complejos mitocondriales solubilizados en presencia de n-dodecil-β-D-maltósido fueron cargados en una columna de intercambio aniónico (Source 15Q 10/100) en donde se eluyeron con un gradiente de 0-500 mM NaCl. **a)** Cromatograma de elución de la columna, en azul se muestra el perfil de absorción UV (280 nm), en café se muestra la conductividad del gradiente de NaCl. Se indican los complejos presentes en cada pico de elución. **b)** Disociación del complejo V dimérico presente en el primer pico de elución. Se separó este complejo mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se observa la tinción de Coomassie del BN-PAGE y abajo se muestra la separación de las subunidades presentes en cada banda mediante 2D SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie. Las flechas indican los estados de oligomerización del complejo V y los subcomplejos obtenidos. La flecha roja indica la subunidad Asa10. **c)** Disociación del complejo I y IV presentes en el segundo pico de elución. Se separaron los complejos mediante 1D BN-PAGE y 2D SDS-PAGE. Se observan las tinciones de actividad de NADH deshidrogenasa (NDH) y citocromo *c* oxidasa (COX). Abajo se muestra la separación de las subunidades presentes en cada complejo mediante 2D SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie. Las flechas indican la disociación del complejo I en sus dominios catalítico (CD) y membranal (MD), se observa la presencia del complejo IV en el mismo pico de elución.

Para corroborar la estabilidad del complejo I purificado y su posible asociación con el complejo IV las fracciones que contuvieron ambos complejos se mezclaron y se concentraron a un volumen de 500 µL para posteriormente ser inyectadas en una columna de exclusión molecular (Superose 6 10/300). En el perfil de elución se puede observar un primer pico simétrico que contiene al complejo I purificado seguido de la elución del complejo IV. Es notable la disociación del complejo I en sus dominios MD y CD, con base en el perfil cromatográfico y la tinción de actividad de la electroforesis nativa en donde las tres bandas que constituyen al complejo colegien, podemos concluir que el complejo I es purificado íntegro y posteriormente es disociado durante la migración electroforética (Figura 58).

Por su parte la asociación entre los complejos I y IV inicialmente propuesta en la columna de intercambio iónico no pudo ser corroborada ni descartada ya que no existe comigración de ambos complejos en la cromatografía de exclusión, lo que indicaría que no se encuentran asociados; sin embargo, los complejos pudieron separarse durante el proceso de concentración de la muestra, en el cual la concentración de detergente presente en solución aumenta, como puede observarse en el tamaño de la micela en el frente de migración del BN-PAGE (Figura 58 b y c). Por lo tanto, es posible que los complejos I y IV se encuentren asociados durante la cromatografía de intercambio iónico, dado que se observan en un pico definido en la elución de la columna. Sin embargo, este supracomplejo se disocia durante el proceso de concentración; y posteriormente los complejos aislados eluyen en fracciones separadas en la cromatografía de exclusión molecular.

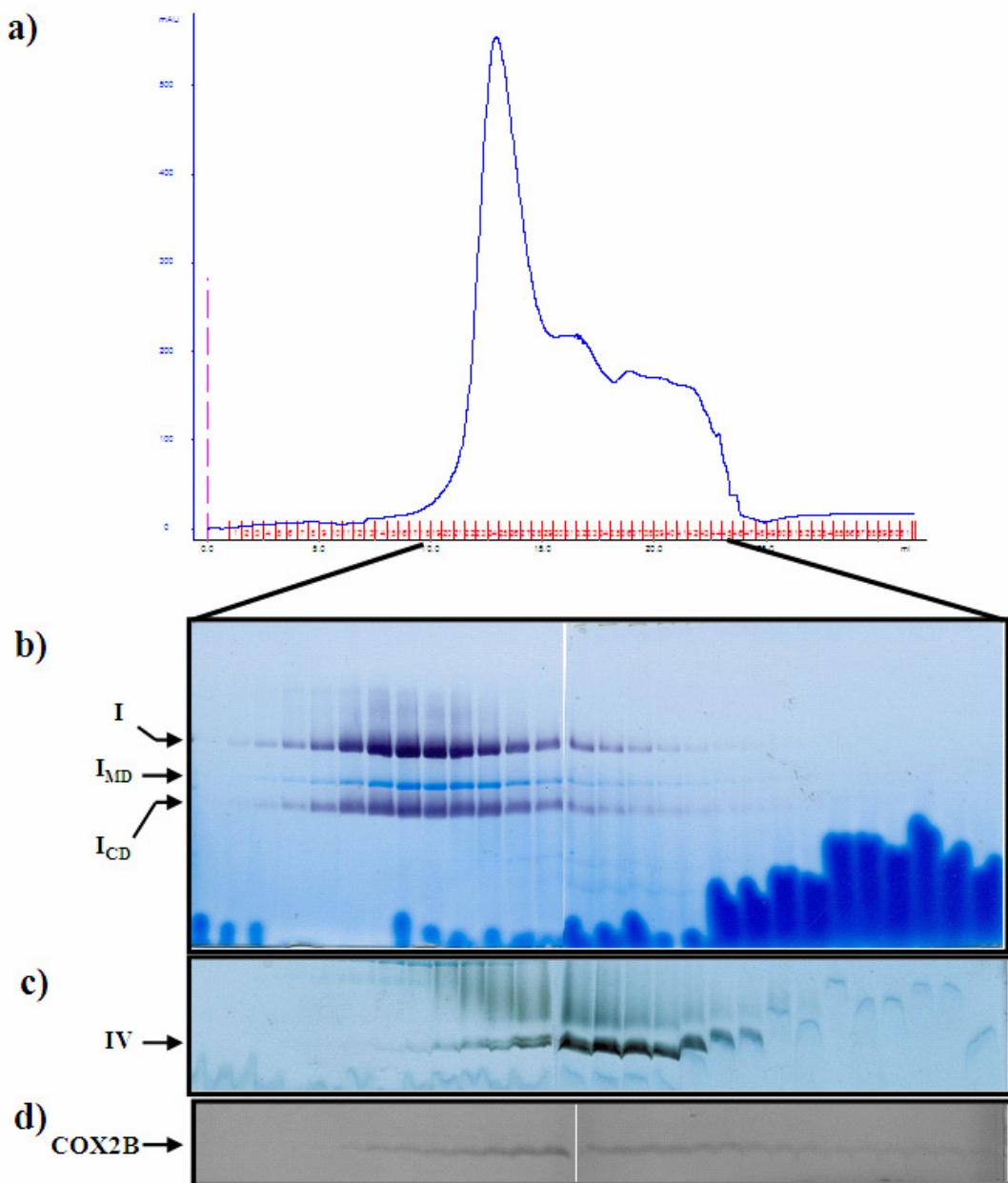


Figura 58. Separación de los complejos I y IV en cromatografía de exclusión molecular visualizados mediante BN-PAGE. Las fracciones correspondientes a la asociación I/IV fueron mezcladas y concentradas para inyectarse en una columna de exclusión molecular (Superose 6 10/300). **a)** Cromatograma de elución de la columna, en azul se muestra el perfil de absorción UV (280 nm). **b)** BN-PAGE con tinción de actividad de NDH de las fracciones de elución. Se observa la disociación del complejo I en sus dominios catalítico (CD) y membranal (MD) durante la electroforesis. **c)** BN-PAGE con tinción de actividad de COX de las fracciones de elución. **d)** Inmunorriplica tipo Western de las fracciones de elución con un anticuerpo contra la subunidad Cox2B.

**13.4 Exploración de las condiciones de
cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo
V mitocondrial.**

Exploración de las condiciones de cristalización de la subunidad Asa4 y del complejo V mitocondrial

Subunidad Asa4 (en colaboración con el Dr. Alfredo Torres Larios del Instituto de Fisiología Celular)

Una muestra de la subunidad ASA4 purificada se concentró hasta 3.3, 7.5 y 12.3 mg de proteína/mL; posteriormente, se realizaron pruebas de estabilidad al pH utilizando el sistema JBS solubility kit (Jena Biosciences) para valores de pH entre 3 – 10. Una vez determinado el pH de mayor estabilidad para la subunidad ASA4 recombinante, la proteína se purificó con un medio a pH 10 y se concentró hasta 10 mg/mL. Con esta solución se realizaron pruebas de cristalización por el método de difusión de vapor en la modalidad de gota sentada utilizando los sistemas Cristal Screen e Index Screen (Hampton Research).

Complejo V mitocondrial dimérico (en colaboración con la Dra. Marie-France Giraud del *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires*, Bordeaux, Francia)

Se prepararon mitocondrias a partir de cultivos de *Polytomella* sp, se solubilizaron con n-dodecil-β-D-maltósido y una vez removida la fracción insoluble, mediante ultracentrifugación, la muestra fue diluida para disminuir la concentración de NaCl. La muestra diluida se cargó a una columna de intercambio aniónico Source 15Q 10/100 para FPLC, en donde se realizó la elución con un gradiente de NaCl obteniéndose fracciones enriquecidas con Complejo V. La fracciones de elución se visualizaron por SDS-PAGE y se reunieron todas las fracciones correspondientes a la ATP sintasa. Esta muestra se dividió en dos y cada una se concentró hasta 4 mL, a cada una se le agregó glicerol a una concentración >30% y se continuó concentrando hasta un volumen final de 500 μL. Posteriormente, la muestra se inyectó a una columna de exclusión molecular (Superose 6 10/300) de la cual las fracciones resultantes enriquecidas se juntaron y la muestra se concentró hasta 8 mg/mL. Por último, se sembraron pruebas de cristalización con los sistemas *JBScreen Membrane Screens* 1 y 2 (Jena Biosciences), *MemStart kits* (Molecular Dimensions Limited) *MembFac* (Hampton Research), *PEG/Ion Screen* (Hampton Research), *Ammonium sulphate grid screen* (Hampton Research) y *Mbclass Suite* (Qiagen) mediante un equipo *Cartesian Honeybee Nano Dispensor 961* (Genomics Solutions).

Resultados

Las condiciones probadas para la subunidad Asa4 condujeron a la formación de un precipitado amorfo en todas las muestras sembradas. Por otro lado, las pruebas del complejo V purificado produjeron la formación de 8 cristales en condiciones distintas (Figura 59), sin embargo, al realizar la difracción de estos en las instalaciones de la *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) los patrones de difracción indicaron una composición salina que no proporciona información sobre la estructura de la proteína.

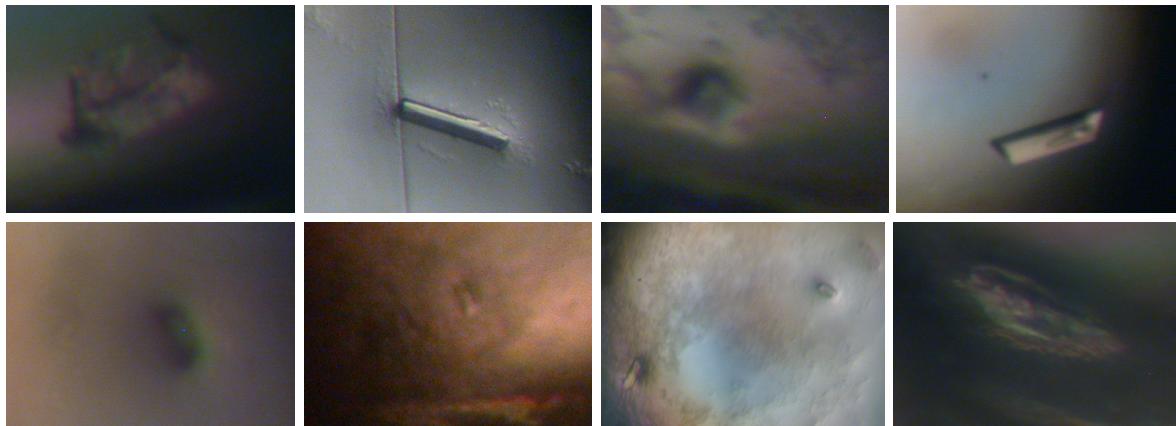


Figura 59. Cristales salinos obtenidos en las pruebas de cristalización del dímero de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Muestras enriquecidas con tetrámero, tetrámero/dímero y dímero se sembraron en 384 condiciones distintas. Se obtuvieron únicamente 8 cristales de composición salina.

13.5 Artículos publicados

Cano-Estrada A., Vázquez-Acevedo M., Villavicencio-Queijeiro A., Figueroa-Martínez F., **Miranda-Astudillo H.**, Cordeiro Y., Mignaco J.A., Foguel D., Cardol P., Lapaille M., Remacle C., Wilkens S., González-Halphen D. (2010) Subunit–subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella sp.* *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 1439–1448.

Miranda-Astudillo, H. V. (2012) Estructura y función de la ATP sintasa de las arqueas aeróbicas. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 15(2):104-115.

Miranda-Astudillo, H., Cano-Estrada, A., Vazquez-Acevedo, M., Colina-Tenorio, L., Downie-Velasco, A., Cardol, P., Remacle, C., Dominguez-Ramirez, L. y Gonzalez-Halphen, D. (2014) Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella sp.* *Biochim. Biophys. Acta* 1837: 1-13.

Macedo-Márquez A., Vázquez-Acevedo M., Ongay-Larios L., **Miranda-Astudillo H.**, Hernández-Muñoz R., González-Halphen D., Grolli S., Ramoni R. (2014) Overexpression of a monomeric form of the bovine odorant-binding protein protects *Escherichia coli* from chemical-induced oxidative stress. *Free Radical Research* DOI: 10.3109/10715762.2014.910867.



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 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 AAG AAG-3'; ASA8r, 5'-TAG TGA CCA CCA GCA GTG TAA G-3'; DELTAr, 5'-TTT ATC TAA TTA CGC TTA AGC-3'; and OSCPr, 5'-AAC GAA CTA ATT TAA ATA GAA AGA-3'. The amplified PCR products were fractionated on 1% agarose gel and purified by QIAquick gel extraction kit (Qiagen), cloned with the pGEM-T easy vector system (Promega), and sequenced using T7 and SP6 primers. The obtained sequences have been deposited in GenBank with the accession numbers shown in Table 1.

2.3. *Polytomella* ATP synthase purification

Polytomella sp. mitochondria were solubilized in the presence of *n*-dodecyl- β -maltoside (lauryl maltoside or LM) and the ATP synthase was purified following the described procedure [7]. For EM studies, the buffer in the glycerol gradient centrifugation step was modified. The enzyme obtained from the DEAE-Bioigel 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 sulfosuccinimidyl 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 µg 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-(sulfosuccinimidyl-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 µg 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 $q = (4\pi/\lambda) \sin\theta/2$,

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]
α (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 EC749219 (partial) ^d	XP_001702609 EDP06388	59 ^a	[36]
c (ATP9)	<i>Polytomella</i> sp.	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 for 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 $1.5 \mu\text{m}$ 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, α, 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://robbetta.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

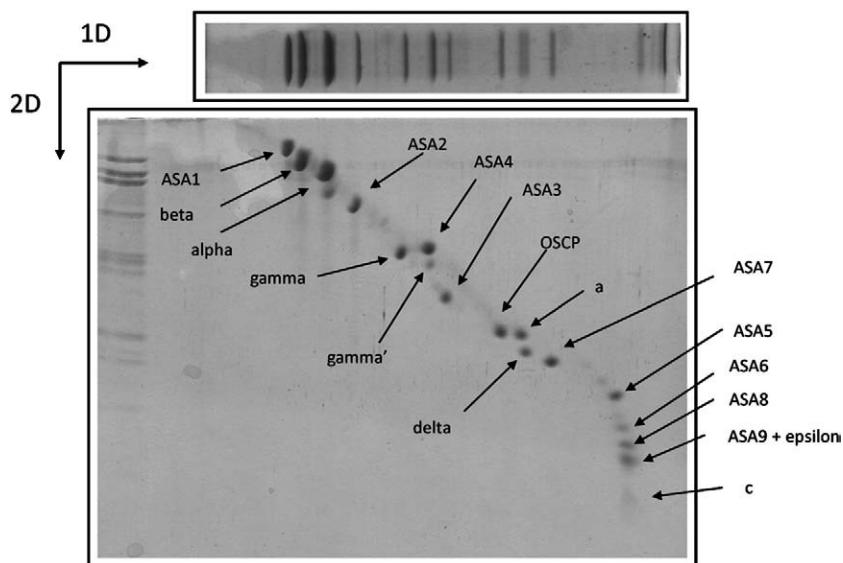


Fig. 1. 2D resolution of the polypeptides that constitute the mitochondrial *Polytomella* F₁F₀-ATP synthase. *Polytomella* ATP synthase (100 µg of protein) were resolved in a glycine-SDS-PAGE system (10% acrylamide). The 1D gel was then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained with 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 + 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 $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\delta_1/\epsilon_1/\alpha_1/\text{OSCP}_1$ 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 F₁F₀-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 F₁F₀-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 = $3 \times R_g^{-2}$),

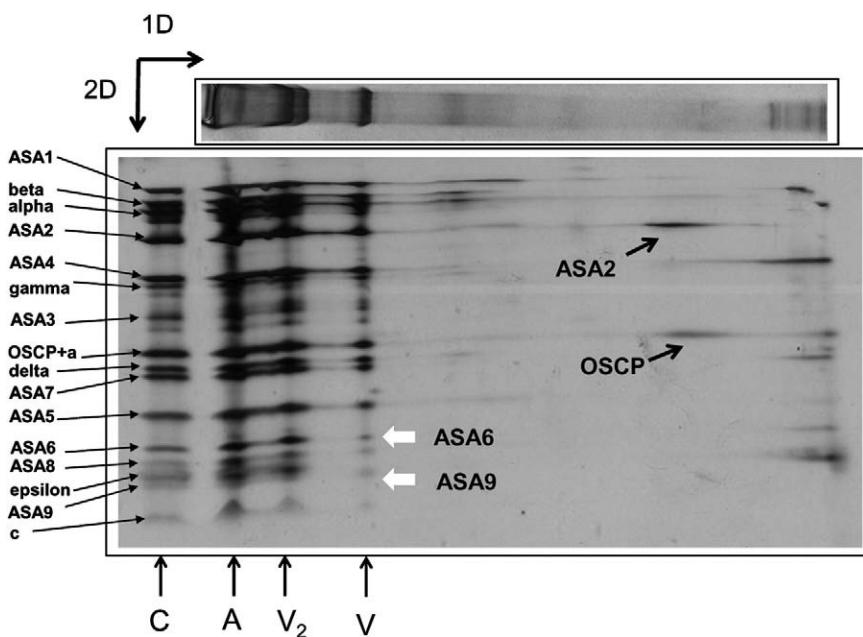
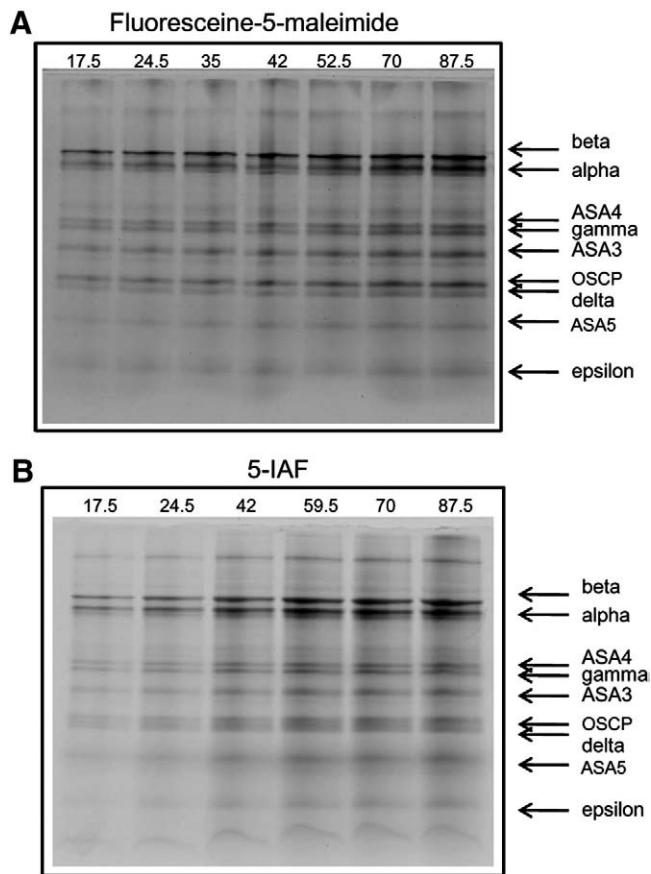


Fig. 2. Subcomplexes of the algal ATP synthase generated by detergent treatment and controlled heat dissociation. The purified algal ATP synthase (120 µg of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of additional 0.5% LM and then heated at 60 °C for 26 sec. The mixture was then resolved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



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 F₁C₁₀ 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 F₀ sector, while the F₁ domains are quite distant. An angle of 50° is formed between the long axes of the two putative monomers. The two F₁ 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 F₁ sector of the second monomer. These peripheral stalks are clearly distinguishable from the central stalk (subunits γ, δ, and ε) that connects the F₁ and F₀ sectors of the ATP synthase complex. Figs. 6E and F show fitting of one pair of the crystal structure of the yeast F₁C₁₀ 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. 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 fluorescent-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

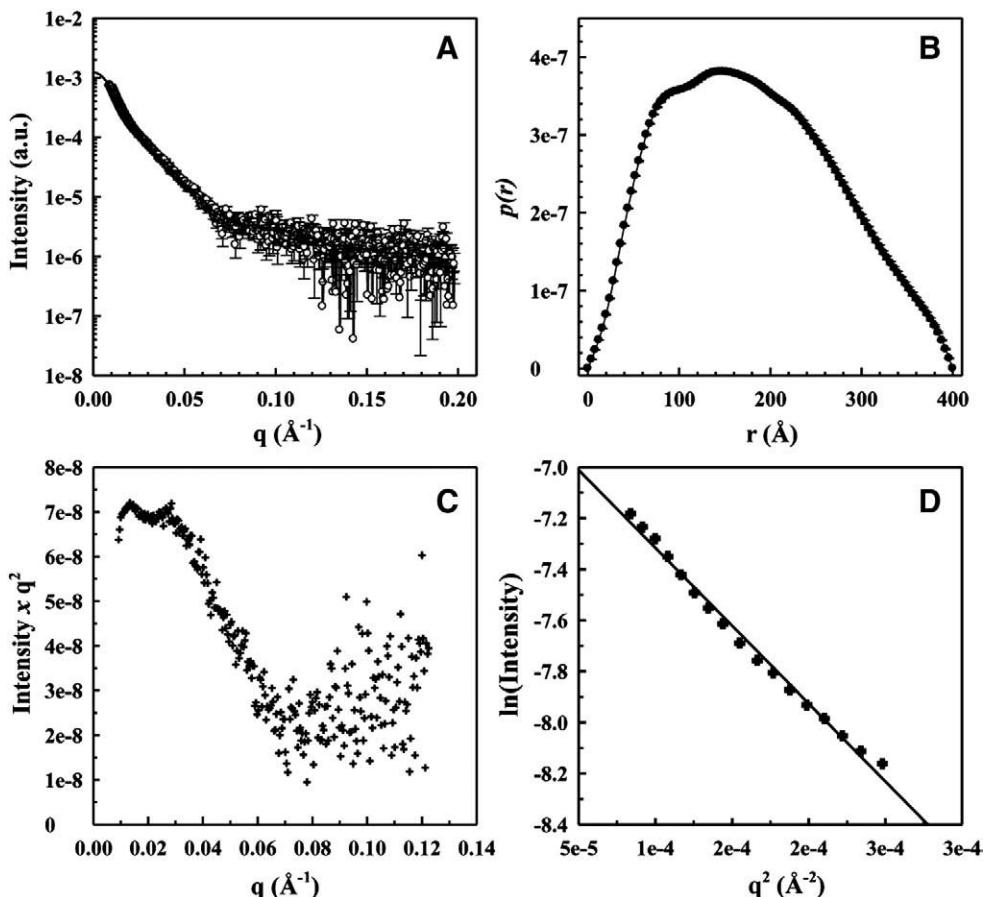


Fig. 4. SAXS data of *Polytomella* F₁F₀ ATP synthase. A) Experimental results of intensity as a function of the modulus of scattering vector q [$I(q)$] with their corresponding errors are shown (white dots); experimental data were fitted using the GNOM program (fit, solid line). B) Pair distance distribution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

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

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

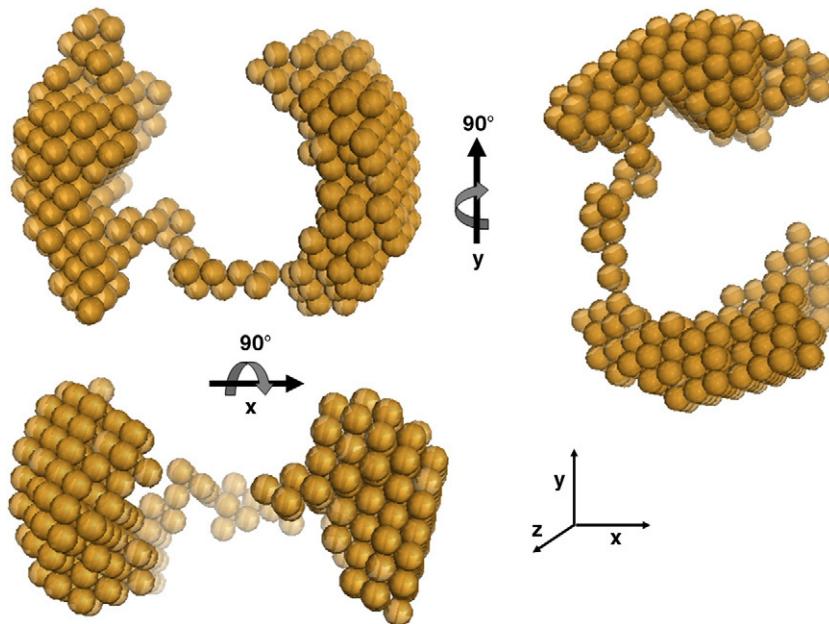


Fig. 5. Three-dimensional model of *Polytomella* ATP synthase inferred from SAXS data. The model strongly suggests that the algal ATP synthase is structured as a dimer in solution. *Ab initio* particle models were restored using the program DAMMIN. Several runs of *ab initio* shape determination led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

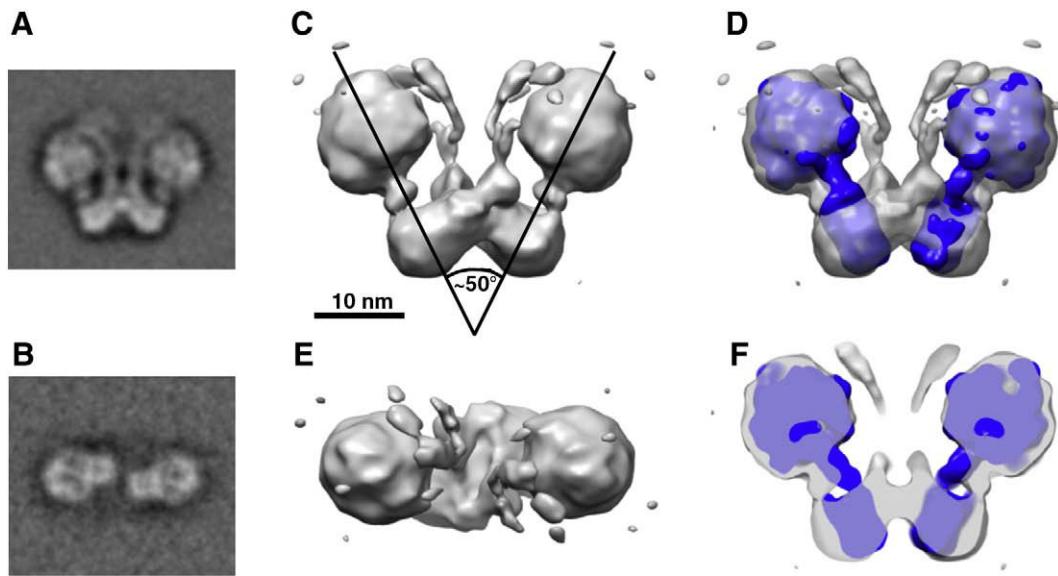


Fig. 6. Representative EM images and preliminary 3D structural model of the *Polytomella* ATP synthase. A and B) Particle images of the algal ATP synthase obtained after averaging 100 to 150 single-molecule images (A, side view; B, top view). C and D) 3D structural model of the algal mitochondrial ATP 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 as the case of $\alpha + \beta$, $\alpha + OSCP$, ASA2 + ASA4, and ASA2 + 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 α (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

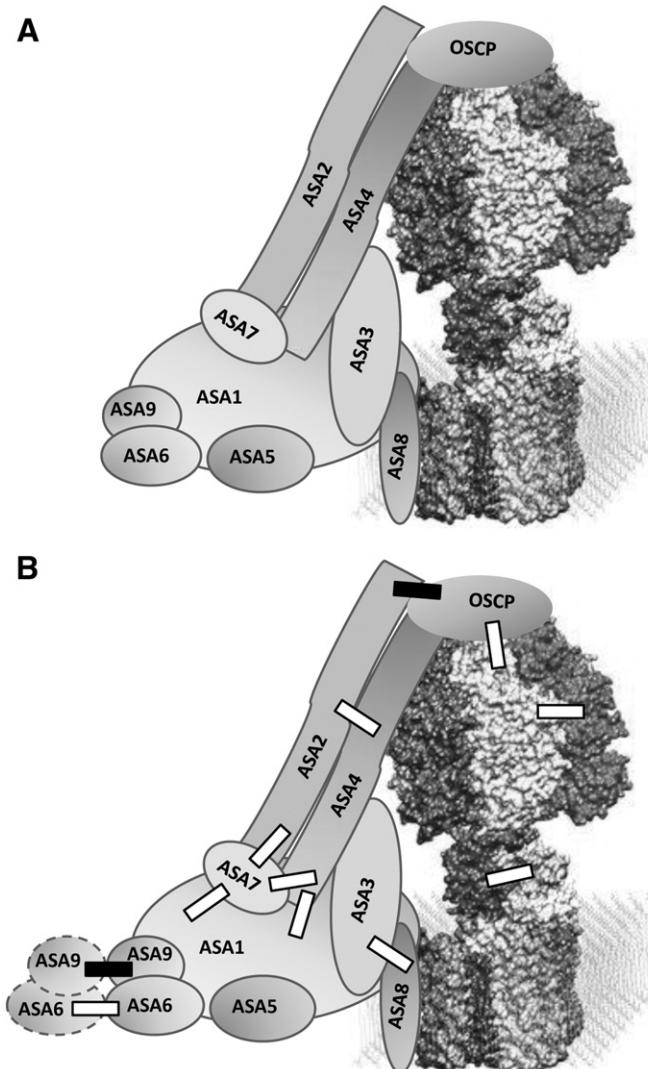


Fig. 7. Subunit arrangement of the dimeric algal mitochondrial ATP synthase. A) The model (only half the dimer is shown) is based on the overall structure of the complex found in the SAXS and EM studies and on the data obtained from the detergent dissociation assays and cross-linking experiments. For illustration purposes, the F₁F₀ moiety comprising subunits [α₃/β₃/γ/δ/ε/c₁₀] corresponds to the yeast F₁c₁₀ 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 F₁ 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.bbabi.2010.02.024](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.024).

References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 *Polytomaella* sp., *Biochim. Biophys. Acta* 1708 (2005) 23–34.
- 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.
- 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.
- R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Atteia, New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomaella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1190–1199.
- A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vázquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gómez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scifano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomaella* sp. is dimeric, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 1–13.
- 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.
- J.E. Walker, V.K. Dickson, The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 286–296.
- J. Weber, ATP synthase—the structure of the stator stalk, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 53–56.
- S. Brunner, V. Everard-Gigot, R.A. Stuart, Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase forms homodimers, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48484–48489.
- G. Arselin, J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M.F. Giraud, A. Dautant, D. Bréthes, 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.
- J.R. Gledhill, J.E. Walker, Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 989–992.
- Y.H. Ko, J. Hullihen, S. Hong, P.L. Pedersen, Mitochondrial F(0)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F₁ motor shielded by F(0), functional significance, and evidence for an involvement of the unique F(0) 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. Vicentini, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievitch, I.L. Torriani, The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, J. Appl. Crystallogr. 30 (1997) 880–883.
- [24] D.I. Svergun, Mathematical methods in small-angle scattering data analysis, J. Appl. Crystallogr. 24 (1991) 485–492.
- [25] H. Fischer, M. de Oliveira Neto, H.B. Napolitano, I. Polikarpov, A. F. Craievich, Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale, J. Appl. Cryst. 43 (2010) 101–109.
- [26] D.I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria, J. Appl. Crystallogr. 25 (1992) 495–503.
- [27] D.I. Svergun, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, Biophys. J. 76 (1999) 2879–2886.
- [28] V.V. Volkov, D.I. Svergun, Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering, J. Appl. Cryst. 36 (2003) 860–864.
- [29] S.J. Lüdtke, P.R. Baldwin, W. Chiu, EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, J. Struct. Biol. 128 (1999) 82–97.
- [30] M. van Heel, G. Harauz, E.V. Orlova, R. Schmidt, M. Schatz, A new generation of the IMAGIC image processing system, J. Struct. Biol. 116 (1996) 17–24.
- [31] Z. Zhang, Y. Zheng, H. Mazon, E. Milgrom, N. Kitagawa, E. Kish-Trier, A.J. Heck, P.M. Kane, S. Wilkens, Structure of the yeast vacuolar ATPase, J. Biol. Chem. 283 (2008) 35983–35995.
- [32] P. Dube, P. Tavares, R. Lurz, M. van Heel, The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry, EMBO J. 12 (1993) 1303–1309.
- [33] D. Stock, A.G. Leslie, J.E. Walker, Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase, Science 286 (1999) 1700–1705.
- [34] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 2025 (2004) 1605–1612.
- [35] Y. Shirakihara, A.G. Leslie, J.P. Abarahams, J.E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kamabara, K. Saika, Y. Kagawa, M. Yoshida, The crystal structure of the nucleotide-free $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of F₁-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.R. Lima, Y. Cordeiro, L.W. Tinoco, A.F. Marques, C.L. Oliveria, S. Sampath, R. Kodali, G. Choi, D. Foguel, I. Torriani, B. Caughey, 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 F₁F₀-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 c₁, J. Biol. Chem. 269 (1994) 9147–9154.
- [42] A. Atteia, G. Dreyfus, D. González-Halphen, 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 (1997) 275–284.
- [43] X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, E. Tolunkova, 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 F₁F₀ 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 F₁-ATPase from bovine mitochondria, J. Mol. Biol. 184 (1985) 677–701.
- [46] C. Hekman, J.M. Tomich, Y. Hatifi, Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the F₀ 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 A₁A₀ 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 F₀ 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.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA ATP SINTASA DE LAS ARQUEAS AERÓBICAS

Héctor Vicente Miranda-Astudillo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-600,
C.P.04510, Coyoacán, México, D.F. E-mail: hmiranda@email.ifc.unam.mx

RESUMEN

Desde el descubrimiento de las arqueas ha llamado la atención su capacidad para sobrevivir en ambientes difíciles. A través de los años, las arqueas han pasado de ser rarezas extremófilas a ser consideradas organismos de importancia universal que han sido utilizados para elucidar preguntas biológicas fundamentales. La filogenia del dominio Arquea se encuentra en constante cambio y cuenta hasta la fecha con 5 ramas principales: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota y Nanoarchaeota. En el presente trabajo se enlistan las principales características estructurales de los complejos respiratorios de los géneros de arqueas aeróbicas más estudiados. Se presenta una comparación morfológica de la ATP sintasa de estos organismos con el resto de la familia de las ATPasas rotatorias (F- y V-ATPasas); así como un análisis topológico de este complejo enzimático (A_1A_o -ATP sintasa) tomando como base la función de cada una de las subunidades que lo conforman.

Palabras Clave: ATPasas rotatorias, A_1A_o -ATP sintasa, cadena respiratoria, dominio Arquea.

ABSTRACT

Ever since Archaea were discovered, their ability to thrive in extreme environments has attracted much attention. Over the years, archaea have gone from microbial extremophilic oddities to organisms of universal importance and have been used to elucidate fundamental biological questions. The phylogeny of the Archaea domain is in constant evolution; to this day it is composed by five main branches: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota and Nanoarchaeota. In the present study, we list the main structural features of the respiratory complexes of the most studied genera of aerobic archaea. We present a morphological comparison of the ATP synthase of these organisms with the rest of the family of rotary ATPases (F- and V-ATPas) as well as a topological analysis of this enzymatic complex (A_1A_o -ATP synthase) based on the function of each of the subunits that comprise it.

Key Words: Rotary ATPases, A_1A_o -ATP synthase, respiratory chain, Archaea domain.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las arqueas su capacidad para sobrevivir en ambientes difíciles con temperaturas elevadas, pHs extremos o altas concentraciones de sales ha llamado la atención. Aun cuando comparten muchas características básicas de su maquinaria genética y metabólica con las bacterias¹, se ha propuesto que la organización estructural y metabólica de las

arqueas corresponde a organismos ancestrales, ya que poseen propiedades esenciales distintas de las bacterias y eucariotas, que las ubican filogenéticamente más cerca de la raíz hipotética del árbol de la vida². A través de los años, las arqueas han pasado de rarezas extremófilas a organismos de importancia universal pues han sido utilizadas para elucidar preguntas biológicas fundamentales³.

Nota: Artículo recibido el 29 de agosto de 2012 y aceptado el 01 de octubre de 2012.

A la fecha, el árbol filogenético de las arqueas se separa en dos grandes ramas: la Crenarchaeota y la Euryarchaeota; y tres

menores: Thaumarchaeota, Korarchaeota y Nanoarchaeota⁴ (Figura 1)⁵, esta última representada únicamente por la especie *Nanoarchaeum equitans*, la cual crece adherida a la superficie de otra arquea del género *Ignicoccus*⁶. Aún no se ha logrado cultivar algún miembro de la rama Korarchaeota y este grupo de organismos sólo ha sido identificado por estudios metagenómicos⁷. El grupo Thaumarchaeota está formado solamente por la especie mesófila *Cenarchaeum symbiosum*⁸. Por su parte, el grupo Crenarchaeota está constituido en su mayoría por organismos hipertermófilos que se consideran modelos de la vida temprana en la Tierra. Finalmente, la rama Euryarchaeota es filogenéticamente muy diversa e incluye metanógenos anaeróbicos estrictos, halófilos extremos y acidófilos extremos como los *Thermoplasmatales*⁵.

Las arqueas son un grupo muy heterogéneo con respecto a su metabolismo energético. Dentro de las reacciones asociadas con la obtención de energía en este grupo de organismos, se encuentran: respiración aeróbica y anaeróbica (que utilizan oxígeno y azufre/nitratos, respectivamente), fermentación, fotorrespiración anaeróbica (que utiliza bacteriorodopsina como bomba de protones activada por luz), reacciones de transferencia de metilos para generación de gradientes de sodio e hidrogenasas reductoras de protones⁹. En este sentido, debe remarcarse que la conservación de energía para la mayoría de las formas existentes de vida recién en el principio universal de transducción quimiosmótica¹⁰, que en términos filogenéticos evolucionó de forma temprana. En las arqueas la síntesis de ATP se encuentra acorde con la teoría quimiosmótica, basada en gradientes de iones a través de membranas. La Figura 2a ilustra los procesos para la generación de gradientes iónicos mediante bombas primarias y su utilización en la síntesis de ATP en arqueas.

En las siguientes secciones, se revisan las propiedades estructurales de los complejos membranales respiratorios involucrados en la síntesis de ATP en las arqueas aeróbicas, principalmente la ATP sintasa de arqueas (A_1A_o -ATP sintasa). Con respecto al resto de la bioenergética de estos organismos existen revisiones excelentes^{5,9,11,12}, por lo que esos aspectos no se abordarán en este trabajo.

COMPONENTES DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

El paradigma derivado de los estudios de la cadena respiratoria mitocondrial y de bacterias sugiere la presencia de cuatro complejos principales para una generación óptima de energía. En este esquema, el complejo I actúa como una NADH deshidrogenasa (NDH) en el punto más bajo de su potencial, mientras que el complejo II sirve como una succinato deshidrogenasa (SDH); ambos son reductores de quinonas (Q). Las quinonas reducidas son reoxidadas por el complejo III, llamado complejo *bc1*, el cual transfiere los electrones a un acceptor proteico de potencial mayor en la fase acuosa, el citocromo *c* (cyt *c*), que finalmente transfiere los electrones a una oxidasa

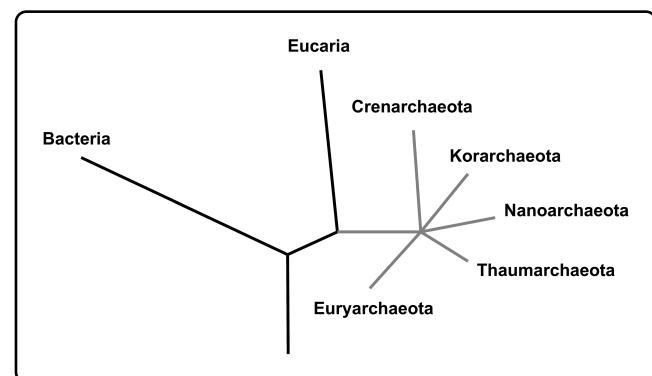


Figura 1. Esquema filogenético de las arqueas. Se observa la posición relativa de los tres dominios y las ramas del dominio Arquea (en gris) (Elaborado a partir de Gupta & Shami (2011)⁴ y Lewalter & Müller (2006)⁵).

terminal (complejo IV) (Figura 2b). En contraste con este concepto clásico, los complejos integrales de membrana encargados del transporte de electrones en algunas arqueas pueden estar fusionados y, en algunos casos, tener composiciones polipeptídicas inusuales^{13,14}.

Dentro del estudio reciente del metabolismo de las arqueas el papel preponderante lo ocupan los organismos metanogénicos, seguido de los implicados en los ciclos del azufre y nitrógeno, debido a su importancia ecológica y biotecnológica³. El grupo de arqueas aeróbicas estudiado se reduce a pocos géneros entre los que destacan: *Acidianus*, *Aeropyrum*, *Halobacterium*, *Picrophilus*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma* y *Metallosphaera*^{9,14,15}. Sin embargo, existen muy pocos estudios estructurales de los complejos respiratorios de estos géneros de microorganismos. La Tabla I^{13,15-30} presenta las características principales encontradas en los complejos respiratorios de arqueas aeróbicas.

De algunos de estos organismos sólo se conoce su carácter aeróbico, no existen estudios bioquímicos o genéticos sobre sus complejos respiratorios, como es el caso del género *Picrophilus*; por otro lado, existen géneros que se destacan por el estudio de su complejo V³¹⁻³³, pero en cuanto a sus complejos respiratorios no hay estudios bioquímicos o estructurales disponibles.

A_1A_o -ATP SINTASA (EC 3.6.3.14)

Como se mencionó, dentro del dominio Arquea existe una gran diversidad de formas de obtención del potencial electroquímico de membrana y la mayoría de estas rutas convergen en el complejo A_1A_o -ATP sintasa (Figura 2a). Este complejo se encuentra presente en todas las arqueas secuenciadas y, en la mayoría de estos organismos, es el encargado de llevar a cabo la síntesis de ATP³⁴. Sin embargo, para obtener un modelo universal de la ATPasa de arqueas deben tomarse en cuenta todas las diferencias fisiológicas dentro del dominio Arquea.

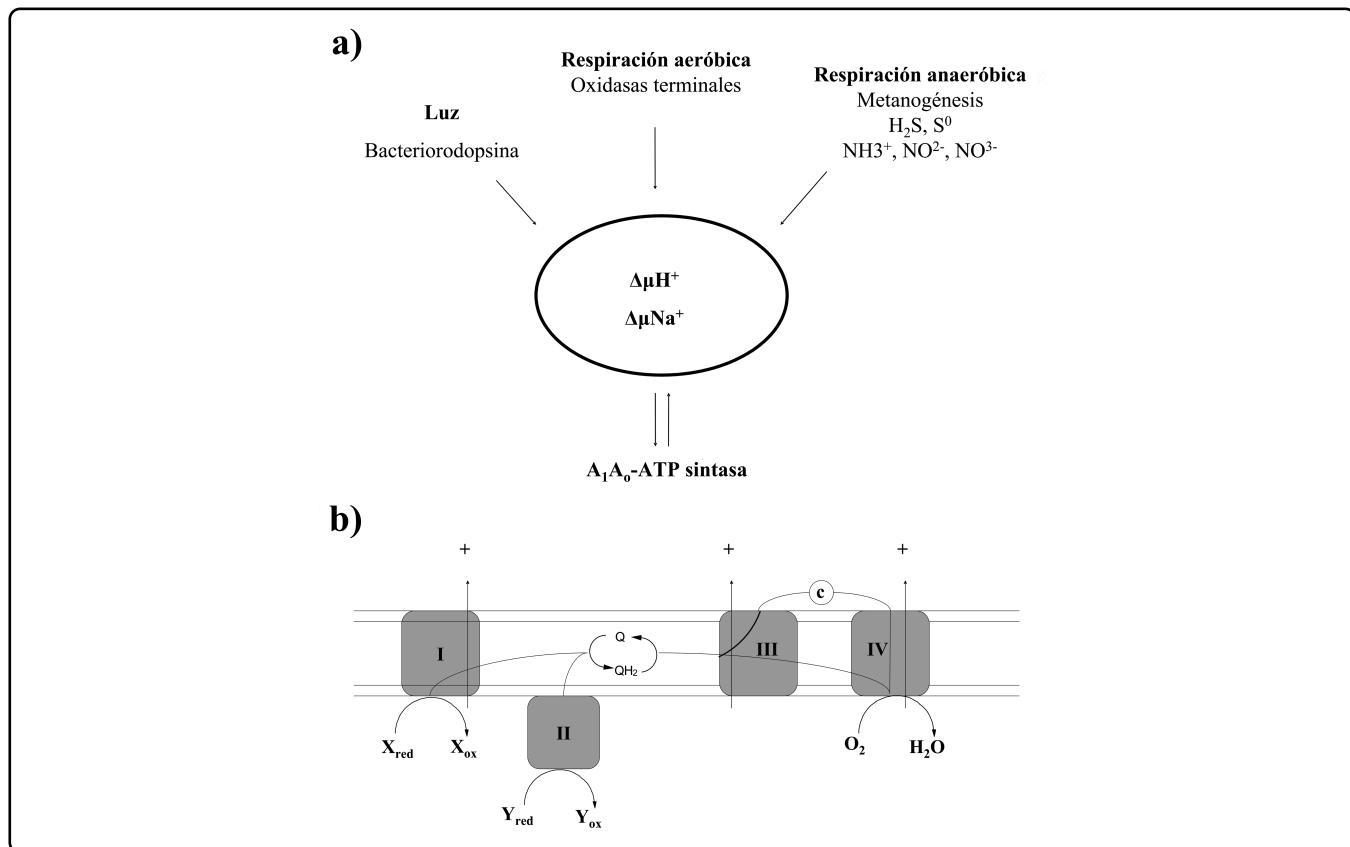


Figura 2. Procesos de transducción primaria de energía y modelo de cadena respiratoria en arqueas. a) Procesos que contribuyen a la formación de un potencial electroquímico de membrana ($\Delta\mu\text{H}^+$ o $\Delta\mu\text{Na}^+$) a través de la membrana plasmática en arqueas. Modificado de Schäfer *et al.* (1999)⁹. **b)** Esquema de la cadena de transporte de electrones en arqueas. I: X: quinona oxidoreductasa ($\text{X} = \text{NAD(P)H}, \text{F}_{420}\text{H}_2$, otros); II: Y: quinona oxidoreductasa ($\text{Y} = \text{succinato}$); Q/QH₂: quinona oxidada/reducida; III: quinol: acarreador de e^- oxidoreductasa; c: acarreador de e^- soluble; IV: acarreador de $\text{e}^-:\text{O}_2$ oxidoreductasa. Modificado de Pereira *et al.* (2004)¹⁵.

Los metanógenos son estrictamente quimiosmóticos, lo que significa que es indispensable una enzima que sintetice ATP³⁵. Por otro lado, los halófilos pueden realizar respiración/fotosíntesis, e igualmente fermentación; en este caso necesitan una enzima capaz de trabajar en ambas direcciones (síntesis e hidrólisis)³⁶. La mayoría de los hipertermófilos son estrictamente anaerobios y la obtención de ATP se encuentra ligada a la enzima Acetyl CoA sintetasa (ACS), en donde el ATP se forma a partir de un derivado de CoA, ADP y fosfato inorgánico³⁷, por lo tanto, no hay necesidad de una $\text{A}_1\text{A}_0\text{-ATP sintasa}$.

Se ha propuesto que las ATPasas provienen de un ancestro común, la hipótesis más aceptada postula que un organismo anaeróbico desarrolló una bomba de protones dependiente de ATP para la formación de un gradiente en su membrana, esta enzima evolucionó a una ATP sintasa y, posteriormente, a una bomba de H^+ ajustando nuevamente la relación estructural mediante la duplicación de genes en el rotor y la inactivación de sitios catalíticos en el sector soluble, a fin de modificar la relación H^+/ATP de acuerdo a la función a desarrollar^{34, 38} (Figura 3).

La familia de los complejos membranales de ATPasas rotatorias contiene tres miembros y cada uno juega un papel fundamental en la conversión de la energía. La $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPasa}$ (F-ATPasa) acopla la síntesis de ATP con el potencial electroquímico de membrana ($\Delta\mu$) en bacteria, mitocondria y cloroplasto, mientras que la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ (V-ATPasa) opera como una bomba de protones dependiente de la hidrólisis de ATP en membranas de eucariontes. En diferentes especies de arqueas y bacterias, la $\text{A}_1\text{A}_0\text{-ATPasa}$ (A-ATPasa) puede funcionar tanto como una ATP sintasa o como una bomba de iones³⁹. Basados en su composición polipeptídica y la secuencia primaria de las subunidades, las A-ATPasas se encuentran más relacionadas con las V-ATPasas que con las F-ATPasas⁴⁰. Morfológicamente, las A- F- y V-ATPasas contienen tres componentes (Figura 4a y 4b): un dominio de membrana $\text{A}_0/\text{F}_0/\text{V}_0$ formado por el canal de protones, un tallo central (rotor) y un dominio soluble $\text{A}_1/\text{F}_1/\text{V}_1$ que contiene las subunidades catalíticas⁴¹⁻⁴³. Una diferencia fundamental entre las ATPasas tipo V- y A- es la disociación reversible del dominio V_1 del V_0 como un mecanismo de regulación *in vivo* de la actividad de ATPasa⁴⁴.

Género	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	Referencias
<i>Acidianus</i>	Tipo II (FAD unido por enlace covalente)	Tipo E; FAD unido por enlace covalente, carece del FS3 sustituido por [4F-4S]. Carece del sitio de unión a la membrana típico (SdhC + SdhD); se propone que sólo la subunidad SdhC lleva a cabo esta función.	Citocromo <i>ba</i>	Citocromo <i>aa</i> ₃ (carece de residuo conservado I-286)	16, 17, 18, 19, 20, 21
<i>Aeropyrum</i>	—	Tipo A	Citocromo <i>bc</i>	Citocromo <i>ba</i> ₃ y Citocromo <i>aa</i> ₃ (inhibidos con cianuro y azida; pH óptimo 6.8 y 7.4, respectivamente)	15, 22, 23
<i>Halobacterium</i>	Tipo II	Sdh típica (inhibida por malonato)	Análogo citocromo <i>bc</i> ₁	Citocromo <i>c</i> oxidasa	24, 25
<i>Pyrobaculum</i> ^a	NADH oxidasa*	Tipo C; Subunidades*: FAD, Fe/S, citocromo <i>b</i>	Citocromo <i>b</i> ₅₅₉ * - FS*	Citocromo <i>aa</i> ₃ (inhibido con cianuro y azida)	15, 26, 27
<i>Sulfolobus</i>	Tipo II (FMN unido por enlace covalente)	Tipo E: unido mediante la subunidad SdhC, no contiene grupo hemo	citocromo <i>b</i> ₅₆₂ + citocromo <i>a</i> ₅₈₃ - <i>aa</i> ₃ (un solo complejo; carece de citocromo <i>c</i>)		13, 28, 29
<i>Metallosphaera</i>	Tipo II*	SdhABCD*		5 oxidadas terminales*: SoxABCDL (<i>aa</i> ₃), SoxEFGHIM (<i>bb</i> ₃), DoxBCE(<i>aa</i> ₃), SoxNL-CbsAB y FoxABCD	30

*Propuestos con base en información de genomas. ^aLa cadena es expresada constitutivamente, incluso en anaerobiosis.

Tabla I. Principales características de los complejos respiratorios de los géneros más estudiados de arqueas aeróbicas.

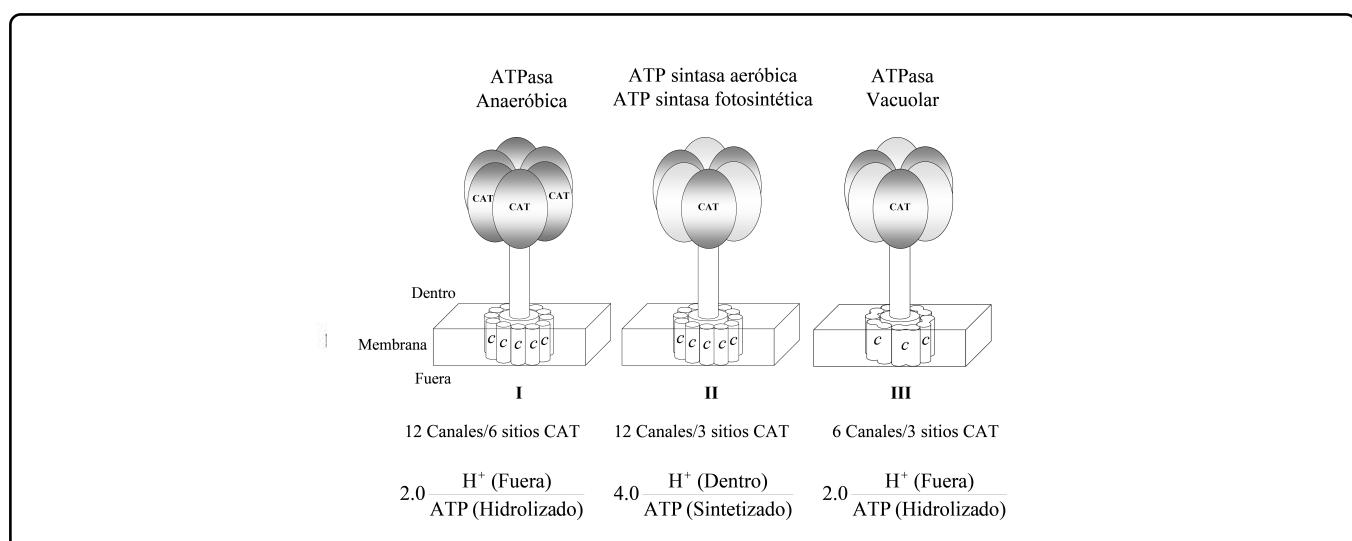


Figura 3. Evolución de las ATPasas rotatorias. La bomba de protones dependiente de ATP anaeróbica ancestral evolucionó hacia una ATP sintasa aeróbica (I → II), acompañando este cambio de función ocurrió una duplicación de genes de la subunidad catalítica (CAT), lo que provocó la pérdida de la función de tres de ellas, duplicando la relación H⁺/ATP. El siguiente cambio en la función generó una bomba de protones dependiente de ATP, nuevamente (II → III) acompañada de una duplicación en los genes de la subunidad *c* que provocó la pérdida de la mitad de sitios en el canal de H⁺, disminuyendo la relación H⁺/ATP a 2.0. Modificado de Cross & Taiz (1990)³⁸.

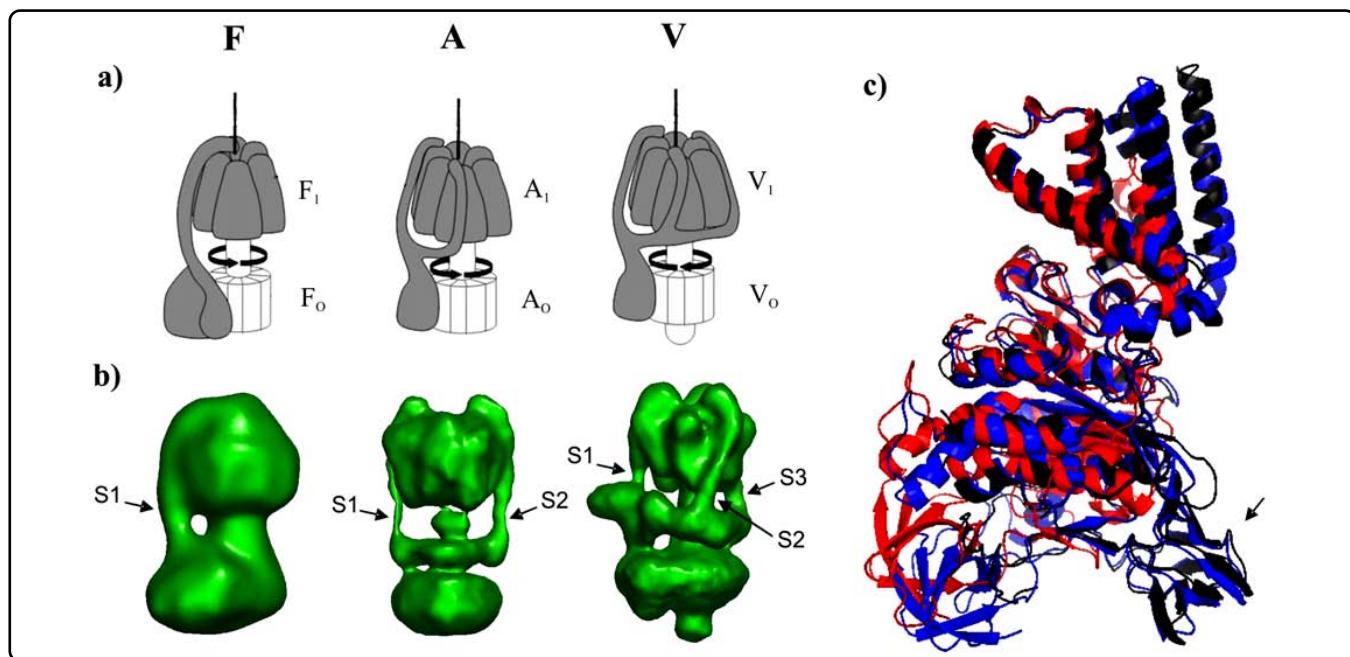


Figura 4. Modelo tridimensional de los elementos rotor/estator y sobreposición de las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas. a) Esquema de organización de los dominios de las -F, -A y -V ATPasas, las flechas indican la dirección relativa de giro del rotor central durante la síntesis de ATP (-F, -A) e hidrólisis de ATP (-V). Modificada de Muench *et al.* (2011)³⁹. b) Modelos tridimensionales obtenidos por microscopía electrónica de las -F, -A y -V ATPasas (F: EMD 1357; A: EMD 1542; V: EMD 1590), se observa la presencia de 1, 2 y 3 brazos periféricos para las -F, -A y -V ATPasas, respectivamente, y una estructura tipo "collar" en las -A y -V ATPasas. Modificada de Muench *et al.* (2011)³⁹. c) Sobreposición de las estructuras cristalográficas correspondientes a las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas (se utilizaron las estructuras obtenidas a la mayor resolución disponible). Negro: subunidad A de A-ATPasa (pdb: 3MFY, 2.35 Å); azul: subunidad A de V-ATPasa (pdb: 3GQB, 2.8 Å); rojo: subunidad β de F-ATPasa (pdb: 2JDI, 1.9 Å), la flecha indica la región no homóloga (NHR).

Debido a su origen común, las subunidades mayores de las A-ATPasas comparten cerca del 50% de identidad en la secuencia con las V-ATPasas y alrededor del 25% con las F-ATPasas⁴⁵. Las estructuras cristalográficas de las subunidades catalíticas de los tres tipos de ATPasas al empalmarse muestran que la diferencia primordial entre estas estructuras es la denominada región no homóloga (NHR) (Figura 4c), que se encuentra presente en las ATPasas tipo -V y tipo -A, únicamente, y se ha sugerido que juega un papel en la regulación de la actividad enzimática⁴⁶.

Los modelos tridimensionales obtenidos mediante criomicroscopía electrónica de la A-ATPasa de *Pyrococcus furiosus* permitieron la observación de lo que corresponde a una estructura de "collar" que actúa como un segundo estator alrededor del núcleo catalítico A₃/B₃^{47,48}. Esta estructura se encuentra más pronunciada en la familia de las V-ATPasas como se observa en el modelo del gusano de tabaco, *Manduca sexta*⁴⁹, esta estructura de "collar" no se encuentra en las F-ATPasa (Figura 4b). La A₁A₀-ATP sintasa está compuesta por un dominio catalítico (A₃/B₃), un rotor central (D, F, C y c), dos brazos periféricos (E y G), una región translocadora de protones embebida en la membrana (I) y una estructura tipo "collar" compuesta por el extremo amino de la subunidad I (Figura 5).

A la fecha no se ha reportado la estructura completa de una ATP sintasa. Para este tipo de enzimas existen 155 estructuras disponibles en el banco de datos estructurales de proteínas (PDB), las más completas corresponden a las F-ATPasas mitocondriales de bovino, de levadura y de *E. coli*. En el caso de las A-ATPasas sólo se encuentra disponible un número reducido de estructuras (25), la mayoría de ellas corresponden a subunidades aisladas (A, B, E y F). Uno de los mejores acercamientos a una estructura completa de una V-ATPasa se realizó mediante un empalme de los modelos cristalográficos de las subunidades de 6 especies diferentes ajustando al mapa tridimensional obtenido para la V-ATPasa de *M. sexta*⁴⁹; esta misma estrategia se utilizó para reconstruir un modelo completo para la A₁A₀-ATPasa de la bacteria *Thermus thermophilus*⁵².

NÚCLEO CATALÍTICO

Como se anotó, la estructura del núcleo catalítico de la familia de las ATPasas se encuentra altamente conservada. Se ha propuesto que el trímero de dímeros A/B (β/α para las F-ATPasas) proviene de una duplicación de los genes de la subunidad catalítica y la subsecuente pérdida de la actividad de tres de ellas (Figura 3). Como las A-ATPasas comparten una estructura central con las V-ATPasas, es posible equiparar la

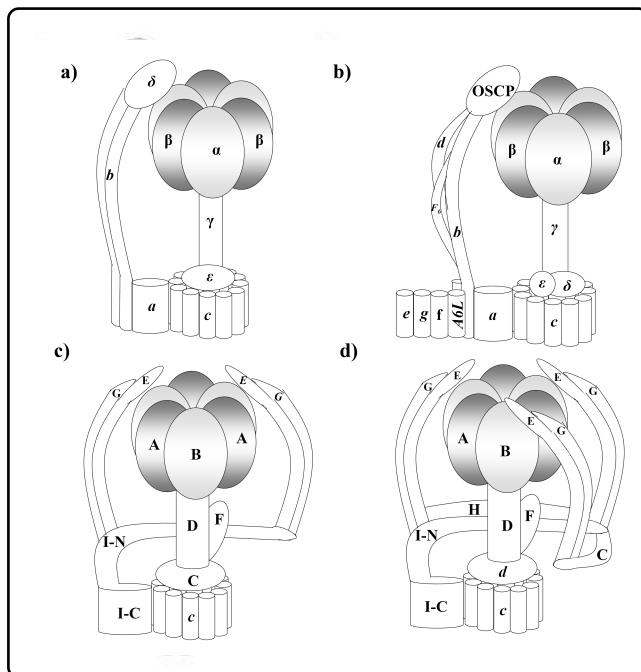


Figura 5. Estructura de las ATPasas rotatorias. Distribución de las subunidades en las -F, -A y -V ATPasas. a) ATP sintasa de *E. coli*. b) Complejo V mitocondrial de corazón de bovino. c) ATP sintasa de Arquea. d) ATPasa vacuolar. Basado en Muench *et al.* (2011)³⁹, Walker & Kane-Dickson (2006)⁵⁰, Cano-Estrada & González-Halphen (2011)⁵¹.

información estructural de estas ATPasas. Existe un total de seis posibles sitios de unión a nucleótido en el sector A₁ localizados en el núcleo catalítico A₃/B₃⁹. Estudios de marcaje de fotoafinidad y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) demostraron que tanto la subunidad catalítica A como la no catalítica B pueden unir análogos de nucleótido a pesar de que la secuencia consenso GXXGXGKTV, denominada región de unión a fosfato P-Loop, no se encuentra en la subunidad B⁵³. El mecanismo catalítico de la A₁A₀-ATP sintasa es acorde con el propuesto por Paul Boyer para la catálisis rotacional⁵⁴ en los tres sitios catalíticos formados en la interfase B-A del dominio A₁.

La estructura cristalográfica de la subunidad A de la A-ATPasa de *Pyrococcus horikoshii* reveló una inserción de aproximadamente 90 residuos en la parte superior, denominada región no homóloga (NHR), la cual no se encuentra en la subunidad no catalítica B de las A/V-ATPasas y en las F-ATPasas (Figura 6a y 6b)⁵⁵. Como se observa en la estructura cristalográfica del sector A₃/B₃ de la bacteria *T. thermophilus*, esta NHR también se encuentra presente en la subunidad A de las V-ATPasas⁵⁶. Lo anterior implica que la estructura global del sector A₁/V₁ difiere notablemente de la estructura semiesférica observada para el dominio F₁ de las F-ATPasas, en donde las subunidades α y β se sobreponen con un RMS menor a 1 sin tomar en cuenta el P-Loop⁵⁷. Estructuralmente, la subunidad B puede ser dividida en tres dominios: amino terminal barril β

(1-71), dominio α/β (113-184) y extremo carboxilo (442-565). Por su parte, la subunidad catalítica A adicionalmente posee el dominio NHR (185-204), el P-loop (222-250), y un aza hidrofóbica (374-407)⁵⁶ (Figura 6a).

CANAL DE H⁺/Na⁺ Y ROTOR CENTRAL

El dominio traslocador de iones (A₀) contiene un anillo de proteolípidos (subunidad c) y una copia de la subunidad anfifílica I que se encuentra adyacente al anillo, ambos forman un canal para el flujo de iones⁵⁸. Por otro lado, el tallo central se compone por las subunidades C, D y F. La subunidad D tiene una estructura larga de hélices entrecruzadas y se inserta en una cavidad hidrofóbica en el interior del núcleo catalítico A₃/B₃⁵⁹ de forma similar a la subunidad γ de las F-ATPAsas⁶⁰. La evidencia experimental de la rotación del tallo central de la A-ATPasa se obtuvo de forma análoga a la del dominio F₁ de la F-ATPasa⁶¹, detectando el movimiento de una perla unida a la subunidad D mediante un filamento de biotina-estreptavidina al agregar ATP que es hidrolizado por el dominio V₁ (A₃/B₃, D, F), que a su vez se encuentra inmovilizado en una superficie por medio de una etiqueta de histidinas en la subunidad A⁶².

Asociada a la subunidad D en el tallo central se ubica la subunidad F que sólo se encuentra presente en las A- y V-ATPAsas y no tiene contraparte en las F-ATPAsas³⁹ (Figura 5). Utilizando estructuras de RMN de segmentos de las subunidades D y B de *Methanosarcina mazei*, en estudios de dinámica molecular y otros, se ha propuesto que ambas subunidades interaccionan por sus extremos carboxilos de forma tal que la subunidad D adquiere una estructura contraída o elongada acorde a la rotación del tallo central en esta arquea⁶³. Sin embargo, esta interacción no pudo ser corroborada en la estructura cristalográfica obtenida para el dominio V₁ de *Thermus thermophilus* debido a la baja resolución (4.51 Å) del modelo obtenido⁵⁹. En un estudio reciente, se ha propuesto una contribución de esta interacción entre las subunidades D y B en la síntesis de ATP favoreciendo la unión del nucleótido a la subunidad B, acoplando energéticamente la rotación del tallo central con el núcleo catalítico⁶⁴.

En general, las subunidades c que han sido purificadas a partir de arqueas tienen una masa molecular parecida a la subunidad c de las F₁F₀-ATPAsas de aproximadamente 8 kDa con dos segmentos transmembranales⁶⁵⁻⁶⁷. En contraste, algunos metanógenos como *Methanothermobacter thermoautotrophicus* y *M. jannaschii* poseen subunidades de mayor tamaño de dos o tres rizos transmembrana que posiblemente provienen de duplicación y triplicación de genes respectivamente, con la subsecuente fusión de éstos (Figura 7)⁶⁸. En el caso de *M. thermoautotrophicus* el carboxilato del canal de iones se encuentra presente en las hélices 2 y 4, mientras que en *M. jannaschii* se encuentra únicamente en las hélices 4 y 6, dado que en la hélice 2 ha sido sustituido por un residuo de glutamina^{69,70}. En el organismo

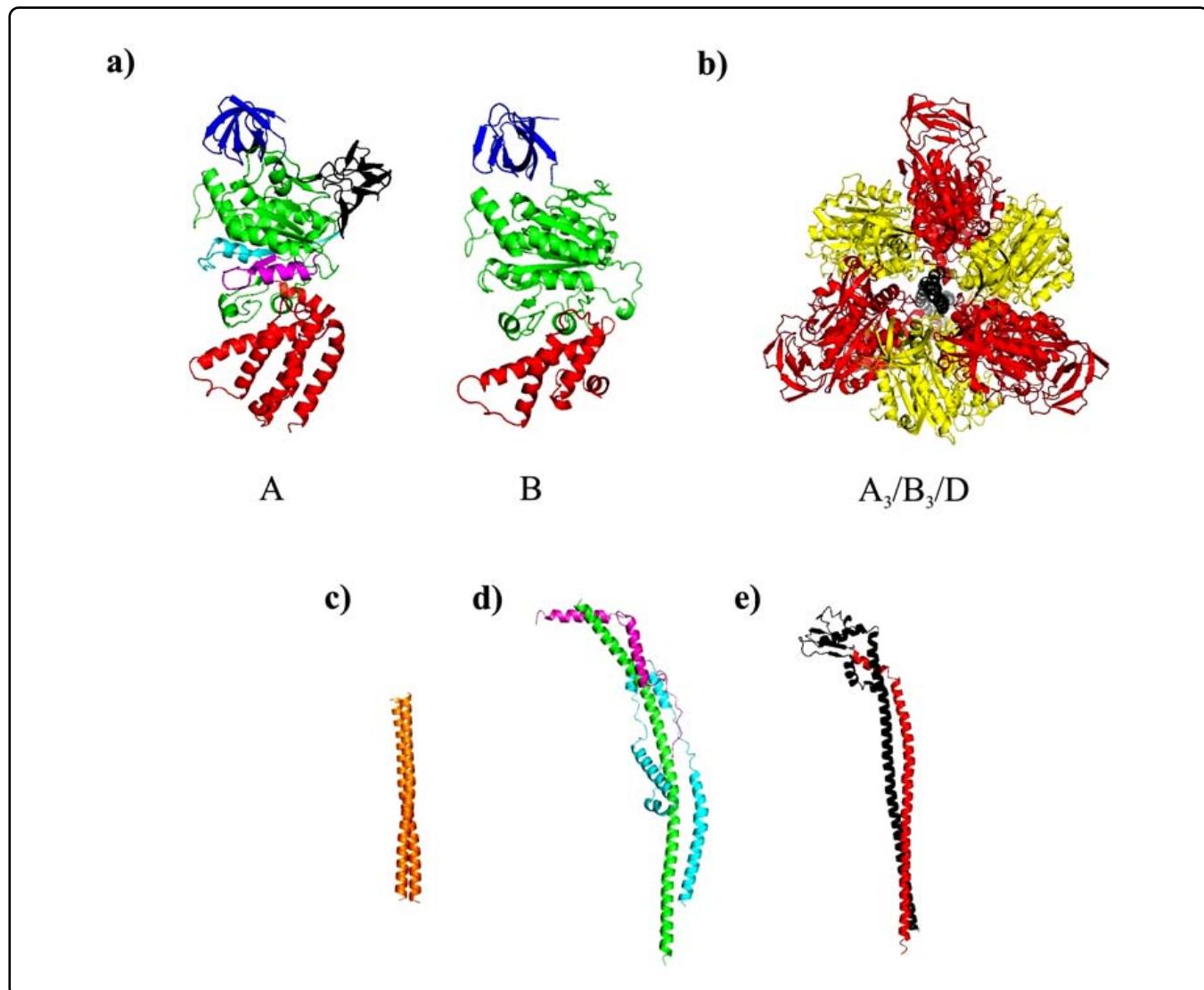


Figura 6. Estructura de las subunidades del núcleo catalítico de la A_{A₀}-ATP y de los brazos periféricos de las -F y -V ATPasas. Parte superior: a) Dominios presentes en las subunidades A y B: amino terminal barril β (azul marino), dominio α/β (verde) y extremo carboxilo (rojo), adicionalmente en la subunidad A: dominio NHR (negro), el P-loop (azul claro), y un asa hidrófoba (violeta) pdb 3GQB. b) Estructura del núcleo catalítico A₃/B₃/D; se observa la presencia del dominio NHR en las subunidades A (rojo); subunidad B (amarillo); subunidad D (negro) pdb 3A5C. Parte inferior: Se observa una estructura de hélices entrecruzadas como parte central del brazo. c) Región formadora del dímero (b_{62-122}) de la F-ATPasa de *E. coli* (pdb: 1L2P). d) Brazo periférico (b_{79-183} ; d_{3-123} ; F_{65-70}) del complejo V mitocondrial de bovino (pdb: 2CLY). e) Brazo periférico de la A-ATP sintasa de *T. thermophilus* (subunidades E y G) (pdb: 3K5B).

hipertermófilo *P. furiosus* la subunidad *c* tiene una masa molecular de ~16 kDa. Al purificar la enzima se observó una asociación del oligómero de subunidades *c* y la subunidad *I* de 60 kDa resistente al SDS en geles desnaturizantes⁴⁸. Un caso extraordinario es el organismo *Methanopyrus kandleri* en donde el gen *ntpK* codifica para una subunidad *c* repetida 13 veces y se propone que la base del rotor se forma por una sola subunidad, aunque no es posible descartar una edición postraduccional de la proteína, por lo que el tamaño real de la subunidad en el complejo debe ser verificado⁷¹.

BRAZOS PERIFÉRICOS

El brazo periférico es un componente adicional requerido para contrarrestar la fuerza de torsión mecánica generada por la rotación del tallo central de la enzima durante la síntesis e hidrólisis de ATP, así como para conectar el núcleo catalítico con la base membranal. El número de estos estatores varía según el tipo de ATP sintasa siendo de 1, 2 y 3 para las F-, A- y V-, respectivamente (Figura 5). Cada uno de los tallos periféricos de las enzimas tipo A- y V- se forman por un heterodímero de subunidades E y G^{52,72}, mientras que la composición del brazo

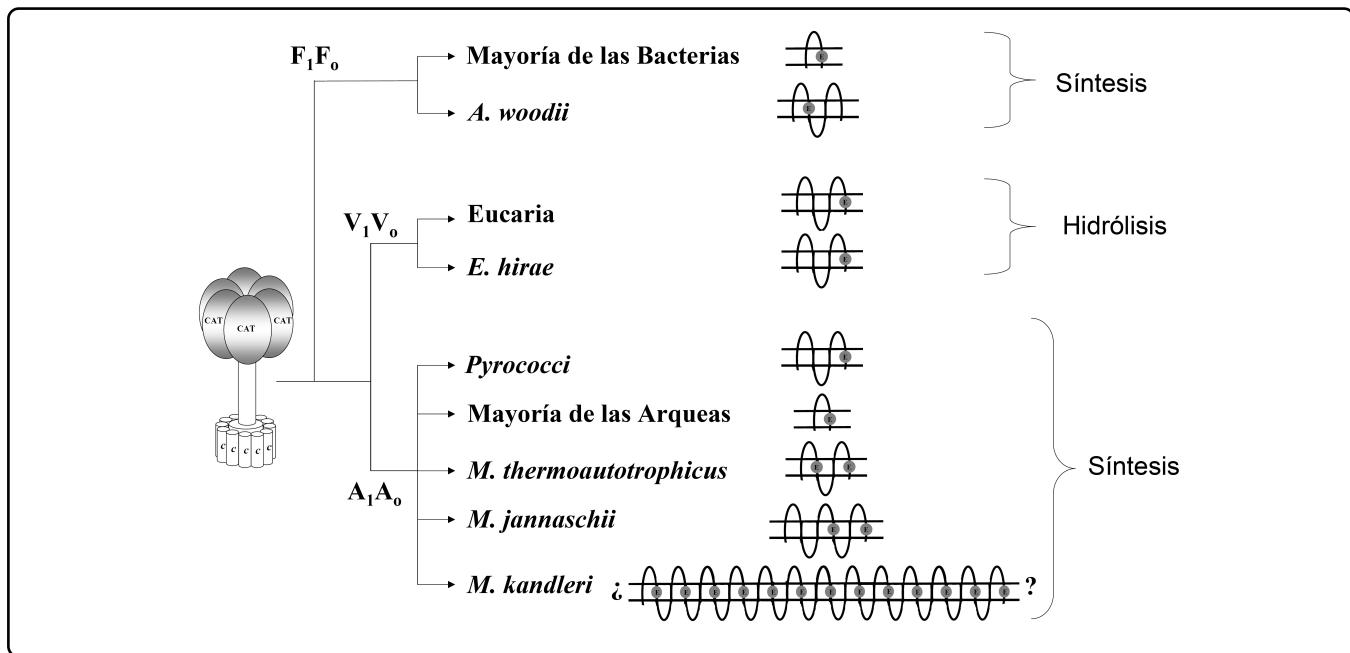


Figura 7. Estequiometría de la subunidad c en las -F, -V y -A ATPasas. Una subunidad c clásica (2 segmentos transmembranales) estaba presente en el ancestro común a todas las ATPasas rotatorias (Modificado de Müller et al. (2006)⁶⁸).

en las F-ATPasas es muy variable entre organismos⁵¹. A la fecha no se ha logrado resolver la estructura de ningún estator periférico completo junto con la porción membranal y la información disponible corresponde a estudios estructurales de subcomplejos aislados o junto al núcleo catalítico⁷³⁻⁷⁵.

Las subunidades G(H) y E fueron propuestas inicialmente para la formación de la estructura de tipo “collar” por los grupos de Müller y Gruber^{47,76}, sin embargo, a partir de estudios del mismo y otros grupos de investigación se ha podido llegar a un modelo más detallado en el cual la estructura de “collar” se encuentra formada por la subunidad I que extiende su extremo amino hacia la fracción extramembranal⁷⁷ y es la encargada de unir los dos estatores^{31,52} (Figura 5), en contraste con las F-ATPasas, en las que la subunidad b desarrolla esta función⁷⁸.

La estructura cristalográfica del estator heterodimérico (E y G) que une a la subunidad I con una subunidad B del núcleo catalítico permitió observar una estructura de hélices entrecruzadas dextrógiros⁷⁵ (Figura 6). Se ha postulado que este tipo de plegamiento se encuentra presente en la región formadora del dímero de las subunidades B del brazo de la F-ATPasa de *E. coli*^{79, 80}; sin embargo, existen estudios que proponen que esta región podría formar hélices entrecruzadas levógiros^{81, 82}. En el caso del brazo periférico de la F-ATPasa de bovino no está claro el sentido de las hélices presentes, ya que las estructuras se han obtenido a partir de segmentos de las subunidades^{73, 74} (Figura 6).

UTILIZACIÓN DEL $\Delta\mu(\text{Na}^+)$ Y $\Delta\mu(\text{H}^+)$ EN ARQUEAS METANOGÉNICAS

Las arqueas metanogénicas son una de las pocas formas de vida que producen un potencial electroquímico transmembranal ($\Delta\mu$) de iones H^+ y Na^+ , simultáneamente. La metanogénesis se sugiere como una de las primeras rutas metabólicas desarrolladas en la Tierra⁸³. La especificidad de la ATP sintasa por el ión a utilizar se encuentra definida por la región traslocadora en la base de la enzima (A_o), formada por un anillo que agrupa múltiples copias de la subunidad c (K/L), cada una de las cuales posee un sitio de unión⁶⁸. Una de las incógnitas más representativas es cómo aprovechan cada uno de estos gradientes este grupo de organismos. Los primeros estudios con inhibidores indicaron la presencia de una F_1F_o -ATP sintasa y una A_1A_o -ATP sintasa en la membrana plasmática de *M. mazei* Gö1, se propuso que estas enzimas utilizan los iones Na^+ y H^+ para la síntesis de ATP respectivamente, lo que indica una independencia del ión en la síntesis de ATP⁸⁴. Por otra parte, el crecimiento de la especie *Methanobrevibacter ruminantium* M1 fue inhibido por ionóforos y protonóforos de sodio lo que demuestra que ambos gradientes son esenciales⁸⁵. Para elucidar la importancia de la F_1F_o -ATPasa en estos organismos, el operón de la ATPasa en *Methanosarcina acetivorans* se intercambió por un cassette de resistencia a puromicina. La mutante presentó un crecimiento equivalente al de la cepa silvestre, con un contenido de ATP celular idéntico, lo que demostró que los genes de la F_1F_o -ATPasa no son esenciales para la supervivencia de este organismo⁸⁶. Recientemente, Schlegel y colaboradores demostraron que la A_1A_o -ATP sintasa de *M. acetivorans* es

capaz de utilizar ambos gradientes (Na^+ y H^+) simultáneamente para sintetizar ATP⁸⁷.

CONCLUSIONES

El estudio de los complejos respiratorios en arqueas aeróbicas aún se encuentra en una etapa temprana, lo que parcialmente se debe a la dificultad para aislar y cultivar estos organismos, por su dependencia de condiciones muy específicas (extremas) para su desarrollo. Sin embargo, la investigación con arqueas ha permitido esclarecer mecanismos biológicos y características estructurales que proporcionan una visión mucho más amplia de los organismos vivos y, por lo tanto, es necesario continuar con el estudio de estos complejos para abrir las puertas a todo un abanico de nuevas posibilidades sobre la transducción primaria de energía a través de las membranas.

Por otro lado, muchas vías de obtención de energía en arqueas involucran al complejo A_1A_o -ATP sintasa (Figura 2a); esto,

aunado a su similitud con las V_1V_o -ATP sintasa de eucariotes y su importancia en las arqueas metanogénicas, ha despertado interés por una gran diversidad de estudios estructurales y bioquímicos sobre este complejo. El conjunto de trabajos disponibles hasta la fecha permitió proponer un modelo estructural (inicial) que ha evolucionado y actualmente ha sido construido casi por completo (Figura 8). Esto no implica el final de su estudio, sino el comienzo de una nueva etapa abriendo puertas hacia la elucidación de su mecanismo catalítico, su regulación y las diferencias estructurales dentro de cada una de las especies, entre otros aspectos.

En general, la información disponible acerca de las arqueas se ha obtenido en relativamente poco tiempo; su importancia evolutiva, biológica y biotecnológica^{3, 88} parece representar sólo una pequeña proporción de lo que las arqueas tienen que ofrecer, lo que es un incentivo para continuar con la investigación referente a este fascinante dominio de la vida.

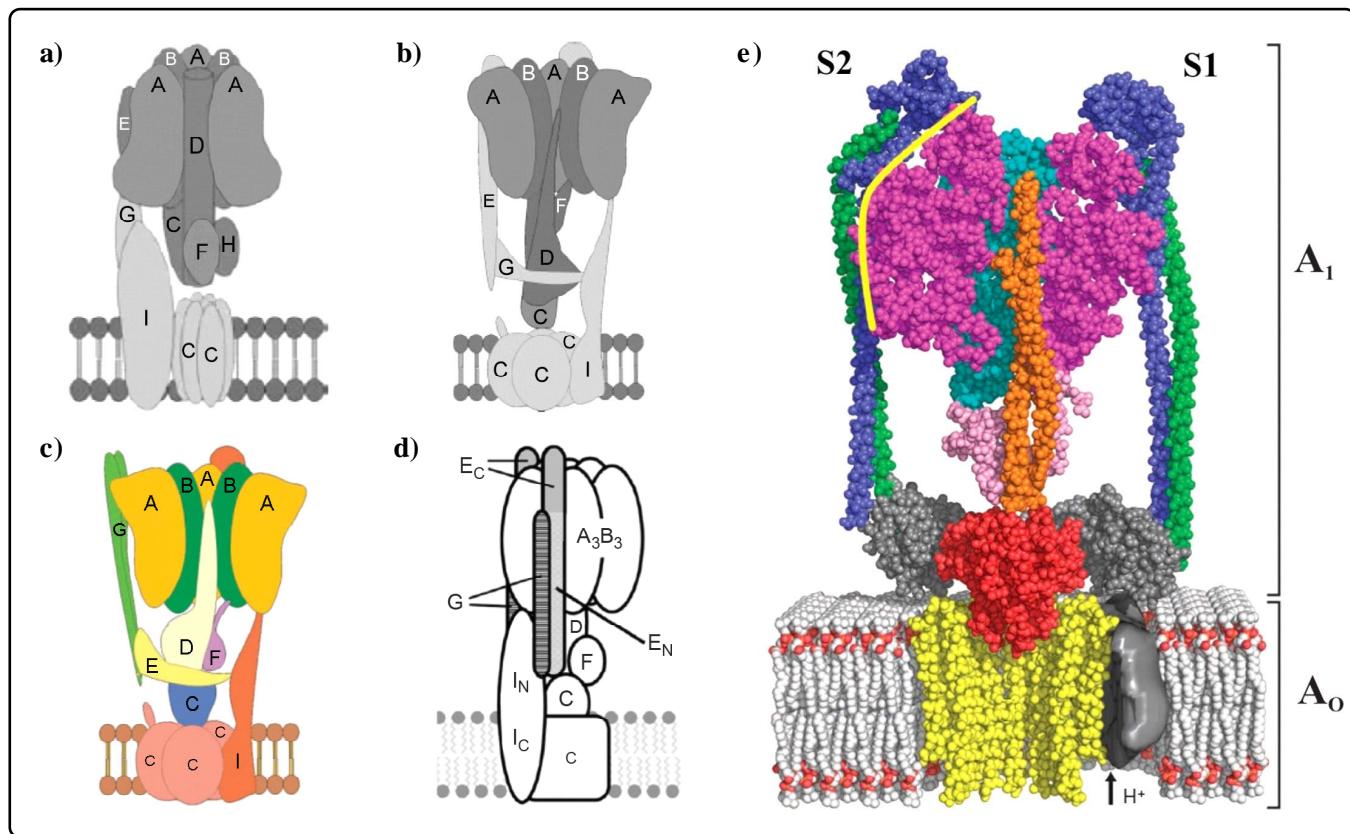


Figura 8. Evolución del modelo estructural de la A_1A_o -ATP sintasa. Se observan los cambios en la distribución de las subunidades a través del tiempo. En los primeros modelos (a), (b), (c) la subunidad I se proponía para formar parte directa de los brazos periféricos. Es hasta los trabajos de Kish-Trier y colaboradores que se proponen dos estatores idénticos heterodiméricos (d), los cuales han sido incorporados al modelo actual (e); en éste se observan los dominios A_1 y A_o , así como los estatores 1 y 2 (S1 y S2) Canal de H^+ y rotor central: subunidad I (gris); anillo de subunidades c (amarillo), subunidad C (rojo), subunidad F (rosa), subunidad D (naranja); Núcleo catalítico: subunidades B (violeta), subunidad A (cian) (dos subunidades A y una B fueron eliminadas por claridad); Brazos periféricos: subunidad G (verde), subunidad E (azul). Modificados de (a) Müller & Grüber (2003)⁷⁷, (b) Coskun *et al.* (2004)⁴⁷, (c) Grüber & Marshansky (2008)⁷⁶, (d) Kish-Trier *et al.* (2008)³¹, (e) Stewart *et al.* (2012)⁵².

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los proyectos: 128110 (CONACyT) e IN203311-3 de la DGAPA (UNAM). Héctor Vicente Miranda-Astudillo es becario de CONACyT (229474). Se agradece a los doctores Diego González-Halphen (IFC-UNAM), Salvador Uribe-Carvalj (IFC-UNAM) y Arturo Becerra-Bracho (FC-UNAM) por sus valiosas opiniones en la realización de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Zillig, W. Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Curr. Opin. Genet Dev.* **1**, 544-551 (1991).
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579 (1990).
- Jarrell, K.F. *et al.* Major players on the microbial stage: why archaea are important. *Microbiology* **157**, 919-936 (2011).
- Gupta, R.S. & Shami, A. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 133-157 (2011).
- Lewalter, K. & Müller, V. Bioenergetics of archaea: ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 437-445 (2006).
- Huber, H. *et al.* A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **2**, 63-67 (2002).
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. & Pace, N.R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9188-9193 (1996).
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 245-252 (2008).
- Schäfer, G., Engelhard, M. & Müller, V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 570-620 (1999).
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **4784**, 144-148 (1961).
- Deppenmeier, U. Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1513-1533 (2002).
- Müller, V. *et al.* Bioenergetics of archaea: ATP synthesis under harsh environmental conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 167-180 (2005).
- Iwasaki, T., Matsuura, K. & Oshima, T. Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **270**, 30881-30892 (1995).
- Schäfer, G., Purschke, W.G., Gleissner, M. & Schmidt, C.L. Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 16-20 (1996).
- Pereira, M.M. *et al.* Respiratory chains from aerobic thermophilic prokaryotes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 93-105 (2004).
- Brito, J.A., Bandeiras, T.M., Teixeira, M., Vonrhein, C. & Archer, M. Crystallisation and preliminary structure determination of a NADH: quinone oxidoreductase from the extremophile *Acidianus ambivalens*. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 842-845 (2006).
- Gomes, C.M., Bandeiras, T.M. & Teixeira, M. A new type-II NADH dehydrogenase from the archaeon *Acidianus ambivalens*: characterization and in vitro reconstitution of the respiratory chain. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 1-8 (2001).
- Gomes, C.M. *et al.* The unusual iron sulfur composition of the *Acidianus ambivalens* succinate dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 134-141 (1999).
- Lemos, R.S., Gomes, C.M. & Teixeira, M. *Acidianus ambivalens* Complex II typifies a novel family of succinate dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 141-150 (2001).
- Bandeiras, T.M. *et al.* The cytochrome *ba* complex from the thermoacidophilic crenarchaeote *Acidianus ambivalens* is an analog of *bc1* complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 37-45 (2009).
- Gilderson, G. *et al.* Kinetics of electron and proton transfer during O₂ reduction in cytochrome aa₃ from *A. ambivalens*: an enzyme lacking Glu(I-286). *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 261-270 (2001).
- Kabashima, Y. & Sakamoto, J. Purification and biochemical properties of a cytochrome *bc* complex from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *BMC Microbiology* **11**, 52 (2011).
- Ishikawa, R. *et al.* *Aeropyrum pernix* K1, a strictly aerobic and hyperthermophilic archaeon, has two terminal oxidases, cytochrome ba₃ and cytochrome aa₃. *Arch. Microbiol.* **179**, 42-49 (2002).
- Sreeramulu, K., Schmidt, C.L., Schäfer, G. & Anemüller, S. Studies of the electron transport chain of the euryarchaeon *Halobacterium salinarum*: indications for a type II NADH dehydrogenase and a complex III analog. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 443-453 (1998).
- González, O. *et al.* Systems analysis of bioenergetics and growth of the extreme halophile *Halobacterium salinarum*. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000332 (2009).
- Nunoura, T., Sako, Y., Wakagi, T. & Uchida, A. Regulation of the aerobic respiratory chain in the facultatively aerobic and hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum oguniense*. *Microbiology* **149**, 673-688 (2003).
- Nunoura, T., Sako, Y., Wakagi, T. & Uchida, A. Cytochrome aa3 in facultatively aerobic and hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum oguniense*. *Can. J. Microbiol.* **51**, 621-627 (2005).
- Bandeiras, T.M., Salgueiro, C.A., Huber, H., Gomes, C.M. & Teixeira, M. The respiratory chain of the thermophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: studies on the type-II NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1557**, 13-19 (2003).
- Hamann, N. *et al.* The CCG-domain-containing subunit SdhE of succinate:quinone oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus* P2 binds a [4Fe-4S] cluster. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 457-470 (2009).
- Auerlik, K.S. & Kelly, R.M. Identification of components of electron transport chains in the extremely thermoacidophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula* through iron and sulfur compound oxidation transcriptomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7723-7732 (2008).
- Kish-Trier, E., Briere, L.K., Dunn, S.D. & Wilkens, S. The stator complex of the A_iA₀-ATP synthase-structural characterization of the E and H subunits. *J. Mol. Biol.* **375**, 673-685 (2008).
- Kish-Trier, E. & Wilkens, S. Domain architecture of the stator complex of the A_iA₀-ATP synthase from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **284**, 12031-12040 (2009).
- Kish-Trier, E. & Wilkens, S. Interaction of the *Thermoplasma acidophilum* A_iA₀-ATP synthase peripheral stalk with the

- catalytic domain. *FEBS Letters* **583**, 3121-3126 (2009).
34. Cross, R.L. & Müller, V. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Letters* **576**, 1-4 (2004).
35. Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* **165**, 149-163 (1996).
36. Bickel-Sandkötter, S., Gartner, W. & Dane, M. Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. *Arch. Microbiol.* **166**, 1-11 (1996).
37. Adams, M.W. The biochemical diversity of life near and above 100°C in marine environments. *J. Appl. Microbiol. Syn. Sup.* **85**, 108s-117s (1998).
38. Cross, R.L. & Taiz, L. Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of F_oF₁ATPases and synthases. *FEBS Letters* **259**, 227-229 (1990).
39. Muench, S.P., Trinick, J. & Harrison, M.A. Structural divergence of the rotary ATPases. *Q. Rev. Biophys.* **44**, 311-356 (2011).
40. Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. & Miyata, T. Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9355-9359 (1989).
41. Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G. & Walker, J.E. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 672-679 (2000).
42. Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R. & Müller, V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **204**, 2597-2605 (2001).
43. Nishi, T. & Forgac, M. The vacuolar H⁺-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103 (2002).
44. Wieczorek, H. *et al.* Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 127-135 (2000).
45. Müller, V., Ruppert, C. & Lemker, T. Structure and function of the A₁A₀-ATPases from methanogenic Archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 15-27 (1999).
46. Shao, E., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. & Forgac, M. Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **278**, 12985-12991 (2003).
47. Coskun, U. *et al.* Structure and subunit arrangement of the A-type ATP synthase complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii* visualized by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **279**, 38644-38648 (2004).
48. Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B. & Müller, V. Three-dimensional structure of A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **284**, 10110-10119 (2009).
49. Muench, S.P. *et al.* Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *J. Mol. Biol.* **386**, 989-999 (2009).
50. Walker, J.E. & Kane-Dickson, V. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 286-296 (2006).
51. Cano-Estrada, A. & González-Halphen, D. F₁F_o-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB* **30**, 98-108 (2011).
52. Stewart, A.G., Lee, L.K., Donohoe, M., Chaston, J.J. & Stock, D. The dynamic stator stalk of rotary ATPases. *Nat. Commun.* **3**, 687 (2012).
53. Schäfer, I.B. *et al.* Crystal structure of the archaeal A₁A₀ ATP synthase subunit B from *Methanosarcina mazei* Gö1: Implications of nucleotide-binding differences in the major A₁A₀ subunits A and B. *J. Mol. Biol.* **358**, 725-740 (2006).
54. Boyer, P.D. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* **3**, 2164-2178 (1989).
55. Maegawa, Y. *et al.* Structure of the catalytic nucleotide-binding subunit A of A-type ATP synthase from *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel domain related to the peripheral stalk. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 483-488 (2006).
56. Maher, M.J. *et al.* Crystal structure of A₃B₃ complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO Journal* **28**, 3771-3779 (2009).
57. Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628 (1994).
58. Bernal, R.A. & Stock, D. Three-dimensional structure of the intact *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase by electron microscopy. *Structure* **12**, 1789-1798 (2004).
59. Numoto, N., Hasegawa, Y., Takeda, K. & Miki, K. Inter-subunit interaction and quaternary rearrangement defined by the central stalk of prokaryotic V₁-ATPase. *EMBO Reports* **10**, 1228-1234 (2009).
60. Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Structural Biology* **7**, 1055-1061 (2000).
61. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinoshita, K. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**, 299-302 (1997).
62. Imamura, H. *et al.* Evidence for rotation of V₁-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2312-2315 (2003).
63. Ragunathan, D., Gayen, S., Grüber, G. & Verma, C.S. Crosstalk along the stalk: dynamics of the interaction of subunits B and F in the A₁A₀ATP synthase of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* **49**, 4181-4190 (2010).
64. Ragunathan, D. *et al.* Subunit F modulates ATP binding and migration in the nucleotide-binding subunit B of the A₁A₀ATP synthase of *Methanosarcinamazei* Gö1. *J. Bioenerg. Biomembr.* **44**, 213-224 (2012).
65. Ihara, K., Watanabe, S., Sugimura, K., Katagiri, I. & Mukohata, Y. Identification of proteolipid from an extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* as an N,N'-dicyclohexylcarbodiimide binding subunit of ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 267-272 (1997).
66. Wilms, R. *et al.* Subunit structure and organization of the genes of the A₁A₀ ATPase from the Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* **271**, 18843-18852 (1996).
67. Inatomai, K., Maeda, M. & Futai, M. Dicyclohexylcarbodiimide-binding protein is a subunit of the *Methanosarcina barkeri* ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1585-1590 (1989).
68. Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K. & Fritz, M. ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 455-460 (2006).
69. Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. & Müller, V. The A₁A₀ ATPase from *Methanosarcina mazei*: cloning of the 5' end of the aha operon encoding the membrane domain and expression of the proteolipid in a membrane-bound form in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3448-3452 (1998).
70. Ruppert, C. *et al.* The proteolipid of the A₁A₀ ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. *J.*

- Biol. Chem.* **274**, 25281-25284 (1999).
71. Lolkema, J.S. & Boekema, E.J. The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. *FEBS Letters* **543**, 47-50 (2003).
72. Zhang, Z. et al. Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35983-35995 (2008).
73. Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO Journal* **25**, 2911-2918 (2006).
74. Rees, D.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21597-21601 (2009).
75. Lee, L.K., Stewart, A.G., Donohoe, M., Bernal, R.A. & Stock, D. The structure of the peripheral stalk of *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase. *Nature Structural Biology* **17**, 373-378 (2010).
76. Grüber, G. & Marshansky, V. New insights into structure-function relationships between archaeal ATP synthase (A_iA_o) and vacuolar type ATPase (V_iV_o). *BioEssays* **30**, 1096-1109 (2008).
77. Müller, V. & Grüber, G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 474-494 (2003).
78. Weber, J. ATP synthase—the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 53-56 (2007).
79. Del Rizzo, P.A., Bi, Y., Dunn, S.D. & Shilton, B.H. The “second stalk” of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry* **41**, 6875-6884 (2002).
80. Del Rizzo, P.A., Bi, Y. & Dunn, S.D. ATP synthase b subunit dimerization domain: a right-handed coiled coil with offset helices. *J. Mol. Biol.* **364**, 735-746 (2006).
81. Wise, J.G. & Vogel, P.D. Subunit b-dimer of the *Escherichia coli* ATP synthase can form left-handed coiled-coils. *Biophysical Journal* **94**, 5040-5052 (2008).
82. Wise, J.G. & Vogel, P.D. Accommodating discontinuities in dimeric left-handed coiled coils in ATP synthase external stalks. *Biophysical Journal* **96**, 2823-2831 (2009).
83. Deppenmeier, U. & Müller, V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 123-152 (2007).
84. Becher, B. & Müller, V. ΔμNa⁺ drives the synthesis of ATP via an ΔμNa⁺-translocating F₁F₀-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* GÖ1. *J. Bacteriol.* **176**, 2543-2550 (1994).
85. McMillan, D.G. et al. A_iA_o-ATP synthase of *Methanobrevibacter ruminantium* couples sodium ions for ATP synthesis under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **286**, 39882-39892 (2011).
86. Saum, R., Schlegel, K., Meyer, B. & Müller, V. The F₁F₀ ATP synthase genes in *Methanosarcina acetivorans* are dispensable for growth and ATP synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **300**, 230-236 (2009).
87. Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gómez, J.D. & Müller, V. Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na⁺ and H⁺ translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 947-952 (2012).
88. de Champdoré, M., Staiano, M., Rossi, M. & D'Auria, S. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J. R. Soc. Interface* **4**, 183-191 (2007).



Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp.



Héctor Miranda-Astudillo ^{a,1}, Araceli Cano-Estrada ^{a,1}, Miriam Vázquez-Acevedo ^a, Lilia Colina-Tenorio ^a, Angela Downie-Velasco ^a, Pierre Cardol ^b, Claire Remacle ^b, Lenin Domínguez-Ramírez ^{a,2}, Diego González-Halphen ^{a,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2013

Received in revised form 24 July 2013

Accepted 2 August 2013

Available online 9 August 2013

Keywords:

F₁F_O-ATP synthase peripheral-stalk

Dimeric mitochondrial complex V

Chlorophycean algae

Chlamydomonas reinhardtii

Polytomella sp.

Asa subunits

ABSTRACT

Mitochondrial F₁F_O-ATP synthase of chlorophycean algae is a complex partially embedded in the inner mitochondrial membrane that is isolated as a highly stable dimer of 1600 kDa. It comprises 17 polypeptides, nine of which (subunits Asa1 to 9) are not present in classical mitochondrial ATP synthases and appear to be exclusive of the chlorophycean lineage. In particular, subunits Asa2, Asa4 and Asa7 seem to constitute a section of the peripheral stalk of the enzyme. Here, we over-expressed and purified subunits Asa2, Asa4 and Asa7 and the corresponding amino-terminal and carboxy-terminal halves of Asa4 and Asa7 in order to explore their interactions in vitro, using immunochemical techniques, blue native electrophoresis and affinity chromatography. Asa4 and Asa7 interact strongly, mainly through their carboxy-terminal halves. Asa2 interacts with both Asa7 and Asa4, and also with subunit α in the F₁ sector. The three Asa proteins form an Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. The entire Asa7 and the carboxy-terminal half of Asa4 seem to be instrumental in the interaction with Asa2. Based on these results and on computer-generated structural models of the three subunits, we propose a model for the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex and for its disposition in the peripheral stalk of the algal ATP synthase.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial F₁F_O-ATP synthase (complex V) is the main ATP producing enzyme in non-photosynthetic eukaryotes. The complex works as a rotary motor driven by an electrochemical proton gradient [1,2]. Proton translocation through the F_O sector drives rotation of the central stalk (the gamma subunit) that extends from the membrane-embedded c-ring into the center of the F₁ sector. The conformational changes induced by the gamma subunit in F₁ allow the synthesis of ATP in the catalytic sites of the beta subunits [3]. Chlorophycean algae like *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp. exhibit a highly stable, dimeric mitochondrial F₁F_O-ATP synthase with an apparent molecular mass of 1600 kDa [4]. This dimeric complex also has a unique overall architecture exhibiting two stout peripheral stalks as judged by electron microscopy analyses [5–8]. The functional core of the algal enzyme is formed

by the eight classic subunits α , β , γ , δ , ε , α (ATP6), c (ATP9), and OSCP [9]. In addition, the complex contains nine atypical subunits (Asa1 to Asa9) that constitute the robust peripheral stalk and that seem to participate also in the dimerization of the complex [10–13]. The presence of these atypical subunits was originally suggested based on N-terminal sequences of the polypeptide components of the mitochondrial ATP synthase of *C. reinhardtii* [14] and mining of the green algal genome [15]. To date, genes encoding homologs of Asa subunits seem to be present exclusively in chlorophycean algae [13].

The subsequent biochemical characterization of the algal enzyme was carried out with *Polytomella* sp. [7], since this colorless alga, closely related to *C. reinhardtii*, lacks both chloroplasts and cell wall, therefore allowing an easy isolation of mitochondria and purification of its oxidative phosphorylation components [16,17]. Work carried out with the *Polytomella* ATP synthase established neighboring interactions between Asa subunits, mainly through the identification of subcomplexes formed by heat dissociation and by using cross-linking agents [10,12]. In particular, two cross-link products were consistently obtained, with more than one bi-functional reagent: Asa2 + Asa4 and Asa2 + Asa7 [7]. These experiments and others led to the proposal of models of the topological disposition of the Asa polypeptides [7,10,11]. In order to gain more insights on how Asa proteins interact, in this work we over-expressed and purified the recombinant Asa2, Asa4 and Asa7 subunits and explored their interactions in vitro using different experimental

* Corresponding author at: 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).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Lerma de Villada, Lerma, Mexico.

approaches. Based on the obtained data, we propose a refined model for the disposition of these three subunits in the peripheral stalk of the algal, mitochondrial ATP synthase.

2. Materials and methods

2.1. Algal strains and growth conditions

Polytomella spec. (Strain number 198.80, isolated by E.G. Pringsheim) was obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Göttingen and grown as previously described [18].

2.2. *Polytomella* mitochondrial ATP synthase purification

The algal ATP synthase was purified following the described procedure [10].

2.3. Protein analysis

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) was carried out as described [19] and denaturing gel electrophoresis was carried out in a Tricine-SDS-PAGE system [20]. When indicated, 1D-BN-PAGE was followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE [20]. Protein concentrations were estimated according to Markwell et al. [21].

2.4. Dissociation of the ATP synthase into subcomplexes

The purified algal ATP synthase (120 µg of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of 0.04% lithium dodecyl sulfate (LiDS) and the resulting sample subjected to BN-PAGE in 4–12% gradient acrylamide gels. The lane of interest was 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.

2.5. Cloning of the cDNAs encoding subunits of the ATP synthase of *Polytomella* sp. in expression vectors

The cDNAs of Asa2, Asa4-n, Asa4-c, Asa7, Asa7-n, Asa7-c were PCR-amplified from a *Polytomella* sp. cDNA library cloned in λ-ZapII phages using specific oligonucleotide primers: for Asa2, forward 5'-GAC GCT GCC GT(C/G/T) GC(C/G/T) CT(C/T) AC(C/T) TAC-3' and reverse 5'-TCA (G/A/C)AC (G/A)GC GTA (G/A)CC CTG (G/A/C)GC CTC-3'; for Asa4, forward 5'-GCT ACC GAG CCT GCT GTT TC-3' and reverse 5'-TTA AGC AGC GAC CTT AGG GC-3'; for Asa4-N, forward 5'-GCT ACC GAG CCT GCT GTT TC-3' and reverse 5'-TTA CTT GGC CTT AGC CGC AAA-3'; for Asa4-C, forward 5'-AAG TTT GGC CAG GAG ACC-3' and reverse 5'-TTA AGC AGC GAC CTT AGG GC-3'; for Asa7 forward 5'-CTT ACC ACT TTT ACC TTC-3' and reverse 5'-CTA TGC TTG GAG AGG AAG-3'; for Asa7-N forward 5'-CTT ACC ACT TTT ACC TTC-3' and reverse 5'-TTA GTT CTG GAT AGA AGA GTG GAG-3'; for Asa7-C forward 5'-ATC CAG AAC TAC CTC CTT TCT-3' and reverse 5'-CTA TGC TTG GAG AGG AAG-3'. The resulting amplicons were cloned in a pET28a vector that adds a hexa-histidine tag (6His-tag) in the N-terminus of the corresponding proteins using the following restriction sites: for Asa2 Nhel and Sall; for Asa4-N and Asa4-C, NdeI and BamHI; and for Asa7, Asa7-N and Asa7-C, NdeI and Sall. The cDNAs of Asa2, Asa4, Asa4-n, and Asa4-c were cloned in a pET3a vector (no 6His-tag) using the restriction sites NdeI and BamHI.

2.6. Overexpression of recombinant proteins

All overexpression conditions were similar for the seven proteins. *Escherichia coli* BL21-CodonPlus competent cells were transformed with their corresponding vector by heat shock at 42 °C for 2 min. Bacterial cells were grown in LB medium containing 64 µg/mL chloramphenicol supplemented with 50 µg/mL kanamycin for those expressing the pET28a vector and 100 µg/mL ampicillin for those expressing the

pET3a vector. The overexpressed polypeptides were: Asa2 (GenBank GU014474) lacking around 25 residues in the N-terminus and 39 residues in the C-terminus; the complete Asa4 subunit (GenBank GQ168485); the complete Asa7 subunit (GenBank GQ427067), the Asa4-N fragment (16.4 kDa comprising residues 1 to 154 of Asa4), the Asa4-C fragment (14.9 kDa comprising residues 107 to 194 of Asa4), the Asa7-N fragment (7.6 kDa, comprising residues 1 to 77 of Asa7) and the Asa7-C fragment (11.9 kDa, comprising residues 74 to 176 of Asa7).

2.7. Isolation of inclusion bodies

Two liters of culture media was inoculated with bacteria and incubated at 37 °C until an absorbance value of 0.6 at 600 nm was obtained. Then, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a 0.1 mM final concentration and the culture was incubated for 16 additional hours. The culture was then centrifuged at 6000 g for 15 min, and the resulting pellet resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.8) and sonicated with 8 pulses (setting 5 W, 50% output) of 5 min each using a Branson-450 sonifier. Inclusion bodies (ICBs) were recovered by centrifugation at 12,000 g for 10 min. ICBs were then washed as described [22] with slight modifications. ICBs were resuspended in PBS (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.8) containing 5% Triton and immediately after recovered by centrifugation at 12,000 g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in distilled water and centrifuged in the same conditions. These washes were repeated once again with PBS containing 5% Triton X-100 and three times with distilled water. ICBs were then refrigerated and stored at –80 °C until used.

2.8. Purification of recombinant proteins

All steps were carried out at 4 °C except when indicated. The ICBs were thawed and dissolved in PBS buffer containing 8.0 M urea for 12 h. The solution was centrifuged at 17,500 g for 10 min. The recombinant Asa4 polypeptide was dialyzed against 2 L of refolding buffer [30 mM CAPS pH 10.0, 0.5 mM sodium EDTA, 1 mM DTT, and 2% (v/v) glycerol] for 12 h and then centrifuged at 17,500 g for 10 min. The resulting supernatant was loaded on a DEAE-Sepharose FF 10/300 column (20 mL) and eluted with a gradient of 0 to 500 mM NaCl in the same refolding buffer. The Asa2, Asa4-N, Asa4-C, Asa7, Asa7-N and Asa7-C proteins were purified in denaturing conditions using affinity chromatography. The samples were diluted with PBS to obtain a final concentration of 4.0 M urea and then, a 1 M imidazole solution in the same buffer was added to reach a final concentration of 10 mM in the sample. Then, the sample was loaded on a 5 mL HisTrap FF crude column (GE Healthcare Life Sciences), equilibrated with PBS containing 4 M urea. The column was washed with the same buffer in the presence of 30 mM imidazole and then, the proteins of interest were eluted with a 30 to 500 mM imidazole gradient. The fractions obtained from the column were analyzed by Tricine-SDS-PAGE, and those enriched with the recombinant protein of interest were collected, mixed, concentrated, and stored at –70 °C until used.

2.9. Antibody production and immunoblotting

Antibodies were generated against subunit Asa4, against the recombinant proteins Asa2 and Asa7-C. Either the entire *Polytomella* ATP synthase (20 to 50 µg of protein per lane) or 20 µg of the recombinant, isolated proteins was resolved by Tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) in the presence of 25 mg/L of Serva Blue G in the upper buffer as described [23]. The ATP synthase Asa4 subunit and the recombinant proteins Asa2 and Asa7-C were excised from the gel, grinded in the presence of 20 mM Tris (pH 7.0), mixed with Freund's complete adjuvant and injected into rabbits for antibody production. Western blot analysis was carried out as described [24] with modifications [25].

Colorimetric detection was carried out using a goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:3000 for 2 h) in the presence of nitro-blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt. The images of the polypeptide bands decorated with the insoluble black-purple precipitates were captured in a HP Scanjet G4050.

2.10. Protein–protein interactions assayed by Far-Western analysis

Far-Western analysis was carried out according to [26]. The isolated ATP synthase of *Polytomella* sp. was subjected to Tricine-SDS-PAGE in 12% acrylamide gels and then transferred to nitrocellulose membranes. The lanes containing the denatured enzyme were incubated in TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, and 0.05% Tween-20), in the presence of increasing concentrations of externally-added, purified Asa2, Asa4, Asa4-N or Asa4-C polypeptides for 4 h. In the case of the Asa7 polypeptide, which tended to aggregate easily, a different buffer was used: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM sodium EDTA, 2.0 % glycerol, 200 mM NaCl, and 0.5% sodium cholate. The membranes incubated with the externally-added protein were washed 2 times with the corresponding buffer. Then, the antibody against the recombinant protein was added, followed by the secondary antibody, and the membrane stained as described for Western blot analyses [25].

2.11. Protein–protein interactions assayed by affinity chromatography

These experiments were carried out using crude bacterial extracts containing the overexpressed, recombinant subunits Asa7, Asa7-N, Asa7-C and Asa2 (containing a 6His-tag), and the recombinant subunits Asa-4, Asa4-N and Asa4-C (lacking a 6His-tag). ICBs were prepared from 100 mL of bacterial culture, washed and solubilized with 6 M guanidine in PBS buffer (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.8). The insoluble material was removed by centrifugation at 17,500 g for 10 min. Each resulting crude extract supernatant containing the corresponding 6His-tagged subunit was loaded onto a 1 mL HisTrap column equilibrated with PBS buffer. Then the column was washed with PBS containing 30 mM imidazole, 0.01% Tween-20 and 3 M guanidine, followed by a second wash with the same buffer in the presence of 1 M guanidine and a third and final wash with the same buffer containing 0.5 M guanidine. Also, 0.01% of Tween-20 was added to the supernatants containing the recombinant proteins lacking a 6His-tag, followed by dialysis against PBS buffer. Each dialyzed crude extract sample was loaded onto the HisTrap column where one of the proteins with 6His-tag was previously bound. The columns were washed with PBS buffer containing 0.01% Tween-20 and 30 mM imidazole. Then, an imidazole gradient from 30 to 500 mM was applied in order to elute the proteins that remained bound to the column. Whenever the 6His-tagged protein coeluted with the non 6His-tagged protein, both proteins were considered to have interacted inside the column. The absorbance at 280 nm of the eluted fractions was monitored and selected fractions were subjected to Tricine-SDS-PAGE (12% acrylamide) and then transferred to a nitrocellulose membrane. Proteins were analyzed by Western blot using specific antibodies.

In order to assess any possible unspecific binding the recombinant subunit of interest, lacking a 6His-tag, was loaded onto a 1 mL HisTrap column with no bound protein.

2.12. Protein–protein interactions assayed by Blue Native Electrophoresis

One nanomole of each subunit was mixed in a denaturing solution containing 50 mM Bis-Tris pH 7.0, 4 mM DTT, 750 mM ϵ -amino caproic acid, 0.15% SDS and 0.1% Coomassie Brilliant Blue G. The mixture was incubated at 94 °C during 10 min and subjected to BN-PAGE in 12% acrylamide gels [20] at 4 °C. Proteins were expected to renature in the BN-gel and establish specific interactions. Gels were run at 80 V for 1.5 h and then at 200 V, until the desired separation of polypeptides was achieved. For interaction assays in the presence of Asa7, gels

containing 14% acrylamide were used. Selected lanes of the BN-gels were then subjected to 2D-Tricine-SDS-PAGE.

2.13. Protein stability at different pHs

Samples containing two nanomoles of the proteins of interest or the mixture of two proteins, were dialyzed at 4 °C against 500 mM NaCl and 20 mM of each one of the following buffers: phosphates (pH 2.0), acetate (pH 4.0), Mes (pH 6.0), MOPS (pH 7.0), Tris (pH 8.0) or CAPS (pH 10.0). Then, samples were centrifuged at 17,500 g and both the pellet and a fraction of the supernatant were analyzed by Tricine-SDS-PAGE.

2.14. Formation of an Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex

All steps were performed at 4 °C unless otherwise stated. The Asa4 subunit was purified as described in Section 2.8 except that 0.01% Tween 20 was added to the buffer. The enriched fractions identified by Tricine-SDS-PAGE were mixed and stored at –70 °C until used. The 6His-tagged Asa7 subunit was purified as mentioned in Section 2.8 except that three HisTrap FF columns (GE Healthcare Life Sciences) joined in tandem were used and 0.05% Tween 20 was added to the buffer. The enriched fractions were mixed and concentrated up to 0.4 mg/mL in an Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit (Millipore). For Asa2 subunit, the sample of solubilized ICBs obtained as described in Section 2.8 was diluted to 400 mL with a buffer containing 30 mM CAPS, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 2% glycerol pH 10.0 and then loaded onto a DEAE Sepharose FF 10/300 column (20 mL) equilibrated with the same buffer. The protein was eluted with a linear NaCl gradient from 0 to 500 mM in the same buffer (10 column volumes). The eluted fractions were analyzed in Tricine-SDS-PAGE and the enriched fractions were mixed and stored at –70 °C until used.

Purified Asa4 (untagged) and Asa7 (6His-tagged) subunits (10 mg of each protein) were mixed and dialyzed together against 3 L of a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 0.05% and Tween 20 pH 7.8 for 12 h. The sample was centrifuged at 17,500 g for 10 min, imidazole was added to a final concentration of 30 mM, and 750 μ L of Ni Sepharose 6 FF resin (Amersham Biosciences) was added to the mixture. The sample was incubated under continuous shaking for 8 h and then washed ten times by centrifugation at 500 g for 5 min with 7 mL of the same buffer containing imidazole 30 mM. The Asa4/Asa7 subcomplex was recovered with two 7 mL volumes containing 500 mM imidazole in the same buffer.

The purified Asa4/Asa7 subcomplex was mixed with 38 mg of purified Asa2 subunit (untagged) and dialyzed against 3 L of a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, 0.05% Tween 20 pH 7.8 and incubated under continuous shaking for 8 h. The sample was then centrifuged at 17,500 g for 10 min, loaded on a 1 mL HisTrap FF column (GE Healthcare Life Sciences) and recirculated for 8 h using a LKB-Peristaltic-Pump P-1 (Pharmacia) at a flow of 0.5 mL min^{−1}. Then, the column was attached to an ÄKTA monitor UPC-900 Workstation (GE Healthcare Life Sciences) washed with the same buffer containing 30 mM imidazole until a base line was obtained (30 column volumes) and the subcomplex was eluted when a linear imidazole gradient from 30 to 500 mM was applied. The eluted fractions were analyzed by Tricine-SDS-PAGE to identify those that corresponded to the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex.

2.15. Stoichiometry of subunits in the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex

Purified ATP synthase from *Polytomella* sp. and the isolated, recombinant ASA7 subunit (6His-tagged) were separated in a Tricine-SDS-PAGE at increasing known protein concentrations. The resulting gels were stained with Coomassie Blue. Gel images were captured in a Gel-ChemiDoc Scanner System (Bio-Rad) and the densitometric analysis was performed with the program GelAnalyzer 2010a (<http://www.GelAnalyzer.com>).

gelanalyzer.com/index.html). A graph of peak area of the polypeptide bands versus protein quantities (in picomoles) was constructed and adjusted to a linear function. Each fraction corresponding to the obtained Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex elution was also separated in a Tricine-SDS-PAGE and the densitometry data from each band was interpolated to the corresponding linear function obtained from the Asa2 and Asa4 subunits of the ATPase and from the recombinant, isolated 6His-tagged Asa7 protein. Thus, we estimated the stoichiometry of subunits Asa2:Asa4:Asa7 in the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex.

2.16. Protein structure prediction and protein–protein docking

Isoelectric points were calculated using “Compute PI/Mw” at EXPASY (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool). The model of subunits Asa2 (lacking the first 7 residues of the N-terminal region and the last 43 residues of the C-terminal region) and the full-length Asa4 were made in Robetta server (<http://robbetta.bakerlab.org>) of the University of Washington [27]. In both cases, a set of 5 possible models was obtained. The model of subunit Asa7 was made with the Quark program at the Zhang Lab server of the University of Michigan (<http://zhanglab.ccmb.umich.edu/Quark/>) [28]. A set of ten possible models were obtained. The model number 2 of every subunit was chosen because of its solvent exposed residues and because it exhibited an elongated structure, as expected of a component of the peripheral stalk. Hydrogen atoms and charges were added to the Asa2, Asa4 y Asa7 models and 1000 steps (steepest descent set at 0.02 Å per step) of energy minimization were carried out using the ff99SB forcefield of UCSF Chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [29]. Protein–protein docking prediction was carried out in the Vakser Lab server of the University of Kansas (<http://Vakser.bioinformatics.Ku.edu/resources/gramm/grammx/>) [30]. The docking prediction between Asa4 and Asa7 subunits was carried out first. A set of 50 possible models were obtained. All the models that did not exhibit an interaction in accordance with the data obtained in this work were discarded. The model that predicted an interaction between the carboxy-terminal half of Asa4 and the carboxy-terminal half of Asa7 was selected. The in silico Asa4/Asa7 subcomplex was then used to dock the Asa2 subunit. A new set of 50 possible models were obtained, where the final model was chosen in accordance with the obtained experimental results. The interfaces of the subcomplex obtained were analyzed by Dimplot [31] and the surface calculations for cavities as implemented in PyMol (<http://www.pymol.org/>, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) in order to assess their packing quality.

3. Results

3.1. Over-expression and purification of recombinant Asa subunits

In order to address the study of the interaction of some of the subunits that constitute the peripheral stalk of the ATP synthase of *Polytomella* sp., the corresponding polypeptides were over-expressed and purified as described in Sections 2.6, 2.7 and 2.8, and compared to the polypeptide pattern of the isolated ATP synthase. The purified recombinant subunits Asa2, Asa4 and Asa7, and their corresponding fragments Asa4-N, Asa4-C, Asa7-N and Asa7-C were loaded on a Tricine-SDS-gel (Fig. 1). All recombinant subunits exhibit a single,

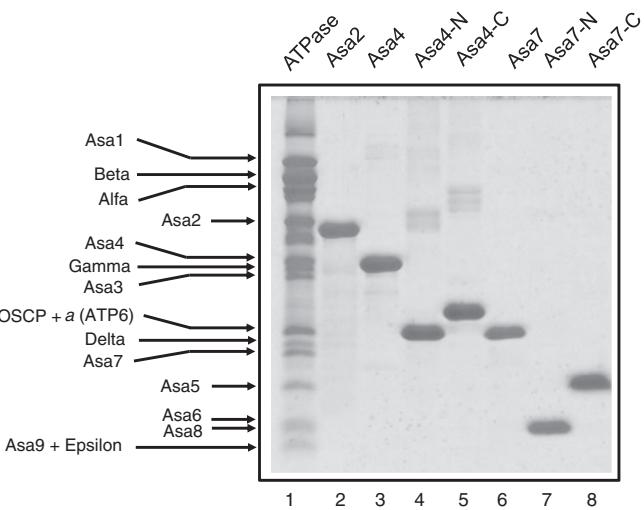


Fig. 1. *Polytomella* ATP synthase and the recombinant Asa subunits used in this work. Tricine-SDS polyacrylamide gel showing the polypeptide pattern of the *Polytomella* ATP synthase complex (25 µg of protein, lane 1). The identity of its 16 subunits is indicated. Three micrograms of each recombinant Asa subunits overexpressed and purified in this work was loaded in lanes 2 to 8. Some of the recombinant proteins, like Asa7, exhibit slightly higher apparent molecular masses than the original subunits due to the presence of the 6His-tag. In contrast, Asa2 exhibits a lower molecular mass, due to the absence of several residues in its N- and C-termini. Molecular masses are 38.6 kDa for Asa2 (lane 2), 31.2 kDa for Asa4 (lane 3), 16.4 kDa for Asa4-N (lane 4), 14.9 kDa for Asa4-C (lane 5), 20.5 kDa for Asa7 (lane 6), 7.6 kDa for Asa7-N (lane 7), and 11.9 kDa for Asa7-C (lane 8).

main polypeptide, although discrete bands that may represent dimeric forms were observed in some preparations (Fig. 1, lanes 4 and 5). Antibodies raised against subunits Asa2, Asa4 and Asa7 of the *Polytomella* ATP synthase also recognized the corresponding purified recombinant subunits, and the anti-Asa4 antibody recognized the Asa4-N and Asa4-C fragments, albeit the Asa4-N fragment more poorly (Suppl. Fig. 1). This suggests that the main immunogenic epitopes of Asa4 are found in its carboxy-terminal region.

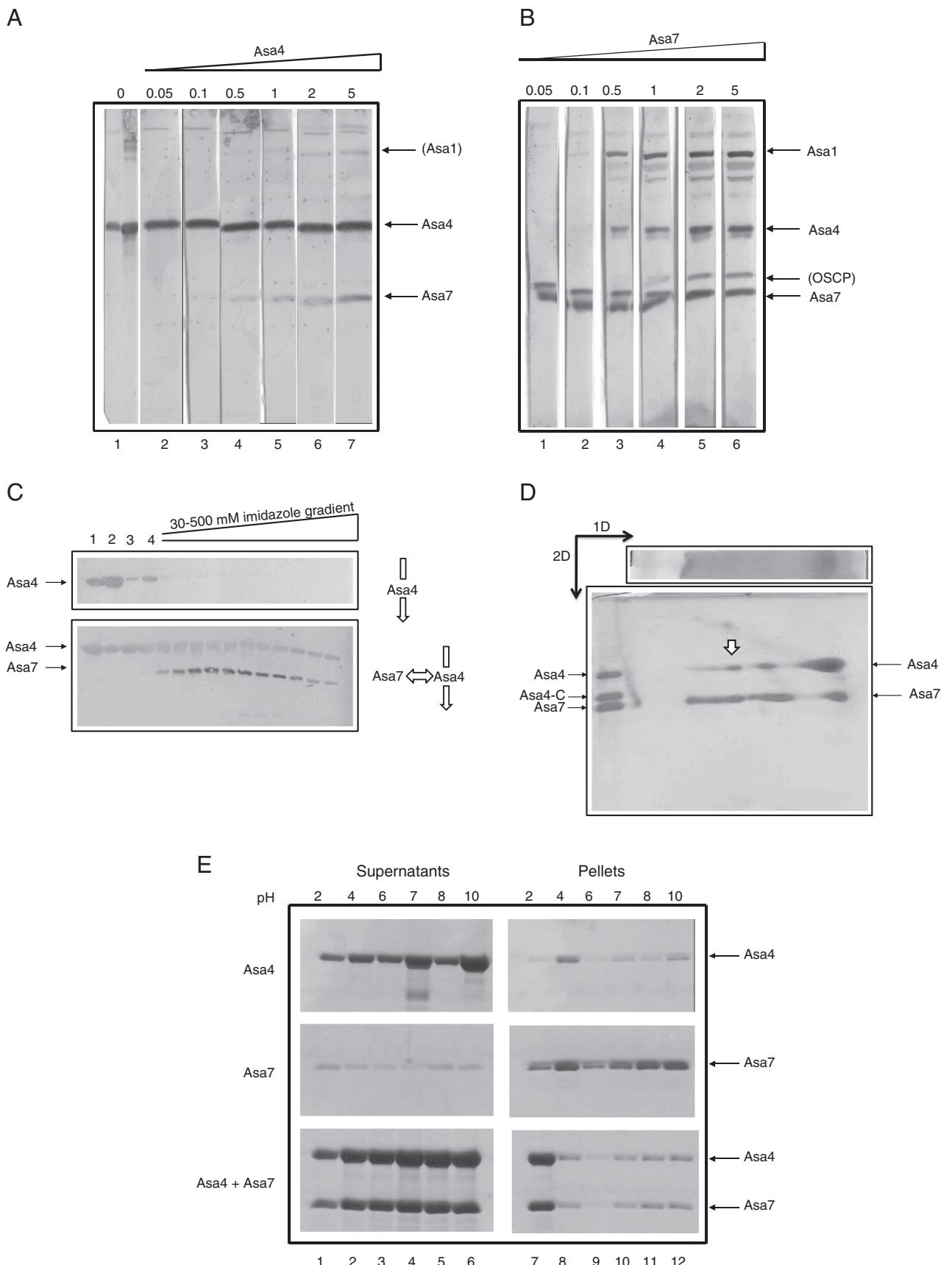
3.2. On the interaction of Asa4 and Asa7

Far-Western blotting is one of the techniques employed to detect protein–protein interactions. We first assayed a possible interaction between the purified, recombinant Asa4 subunit and the entire ATP synthase, exploring the possibility that the recombinant polypeptide could bind to some of the subunits of the complex. Several lanes of nitrocellulose membrane containing the same concentration of ATP synthase were incubated with increasing concentrations of the isolated, recombinant Asa4 subunit and then decorated with the anti-Asa4 antibody mentioned above (Fig. 2A). As expected, the anti-Asa4 antibody strongly recognized the original Asa4 polypeptide of the ATP synthase in all lanes. Nevertheless, at increasing concentrations of the externally added, recombinant Asa4, the antibody started to recognize a second band, which was identified as Asa7, based on its molecular mass (Fig. 2A, lanes 4 to 7). This indicated that the externally added, recombinant Asa4 subunit interacted with the Asa7 polypeptide bound to the nitrocellulose membrane, and was therefore also recognized by the

Fig. 2. Interaction of Asa4 with Asa7. A, B) Far-Western analyses of *Polytomella* ATP synthase (25 µg of protein per lane) incubated for 4 h with increasing nanomoles of the isolated, recombinant Asa4 (A) and Asa7 (B) polypeptides as indicated (in a 5 mL final volume), and then decorated with an anti-Asa4 (A) or an anti-Asa7 (B) antibody. C) Interaction of Asa4 and Asa7 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing expressed Asa4 subunit was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which the Asa7 subunit, containing a 6His-tag, was previously bound (lower panel). Western blot decorated with anti-Asa4 and anti-Asa7 antibodies of the fractions eluted from the column upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole. D) Identification of Asa4–Asa7 subcomplexes. One nanomole of each protein was incubated together in a final volume of 50 µL and loaded onto 1D-BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. A putative Asa4–Asa7 subcomplex is indicated with a white arrow. Three micrograms of each of the molecular mass markers, Asa4 (31.2 kDa), Asa4-C (14.9 kDa) and Asa7 (20.5 kDa) was loaded on the gel on its left-hand side. E) Stability of the isolated, recombinant Asa4 and Asa7 subunits at different pHs. Two nanomoles of Asa4 (upper panel), Asa7 (middle panel) and a mixture of Asa4 and Asa7 (lower panel) in 100 µL final volume were dialyzed against buffers with the indicated pHs and centrifuged. Then, 30 µL of each pellet and supernatant was loaded on the gel.

anti-Asa4 antibody. At relatively high concentrations of externally-added Asa4, the anti-Asa4 antibody also recognized Asa1 (Fig. 2A, lanes 6 and 7). We interpret this signal as a weak interaction of Asa4

with Asa1. In all the Far-Western experiments, the bands that appeared at high concentration of the recombinant, isolated protein were interpreted with caution, since unspecific interactions may occur.



We predicted that the complementary Far-Western experiment, now using the isolated, recombinant Asa7, should recognize the original Asa4 subunit of the ATP synthase complex. Lanes containing the same concentration of ATP synthase were incubated with increasing concentrations of the isolated, recombinant Asa7 subunit and decorated with an anti-Asa7 antibody (Fig. 2B). As expected, the anti-Asa7 antibody recognized the Asa7 subunit of ATP synthase in all lanes. At increasing concentrations of externally-added recombinant Asa7, the antibody also recognized additional bands, corresponding to Asa1, Asa4 and OSCP (Fig. 2B, lanes 3 to 6). This suggested that Asa7 may interact with these three subunits.

In order to further explore the interaction of Asa4 and Asa7 with a different experimental approach, the isolated, recombinant Asa7 containing a 6His-tag, was bound to a HisTrap nickel column. Then, the recombinant Asa4 (lacking a 6His-tag) was loaded on the column and washed with 30 mM imidazole. A second identical column, containing only the nickel matrix with no protein bound to it, was loaded with Asa4 (lacking the 6His-tag) and run in parallel. This second column served as a control to assay a possible adventitious interaction of Asa4 with the nickel matrix. While Asa4 readily eluted in the first fractions of the column lacking bound Asa7 (Fig. 2C, upper panel), Asa4 was retained in the column containing the 6His-tagged Asa7. In order to recover both proteins, the column was eluted in the presence of a 30 to 500 mM imidazole gradient, that released Asa7 along with its bound Asa4 (Fig. 2C, lower panel).

The interaction of Asa4 and Asa7 was also assayed using an additional approach. A mixture of isolated, denatured, recombinant Asa4 and Asa7 was subjected to BN-PAGE, expecting that during the non-denaturing electrophoretic technique both proteins would renature and interact, forming an Asa4/Asa7 subcomplex. To analyze these non-denaturing gels, the lanes obtained from BN-PAGE were subjected to 2D-Tricine-SDS-PAGE. Although a large amount of free Asa4 and Asa7 migrated to the front of the 1D-BN gel, discrete bands with a higher molecular mass were observed, suggesting the formation of an Asa4/Asa7 subcomplex (Fig. 2D, bands indicated with a white arrow).

The interaction of Asa4 and Asa7 was finally explored using a fourth different technique. The stability of the two isolated, recombinant Asa4 and Asa7 proteins was assayed by incubation at different pHs followed by centrifugation. If the protein was not soluble at a certain pH, it would precipitate and would be recovered in the corresponding pellet after centrifugation. Asa4 ($pI = 5.19$) was highly soluble, since it was recovered in the supernatants at almost all the pHs explored (from 2.0 to 10.0), while only small amounts precipitated at pH 4.0 and 10.0 (Fig. 2E, upper panels). In contrast, Asa7 ($pI = 9.03$) was less soluble, and tended to precipitate easily, so it was mainly recovered in the pellets (Fig. 2E, middle panels). A mixture of Asa4 and Asa7 recombinant proteins was also incubated at different pHs and then subjected to differential centrifugation. When Asa7 was in the presence of Asa4, both proteins remained in the soluble fraction, except at pH 2.0, where they both partially precipitated (Fig. 2E, lower panels). Thus, these experiments suggest that Asa4 tends to stabilize Asa7 and maintain it in solution, probably preventing its aggregation by protein–protein interactions.

3.3. On the interaction of Asa4 fragments and Asa7

In order to determine which domains of Asa4 and Asa7 are critical for interaction, lanes containing the same concentration of ATP synthase were transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with increasing concentrations of the recombinant Asa4-C fragment. Then, the membranes were decorated with the anti-Asa4 antibody (Fig. 3A). As in previous experiments, the anti-Asa4 antibody recognized the Asa4 subunit of ATP synthase in all lanes. Nevertheless, at increasing concentrations of externally-added Asa4-C fragment, the antibody recognized additional bands, corresponding to Asa1 and Asa7, and more faintly, OSCP (Fig. 3A, lanes 3 to 5). This indicated that the externally

added recombinant Asa4-C fragment may interact with these subunits. In contrast, when the same experiment was carried out with the Asa4-N fragment, the anti-Asa4 gave a much weaker signal on subunits Asa1, OSCP and Asa7 (Suppl. Fig. 2). We conclude that Asa4-N interacts loosely with these subunits, although the low signals observed may also be due to the poor recognition of the Asa4-N fragment by the anti-Asa4 antibody (Suppl. Fig. 1, lane 3).

In order to further assess the interaction of Asa4-N and Asa4-C with Asa7, the isolated, recombinant Asa7 containing a 6His-tag, was bound to a nickel column. Then, the recombinant Asa4-N (lacking the 6His-tag) was loaded into the column and washed with 30 mM imidazole. As expected, Asa4-N did not bind to the nickel control column lacking Asa7 (Suppl. Fig. 3, upper panel). Asa4-N also did not bind to the column to which Asa7 was attached (Suppl. Fig. 3, lower panel). This suggests a poor interaction of the Asa4-N fragment with Asa7. In contrast, when Asa4-C was loaded into a column containing Asa7, it was readily retained. Subsequently, in the presence of a 30–500 mM imidazole gradient, Asa4-C and Asa7 co-eluted (Fig. 3B). Since Asa4-C and Asa7 have a similar molecular mass, and therefore migrate together in Tricine-SDS-PAGE, separate Western blot analyses of the column fractions were carried out in order to follow the fate of each protein. Fractions from the column containing Asa4-C were decorated with an anti-Asa4 antibody (Fig. 3B, middle panel), while another aliquot of the same fractions was used to decorate Asa7 elution pattern with an anti-Asa7 antibody (Fig. 3B, lower panel). Some of the Asa7 subunit was partially degraded in the column (the degradation products are indicated by an asterisk in Fig. 3B). The obtained results led us to conclude that Asa4-C interacts with Asa7.

In order to assay the possible formation of a subcomplex between Asa4-C and Asa7, a mixture of the isolated, recombinant Asa4-C and Asa7 proteins was subjected to BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. Besides the free Asa4-C and Asa7 subunits that migrated to the front of the 1D-BN gel, higher molecular mass bands indicating the presence of an Asa4-C/Asa7 subcomplex were observed (Fig. 3C, lower panel). In contrast, only a small amount of an Asa4-N/Asa7 subcomplex was present when the mixture of Asa4-N and Asa7 was subjected to BN-PAGE and 2D-Tricine-SDS-PAGE, suggesting a more loose interaction of these proteins (Fig. 3C, upper panel).

3.4. On the interaction of Asa7 fragments and Asa4

Two protein fragments of Asa7 were also overexpressed, Asa7-N and Asa7-C (the N-terminal and C-terminal halves of Asa7 respectively). To explore the interaction of Asa7 fragments with Asa4, the isolated, recombinant Asa7 fragments, containing a 6His-tag, were independently bound to nickel columns. Then, the recombinant Asa4 (lacking the 6His-tag) was loaded to the columns and washed with 30 mM imidazole. Asa4 did not bind to the nickel column containing Asa7-N (Suppl. Fig. 4) but it was retained in the column to which Asa7-C was attached (Fig. 4A). Furthermore, the interactions of Asa7 fragments with Asa4 fragments were also explored. Both recombinant Asa7-N and Asa7-C were independently bound to nickel columns. The recombinant Asa4-N fragment (lacking the 6His-tag) was loaded to the column containing Asa7-N and washed with 30 mM imidazole. All the Asa4-N eluted from the column, suggesting a poor interaction of Asa4-N with Asa7-N (Suppl. Fig. 5). In contrast, when Asa4-C was loaded to the column that contained bound Asa7-C, the fragment was retained in the column, and when a 30 to 500 mM imidazole gradient was applied, both proteins were recovered (Fig. 4B).

A mixture of isolated, recombinant Asa4 and the Asa7-N and Asa7-C fragments was also subjected to BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. The resulting electrophoretic pattern of Asa4 and Asa7-N yielded no subcomplex that would suggest an interaction between these polypeptides (Fig. 4C, upper panel). In contrast, the formation of an Asa4/Asa7-C subcomplex was observed in the corresponding 2D-Tricine-SDS-PAGE polypeptide pattern (Fig. 4C, lower panel, white arrow).

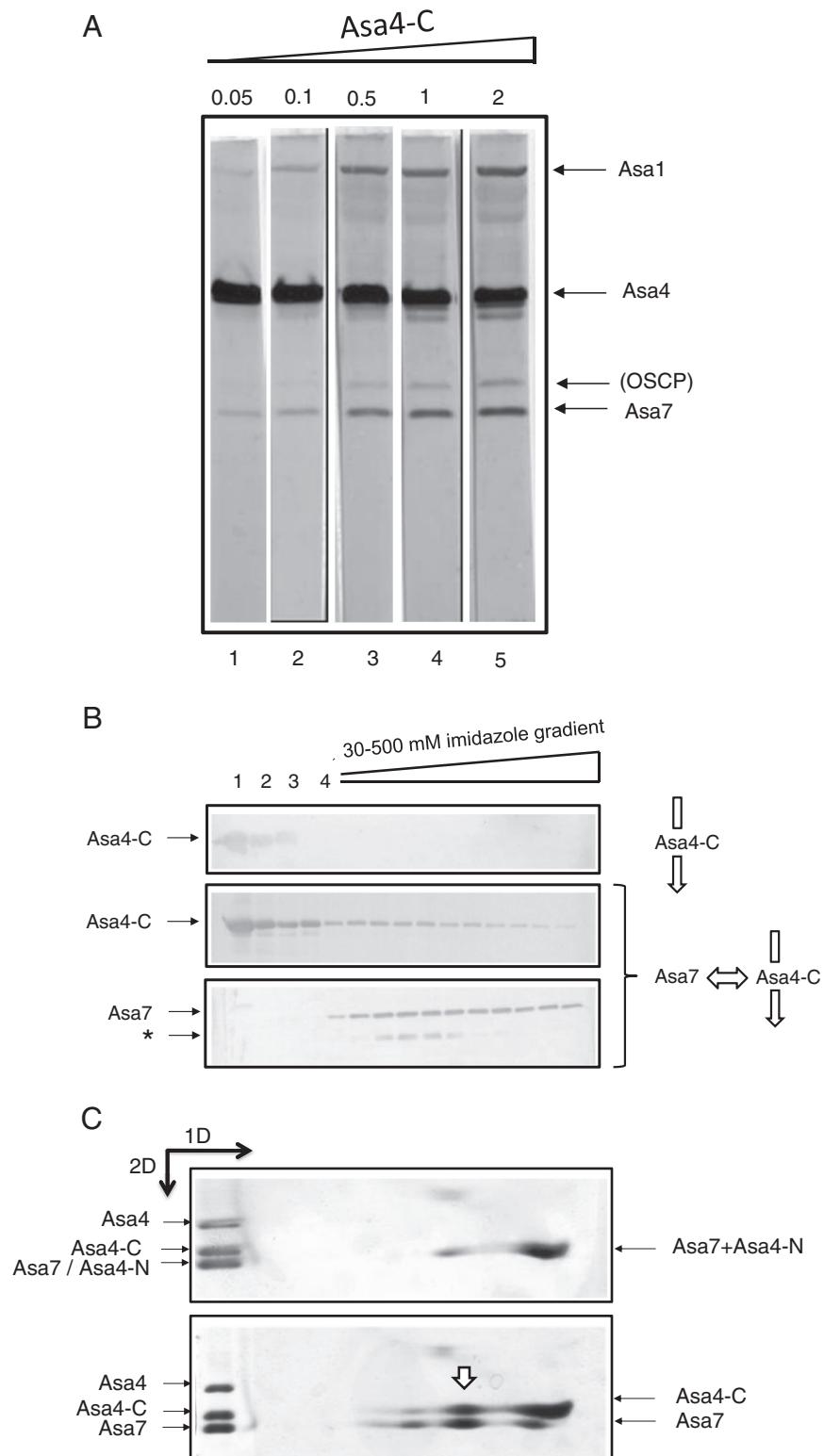


Fig. 3. Interaction of Asa4 fragments with Asa7. A) Far-Western analysis of *Polytomella* ATP synthase (25 µg of protein per lane) incubated for 4 h with increasing nanomoles of the isolated, recombinant Asa4-C fragment as indicated (in a 5 mL final volume), and then decorated with an anti-Asa4 antibody. B) Interaction of the Asa4-C fragment and Asa7 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the expressed Asa4-C fragment was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound proteins (upper panel) or to which the Asa7 subunit, containing a 6His-tag, was previously bound (middle and lower panels). Western blot decorated with anti-Asa7 (lower panel) or anti-Asa4 (upper and middle panels) of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole. C) Identification of subcomplexes Asa4-N/Asa7 and Asa4-C/Asa7. One nanomole of each polypeptide was incubated together in a final volume of 50 µL and loaded onto 1D-BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. Upper panel: a small amount of Asa7–Asa4-N subcomplex was formed in these conditions. Lower panel: a putative Asa4-C/Asa7 subcomplex is indicated with a white arrow. Three micrograms of each of the molecular mass markers, Asa4 (31.2 kDa), Asa4-C (14.9 kDa) and Asa7 (20.5 kDa) was loaded on the left-hand side of the gels.

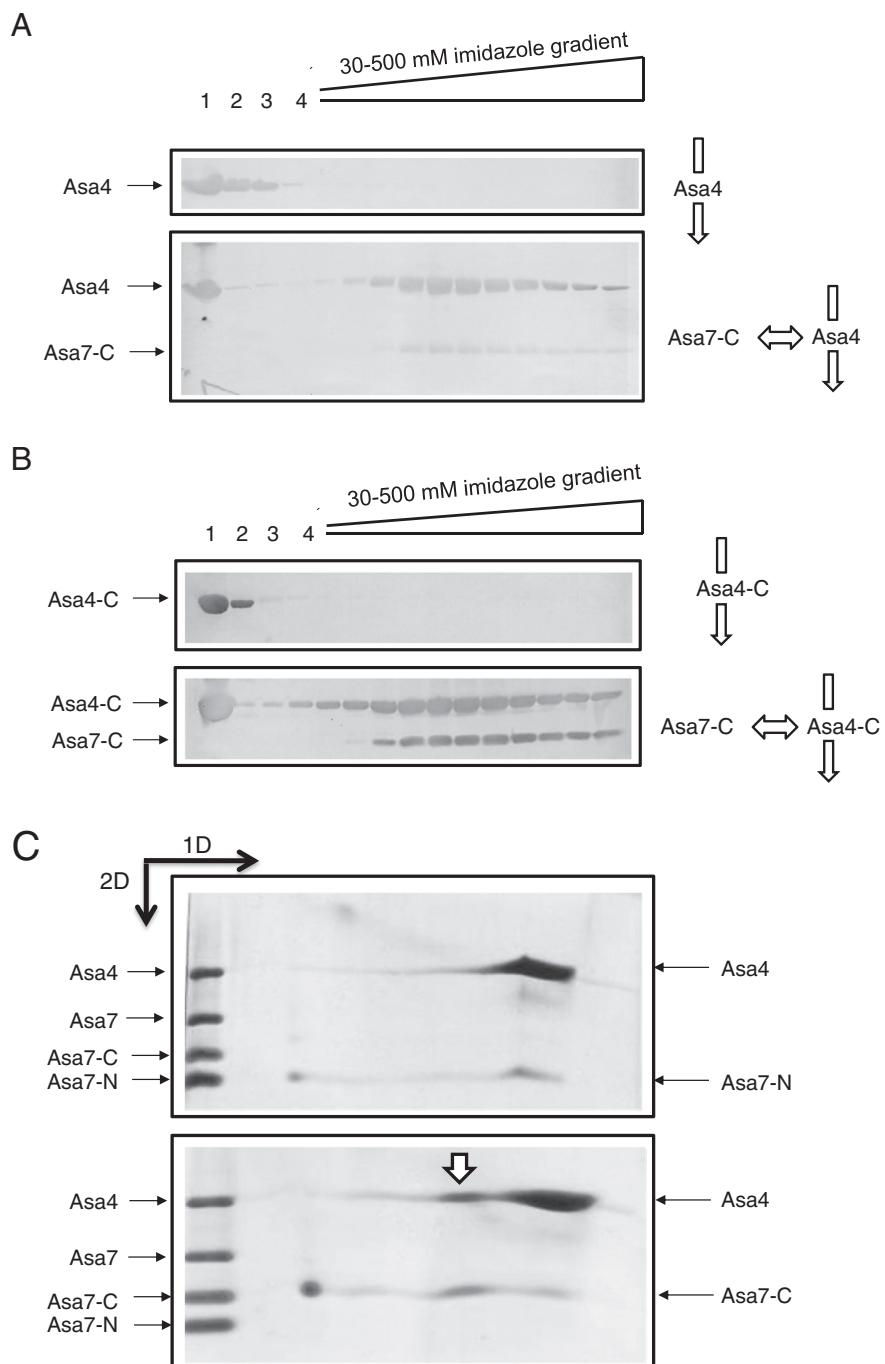


Fig. 4. Interaction of Asa4 with Asa7 fragments. A, B) Interaction of Asa4 and the Asa7 fragments assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4 subunit (A) or Asa4-C fragment (B) was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which the Asa7-C fragment, containing a 6His-tag, was previously bound (lower panel). Western blot decorated with both an anti-Asa4 and an anti-Asa7 antibody of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole. C) Identification of an Asa4/Asa7-C subcomplex (lower panel). One nanomole of each polypeptide was incubated together in a final volume of 50 μ L and loaded onto 1D-BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. A putative Asa4/Asa7-C subcomplex is indicated with a white arrow. Three micrograms of each of the molecular mass markers, Asa4 (31.2 kDa), Asa7 (20.5 kDa), Asa7-C (11.9 kDa) and Asa7-N (7.6 kDa) was loaded on the gel on its left-hand side. Same experiment conducted with Asa4 and the Asa7-N fragment (upper panel).

Altogether, the data strongly suggest that Asa7 and ASA4 interact through their C-terminal halves.

3.5. On the interaction of Asa2 and Asa4

We also explored the interaction of Asa2 with Asa4 by Far-Western blot analysis. For this purpose, several lanes containing equivalent amounts of ATP synthase were incubated in the presence of increasing concentrations of the recombinant Asa2 polypeptide and decorated

with an anti-Asa2 antibody (Fig. 5A). As expected, the anti-Asa2 recognized the natural Asa2 polypeptide in all lanes, but at increasing concentrations of Asa2 the antibody recognized additional bands, mainly Asa1 and Asa4, and more faintly, OSCP and Asa7 (Fig. 5A). This result suggests the interaction of Asa2 with all the four above-mentioned subunits. It is important to note, however, that while externally-added Asa2 seems to recognize subunits Asa4 and Asa7 embedded in the nitrocellulose membrane, neither the externally-added Asa4 nor Asa7 recognized the Asa2 subunit blotted on the membrane (Fig. 2A and 2B).

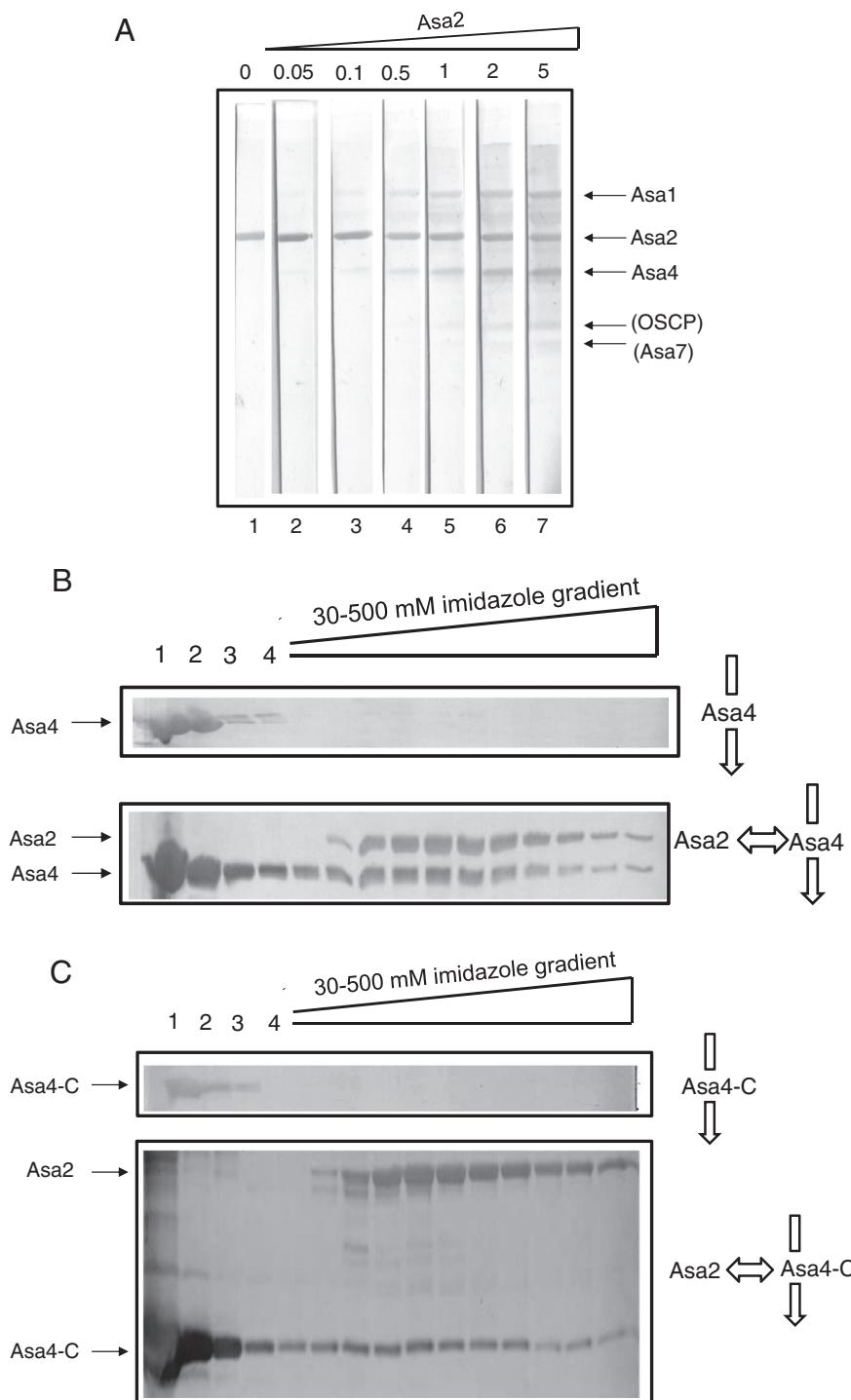


Fig. 5. Interaction of Asa2 with Asa4 and its Asa4-C fragment. A) Far-Western analysis of *Polytomella* ATP synthase (25 µg of protein per lane) incubated for 4 h with increasing nanomoles of the isolated, recombinant Asa2 protein as indicated (in a 5 mL final volume), and then decorated with an anti-Asa2 antibody. B, C) Interaction of Asa4 with Asa2 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4 subunit (B) or the Asa4-C fragment (C) was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound proteins (upper panels) or to which Asa2, containing a 6His-tag, was previously bound (lower panels). Western blot decorated with both anti-Asa2 and anti-Asa4 antibodies of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.

In order to assess the interaction of Asa2 with Asa4 using an alternative method, the isolated, recombinant Asa2 containing a 6His-tag, was bound to a nickel column. Then, the recombinant Asa4 subunit (lacking the 6His-tag) was loaded to the column and washed with 30 mM imidazole. Asa4 was readily retained by the Asa2 containing column, and both proteins co-eluted in the presence of a 30 to 500 mM imidazole

gradient (Fig. 5B). In contrast, the Asa4-N fragment was not retained by the column containing Asa2 (Suppl. Fig. 6). When the Asa4-C fragment was loaded onto the column containing Asa2, it was also readily retained (Fig. 5C), and both proteins co-eluted in the presence of the imidazole gradient. Altogether, the data suggest that Asa2 interacts with Asa4 mainly through the C-terminal half of Asa4.

3.6. On the interaction of Asa2 and Asa7

To explore the interaction of Asa2 and Asa7, the isolated, recombinant Asa7 containing a 6His-tag, was bound to a nickel column. Then, the recombinant Asa2 (lacking the 6His-tag) was loaded on the column and washed. Asa2 was readily retained by the Asa7 containing column, and both proteins co-eluted in the presence of the imidazole gradient (Fig. 6). In this experiment, some degradation products were also observed (see asterisks).

In order to assess which portion of the Asa7 subunit interacts with Asa2, Asa7-N containing a 6His-tag was now bound to a HisTrap nickel column and subsequently Asa2 (lacking the 6His-tag) was loaded. Asa2 was retained in the column to which Asa7-N was attached (Suppl. Fig. 7A). Both Asa2 and Asa7-N polypeptides were recovered upon elution with a 30–500 mM imidazole gradient, nevertheless Asa2 seems to elute before Asa7-N. Elution of a 6His-tagged protein at different concentrations of imidazole suggests the presence of distinct monomeric and oligomeric forms, with multiple 6His-tags on an oligomer. Thus, the Asa7-N fragment could have strongly self-dimerized and so eluted only at higher imidazole concentrations. A similar effect was observed when Asa2 was loaded onto a column with the Asa7-C fragment bound to the nickel matrix. Asa2 was retained in the column to which Asa7-C was attached (Suppl. Fig. 7B), and both proteins were recovered when the imidazole gradient was applied to the column. The data suggest that both halves of the Asa7 subunit (Asa7-N and Asa7-C) seem to be important in the interaction of Asa2 and Asa7.

3.7. Subunits Asa2, Asa4 and Asa7 associate to form a stable subcomplex

In order to corroborate the interactions described above, we reconstituted a subcomplex containing the three recombinant subunits. The isolated recombinant Asa4 (untagged) and Asa7 (6His-tagged) subunits were dialyzed together and co-purified in batch by affinity chromatography. The presence of the Asa4 subunit allows the proper refolding and interaction with the subunit Asa7 as described above (Fig. 2E, Lower panel). The purified Asa4/Asa7 subcomplex was incubated with the isolated Asa2 subunit (untagged). The reconstituted Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex was purified by affinity chromatography in column and the three subunits co-eluted with a linear imidazole gradient. The obtained fractions were subjected to Tricine-SDS-PAGE, and the Coomassie Blue-stained showed the presence of excess free Asa4 subunit in the wash fractions of the column and the presence of the three subunits in a stable complex (Fig. 7). The Coomassie Blue-stained bands were analyzed by densitometry and compared to those of the complete *Polytomella* sp. ATP synthase (Asa2 and Asa4) and isolated ASA7 subunit. We conclude that the isolated, recombinant Asa2,

Asa4 and Asa7 subunits may interact to form a stable subcomplex with a 1:1:1 stoichiometry. This is in accordance with an earlier proposal that all Asa subunits may have a 1:1 stoichiometry relative to the gamma subunit [7].

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

Partial dissociation of the ATP synthase by different methods generates subcomplexes which are assumed to keep the original subunit-subunit interactions that exist in the intact enzyme [7]. Here, the *Polytomella* sp. ATP synthase was dissociated in ice in the presence of 0.04% LiDS and subjected to BN-PAGE followed by Tricine-SDS-PAGE. A 100 kDa subcomplex formed by ASA2 and subunit alfa was observed (Fig. 8), suggesting the close proximity of ASA2 to the F₁ catalytic sector of the enzyme.

3.9. Model for the interaction between subunits Asa2, Asa4 and Asa7

We integrated the results obtained in this work in the model shown in Fig. 9. The models of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 were generated independently and then protein–protein docking predictions were carried out. The model that predicted an interaction between the carboxy-terminal half of Asa4 and the carboxy-terminal half of Asa7 was selected. Then, the model of the Asa2 subunit was docked on this subcomplex. The resulting model is shown in Fig. 9A. This model was then fitted on the 3D-model of the dimeric *Polytomella* ATP synthase generated by EM analysis (Fig. 9B) [7].

4. Discussion

The Asa subunits, which have been identified to date only in mitochondrial ATP synthases of chlorophycean algae, seem to be unique to this lineage [13]. As judged by single particle electron microscopy studies, the Asa subunits form a robust, peripheral stalk in the ATP synthase of *Polytomella* sp. that allows the enzymatic complex to function as a rotary motor [6]. Nevertheless, a more detailed picture of how these subunits interact was lacking. Here, we addressed the study of protein–protein interactions using the isolated, recombinant proteins of Asa2, Asa4 and Asa7 as well as some recombinant protein fragments, including the N-terminal and C-terminal halves of Asa4 (Asa4-N and Asa4-C respectively), as well as the corresponding fragments of Asa7 (Asa7-N and Asa7-C). The data obtained suggests that Asa2, Asa4 and Asa7 interact, and that there is a special strong interaction of Asa4 with Asa7, probably mediated by the C-terminal halves of both proteins. In addition, the data indicates that subunits Asa2, Asa4 and Asa7 may also

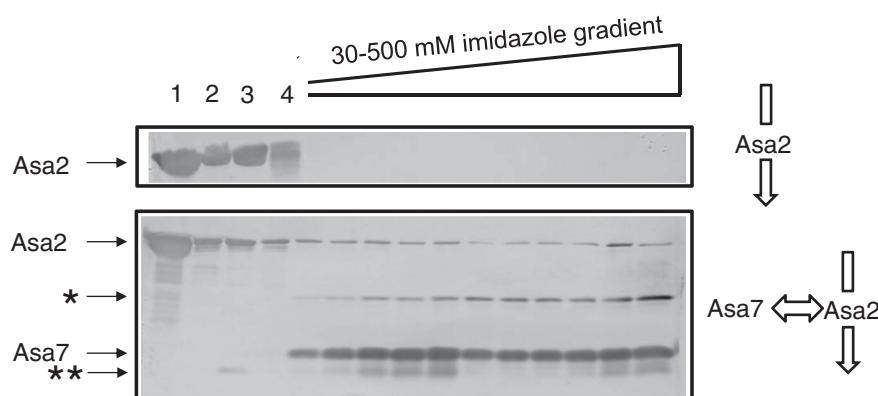


Fig. 6. The interaction of Asa2 with Asa7. A) Interaction of Asa2 and Asa7 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa2 subunit was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which Asa7, containing a 6His-tag, was bound (lower panel). Western blot decorated with an anti-Asa2 and an anti-Asa7 antibody of the column fractions collected upon application of a 30–500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.

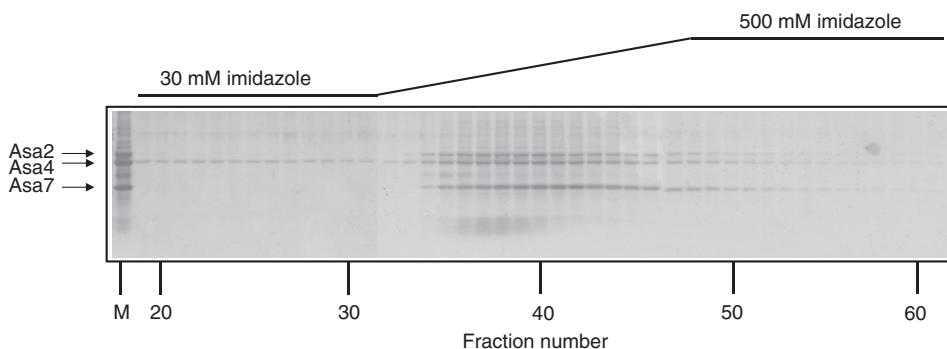


Fig. 7. Formation of an Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. The recombinant, isolated Asa2 (untagged), Asa4 (untagged) and Asa7 (6His-tagged) proteins form a stable subcomplex that can be recovered after affinity chromatography. The generated Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex elutes when a linear imidazole gradient (30 to 500 mM) is applied. Lane M shows a mixture of the three recombinant proteins. Lanes 19 to 61 show the polypeptide composition of the 1 mL fractions collected from the column after washing with 30 mM imidazole (lanes 19 to 31); after applying the linear imidazole gradient (lanes 32–47); and after washing with 500 mM imidazole (lanes 31 to 61).

interact with Asa1 and with OSCP, suggesting their participation as structural components of the peripheral stalk. Also, we show that Asa2 may interact with an α subunit, and thus must be in close proximity to the F₁ sector. In addition, a mixture of Asa2, Asa4 and Asa7 seems to form a subcomplex in a 1:1:1 stoichiometry.

All the Asa subunits studied here were isolated in a denatured form and then solubilized and renatured. These renatured polypeptides clearly exhibited specific interactions, indicating that they did refold – either partially or fully – into their native conformations. In addition, circular dichroism spectral analysis of Asa2, Asa4, Asa4-N and Asa4-C indicated the presence of secondary structure in these polypeptides (data not shown).

RNA-mediated expression silencing of the Asa7 subunit in the green alga *C. reinhardtii*, a close relative of *Polytomella* sp., showed that the absence of this polypeptide neither affected growth nor the oxidative phosphorylation properties of the alga [13]. Nevertheless, the intact, dimeric ATP synthase could not be purified from the Asa7-silenced mutant, because the complex invariably dissociated, releasing the F₁ sector. Therefore, Asa7 seems to be instrumental in stabilizing the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae. As suggested by the results obtained in this work, Asa7 interacts both with Asa2 and Asa4, and thus could be important in maintaining these subunits together, and thus helping stabilize the architecture of the peripheral stalk [7,10,11]. When heat dissociation of the intact ATP synthase of *Polytomella* sp. was followed in a time course, it was observed that several subunits, including Asa2, Asa4 and Asa7, readily

dissociate from the complex [10]. Thus, these subunits seem to be in close contact in a region of the peripheral stalk that is highly susceptible to dissociation. We hypothesize that these three subunits are important architectural elements of the robust peripheral stalks of the algal enzyme as observed in EM. Subunit Asa1, although not addressed in this study, may be an important additional constituent of this stalk.

The model of the subcomplex Asa2/Asa4/Asa7 was fitted on the 3D model of the *Polytomella* mitochondrial ATP synthase complex obtained by a previous EM reconstruction [7]. Three considerations were taken into account to fit the subcomplex in this region of the peripheral stalk: i) the hydrophilic character of the Asa2, Asa4 and Asa7 subunits, which must be placed in a region relatively far away from the membrane region; ii) the proposed proximity of Asa2 to OSCP [7]; and iii) the proximity of Asa2 to subunit α . The model partially explains the important electron density of the peripheral stalks observed in the algal enzyme by EM. Nevertheless, these kinds of models have inherent limitations due to the multiple assumptions made at various steps of its *in silico* development: the 3D-modeling of polypeptides with all its variants, the modeling of their possible interactions by protein–protein docking, and the fitting of the generated subcomplex into the 3D structure derived from EM studies. It is therefore feasible that the Asa subunits may interact more closely with each other through helix–helix contacts, as the other constituents of the peripheral stalks of several eukaryotic [32–34], bacterial [35–37], and archaeal enzymes [38]. Prediction of coiled-coil segments [39] of the Asa subunits indicates a high propensity

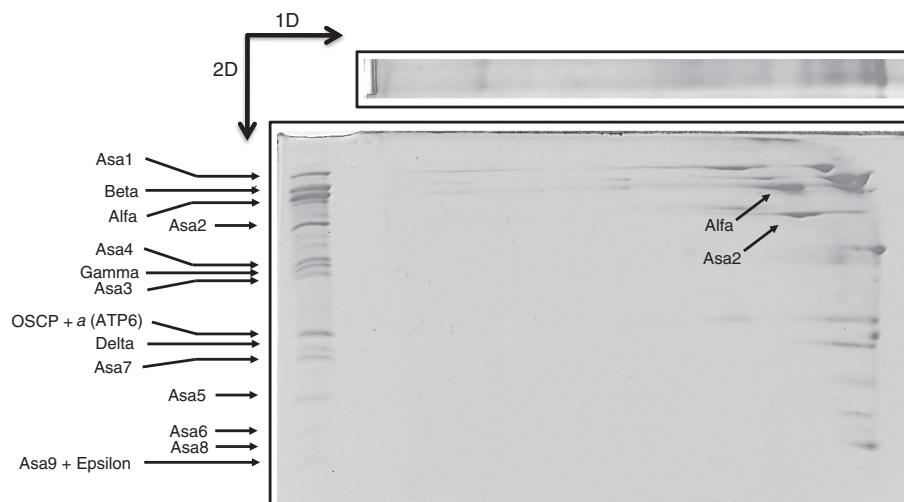


Fig. 8. An Asa2-alfa subunit subcomplex of the algal ATP synthase is generated by LiDS treatment. The purified algal ATP synthase (120 μ g of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of 0.04% LiDS and then resolved by BN-PAGE in a 1D gradient gel of 4–12% acrylamide. The 1D gel was then subjected to 2D Tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained with Coomassie Brilliant Blue. Fifty micrograms of purified algal ATP synthase was added as a control (lane C). The name of each subunit of the complex is indicated.

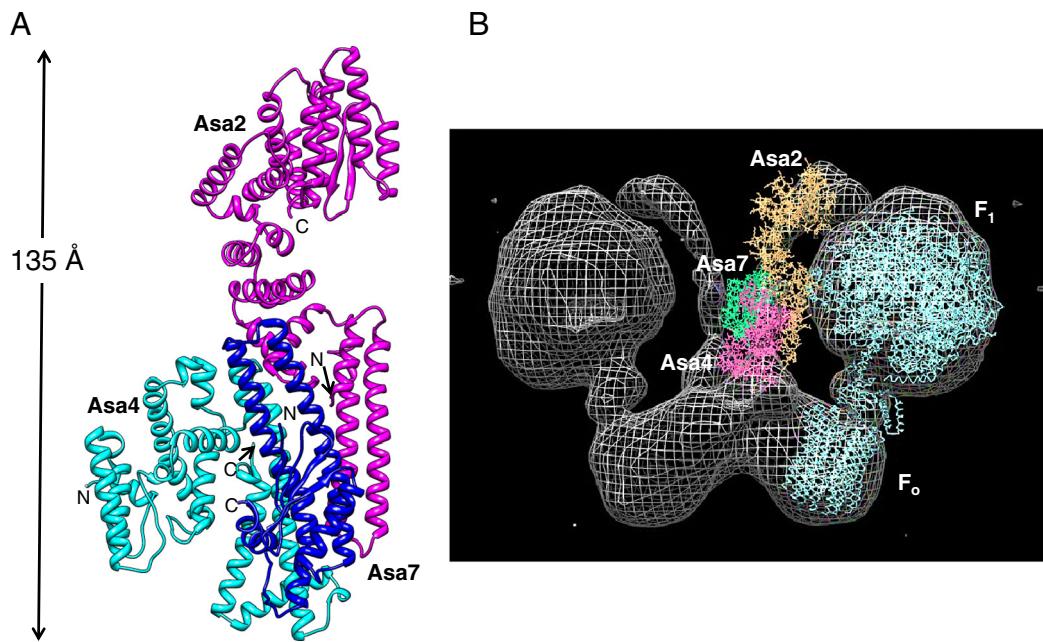


Fig. 9. Model of the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. A) Model of the in silico generated Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. Subunit Asa2 is colored in magenta, Asa4 in cyan, and Asa7 in blue. The N- and C-termini are indicated with letters N and C, respectively. B) The Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex was fitted in the previously generated 3D structure derived from EM studies. Subunits Asa2 (orange), Asa7 (green), Asa4 (pink) and the F₁ and Fo sectors (cyan) are indicated.

of some of these proteins to form this structural motif (30% of coiled-coil regions predicted for Asa1, 19% for Asa2, 35% for Asa4, and 32% for Asa7). Thus, these Asa subunits may intertwine in several regions to give rise to the stout peripheral arms that have been observed in *Polytomella* ATP synthase examined both by single-particle analysis [5–7] and dual-axis cryo-electron tomography [8].

The main function of the peripheral stalk is to hold the F₁ sector against the movement of the rotor stalk [40]. In the last years, it has become increasingly clear that this function may be achieved with peripheral stalks exhibiting different structures. For example, the peripheral stalk of bacteria is composed of two identical b subunits that extend as coiled-coil α helices from the bilayer to the delta subunit in the F₁ sector [41]. In contrast, the A-type ATP synthases of Archaea are structurally more closely related to vacuolar ATPases and exhibit two peripheral stalks composed by subunits E, H, and a. The two lateral stalks connect through a collar that surrounds the central stalk at a level above the A₀ sector and run upwards up to prominent knobs on the A₁ sector [42]. In eukaryotes like yeast, the peripheral stalk is composed of subunits b, d and h (also known as F6 in the bovine enzyme). The primary structure of the eukaryotic subunit b differs from the bacterial one, although it also extends as an alpha-helix, from the membrane region up to OSCP in the F₁ sector [43]. In contrast, other eukaryotic ATP synthases exhibit a polypeptide composition very different from the ones present in classical systems as yeast or bovine, especially in the region of the peripheral stalk. Such is the case of the ATP synthase of *Tetrahymena thermophila*, that exhibits a dramatically different architecture as observed by single particle electron microscopy projections and that contains at least 13 novel subunits apparently limited to the ciliate lineage [44]. Remarkably, besides lacking subunit b, this enzyme also lacks a classical subunit a. Nevertheless, a particularly robust peripheral arm is not observed in the ciliate enzyme. The additional protein mass seems to be distributed towards the membrane-embedded region and exposed to the mitochondrial intermembrane space. Proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* has suggested that its ATP synthase is also highly divergent and exhibits 14 subunits which show no similarity to proteins outside the kinetoplastid lineage [45].

The presence of such robust peripheral stalks in the ATP synthase of chlorophycean algae raises questions about its flexibility. It has been

argued that the peripheral stalk may store transient elastic energy during the rotary motion of the enzyme, functioning as an elastic buffer [46,47]. We speculate that a stout peripheral stalk as the one of *Polytomella* ATP synthase will have more than the necessary stiffness to counteract rotation of the central stalk, but will make less twisting motions, and thus will store less transient elastic energy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.08.001>.

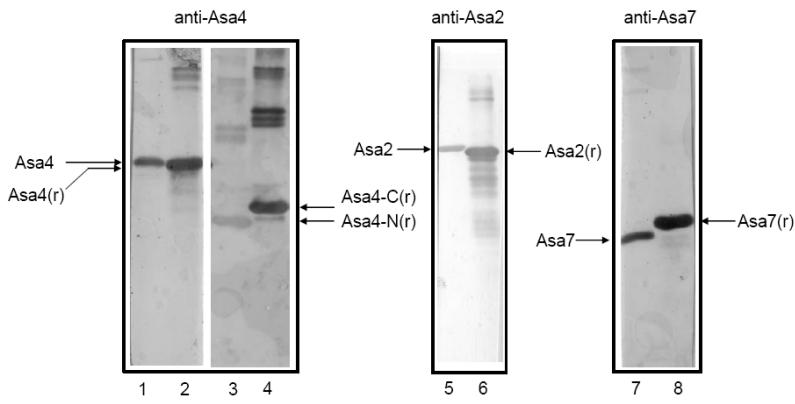
Acknowledgements

We thank Laura Ongay Larios, Minerva Mora Cabrera and Guadalupe Códiz Huerta of the Molecular Biology Unit, IFC, UNAM for primer synthesis and sequencing. This research was supported by the grant 146044 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) exchange program B330/123/11 (Mexico–Belgium). Additional support was received from grants 128110 (CONACyT, Mexico), IN203311-3 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico) and from the Belgian F.R.S.-FNRS (MIS F.4520, FRFC 2.4597). CONACyT also supported with fellowships 229474 and 214946 the Ph.D. studies of H.M.-A. (Biomedical Sciences Ph.D. program at UNAM) and A.C.-E. (Biochemical Sciences Ph.D. program at UNAM) respectively. L.D.-R. thanks the PEW Charitable Trust for his postdoctoral fellowship.

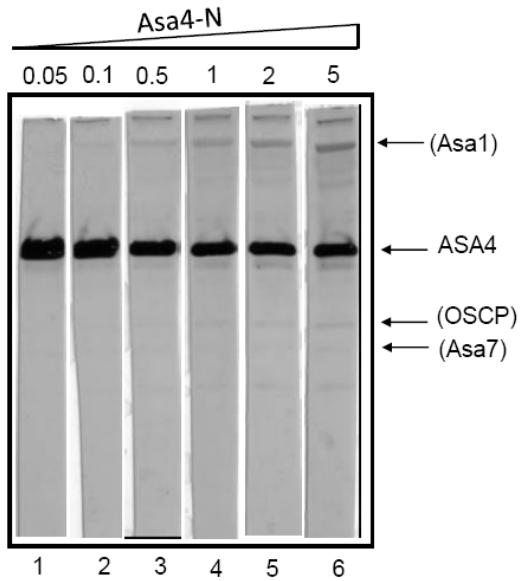
References

- [1] R.J. Devenish, M. Prescott, A.J. Rodgers, The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267 (2008) 1–58.
- [2] H. Seelert, N.A. Dencher, ATP synthase superassemblies in animals and plants: two or more are better, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 1185–1197.
- [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] 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.

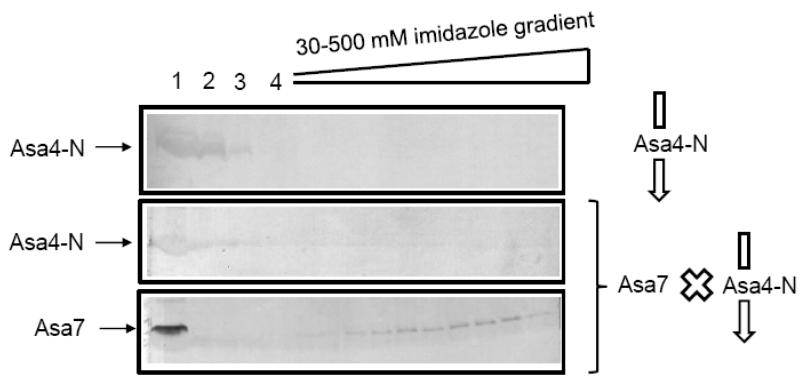
- [6] N.V. Dudkina, S. Sunderhaus, H.P. Braun, E.J. Boekema, Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, FEBS Lett. 580 (2006) 3427–3432.
- [7] A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, A. Villavicencio-Queijeiro, F. Figueroa-Martínez, H. Miranda-Astudillo, Y. Cordeiro, J.A. Mignaco, D. Foguel, P. Cardol, M. Lapaille, C. Remacle, S. Wilkens, D. González-Halphen, Subunit–subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp., Biochim. Biophys. Acta 1797 (2010) 1439–1448.
- [8] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohann, H.P. Braun, E.J. Boekema, Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography, Biochim. Biophys. Acta 1797 (2010) 272–277.
- [9] A. Atteia, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the FOF1-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, Biochim. Biophys. Acta 1320 (1997) 275–284.
- [10] 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) 271–282.
- [11] R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Atteia, New insights into the unique structure of the FOF1-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, Plant Physiol. 144 (2007) 1190–1199.
- [12] 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.
- [13] M. Lapaille, A. Escobar-Ramírez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodríguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. Gonzalez-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, 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. Evol. 27 (2010) 1630–1644.
- [14] 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 F1FO-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 6051–6058.
- [15] 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.
- [16] 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 c₁, J. Biol. Chem. 269 (1994) 9147–9154.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [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] R.R. Burgess, Refolding solubilized inclusion body proteins, Methods Enzymol. 463 (2009) 259–282.
- [23] H. Schägger, H. Aquila, G. Von Jagow, Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis, Anal. Biochem. 173 (1988) 201–205.
- [24] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (1979) 4350–4354.
- [25] D. González-Halphen, M.A. Lindorfer, R.A. Capaldi, Subunit arrangement in beef heart complex III, Biochemistry 27 (1988) 7021–7031.
- [26] R.A. Hall, Studying protein–protein interactions via blot overlay or Far Western blot, Methods Mol. Biol. 261 (2004) 167–174.
- [27] S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, L. Kinch, W. Sheffler, B.H. Kim, R. Das, N.V. Grishin, D. Baker, Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta, Proteins 77 (Suppl. 9) (2009) 89–99.
- [28] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, BMC Bioinforma. 9 (2008) 40.
- [29] 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. 25 (2004) 1605–1612.
- [30] A. Tsvigreichko, I.A. Vakser, GRAMM-X public web server for protein–protein docking, Nucleic Acids Res. 34 (2006) W310–W314.
- [31] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein–ligand interactions, Protein Eng. 8 (1995) 127–134.
- [32] V.K. Dickson, J.A. Silvester, I.M. Fearnley, A.G. Leslie, J.E. Walker, On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase, EMBO J. 25 (2006) 2911–2918.
- [33] A. Poetsch, R.J. Berzborn, J. Heberle, T.A. Link, N.A. Dencher, H. Seelert, Biophysics and bioinformatics reveal structural differences of the two peripheral stalk subunits in chloroplast ATP synthase, J. Biochem. 141 (2007) 411–420.
- [34] A.K. Welch, C.J. Bostwick, B.D. Cain, Manipulations in the peripheral stalk of the *Saccharomyces cerevisiae* F1FO-ATP synthase, J. Biol. Chem. 286 (2011) 10155–10162.
- [35] Y. Bi, J.C. Watts, P.K. Bamford, L.K. Briere, S.D. Dunn, Probing the functional tolerance of the b subunit of *Escherichia coli* ATP synthase for sequence manipulation through a chimera approach, Biochim. Biophys. Acta 1777 (2008) 583–591.
- [36] S.B. Claggett, M. O’Neil Plancher, S.D. Dunn, B.D. Cain, The b subunits in the peripheral stalk of F1FO ATP synthase preferentially adopt an offset relationship, J. Biol. Chem. 284 (2009) 16531–16540.
- [37] R. Priya, G. Biukovic, S. Gayen, S. Vivekanandan, G. Grüber, Solution structure, determined by nuclear magnetic resonance, of the b30-82 domain of subunit b of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase, J. Bacteriol. 191 (2009) 7538–7544.
- [38] A.M. Balakrishna, C. Hunke, G. Grüber, The structure of subunit E of the *Pyrococcus horikoshii* OT3 A-ATP synthase gives insight into the elasticity of the peripheral stalk, J. Mol. Biol. 420 (2012) 155–163.
- [39] P. Fariselli, D. Molinini, R. Casadio, A. Krogh, Prediction of structurally-determined coiled-coil domains with hidden Markov models, Lect. Notes Comput. Sci 4414 (2007) 292–302.
- [40] J.E. Walker, V.K. Dickson, The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase, Biochim. Biophys. Acta 1757 (2006) 286–296.
- [41] D.T. McLachlin, S.D. Dunn, Disulfide linkage of the b and delta subunits does not affect the function of the *Escherichia coli* ATP synthase, Biochemistry 39 (2000) 3486–3490.
- [42] J. Vonck, K.Y. Pisa, N. Morgner, B. Brutschy, V. Müller, Three-dimensional structure of A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy, J. Biol. Chem. 284 (2009) 10110–10119.
- [43] D.M. Rees, A.G. Leslie, J.E. Walker, The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 21597–21601.
- [44] N.P. Balabaskaran, N.V. Dudkina, L.A. Kane, J.E. van Eyk, E.J. Boekema, M.W. Mather, A.B. Vaidya, Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*, PLoS Biol. 8 (2010) e1000418.
- [45] A. Zikova, A. Schnaufer, R.A. Dalley, A.K. Panigrahi, K.D. Stuart, The F(0)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*, PLoS Pathog. 5 (2009) e1000436.
- [46] A. Wächter, Y. Bi, S.D. Dunn, B.D. Cain, H. Sielaff, F. Wintermann, S. Engelbrecht, W. Junge, Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 3924–3929.
- [47] A.G. Stewart, L.K. Lee, M. Donohoe, J.J. Chaston, D. Stock, The dynamic stator stalk of rotary ATPases, Nat. Commun. 3 (2012) 687.



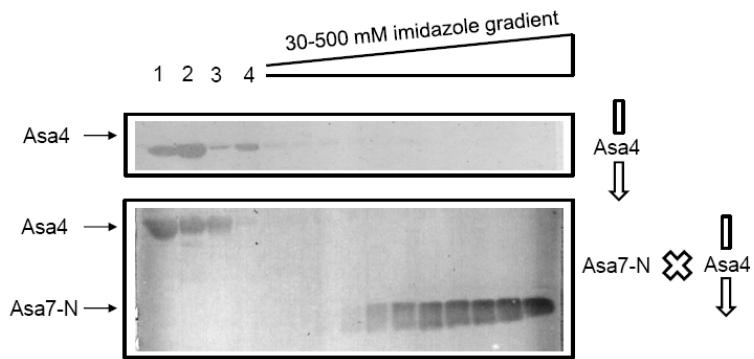
Supplementary Figure 1. Antibodies used in this work. Western blot analyses carried out on the following proteins transferred to nitrocellulose membranes: 25 µg of *Polytomella* ATP synthase (lanes 1, 5 and 7), 3 µg of recombinant (r) proteins Asa4 (lane 2), Asa4-N fragment (lane 3), Asa4-C fragment (lane 4), Asa2 (lane 6), and Asa7 (lane 8). The membranes were decorated with antibodies against Asa4 (lanes 1–4), Asa2 (lanes 5 and 6), and Asa7 (lanes 7 and 8).



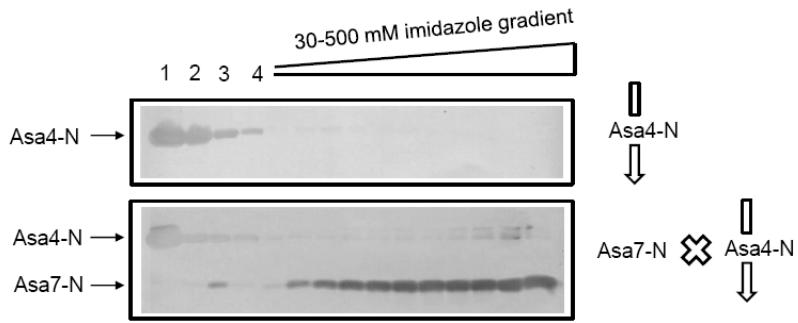
Supplementary Figure 2. The Asa 4-N fragment interacts poorly with other subunits. A) Far-Western analysis of *Polytomella* ATP synthase (25 µg of protein per lane) incubated for 4 h with increasing nanomoles of the isolated, recombinant Asa4-N fragment as indicated (in a 5 mL final volume), and then decorated with anti-Asa4 antibody.



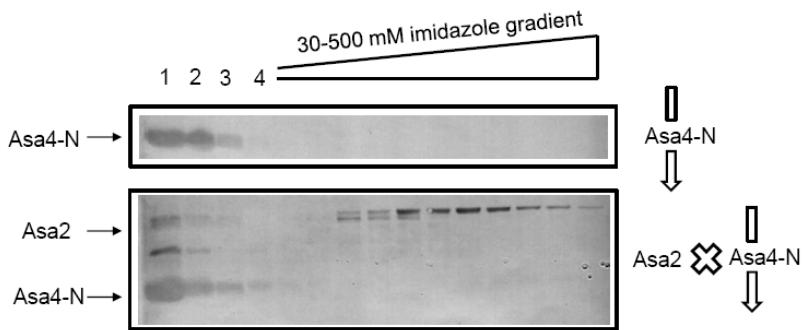
Supplementary Figure 3. The Asa 4-N fragment does not interact with Asa7. Interaction of the Asa4-N fragment and Asa7 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4 subunit was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which Asa7, containing a 6His-tag, was previously bound (middle and lower panels). Western blot decorated with an anti-Asa4 antibody (middle panel) and an anti-Asa7 antibody (lower panel) of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.



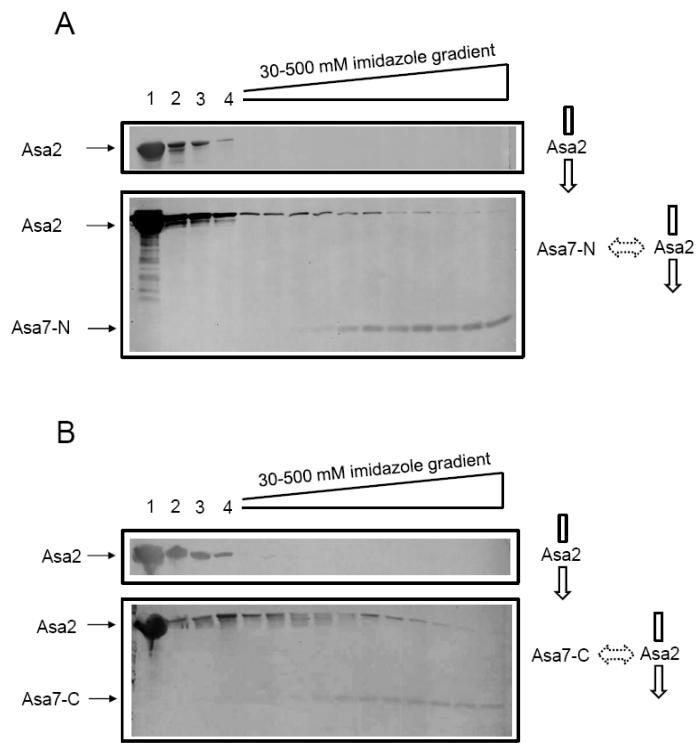
Supplementary Figure 4. The Asa 4 does not interact with the Asa7-N fragment. Interaction of Asa4 fragment and Asa7-N fragment assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4 subunit was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which the Asa7-N fragment, containing a 6His-tag, was previously bound (lower panel). Western blot of the column fractions decorated with both an anti-Asa4 antibody and an anti-Asa7 antibody of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.



Supplementary Figure 5. The Asa 4-N fragment does not interact with the Asa7-N fragment. Interaction of the Asa4-N fragment with Asa7-N assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4-N fragment was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which the Asa7-N fragment, containing a 6His-tag, was previously bound (lower panel). Western blot decorated with both an anti-Asa7 antibody and an anti-Asa4 antibody of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.



Supplementary Figure 6. The Asa 4-N fragment does not interact with Asa2. Interaction of the Asa4-N fragment and Asa2 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4-N fragment was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which Asa2, containing a 6His-tag, was previously bound (lower panel). Western blot decorated with both anti-Asa2 and anti-Asa4 antibodies of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.



Supplementary Figure 7. The Asa 7-N and Asa7-C fragments interact poorly with Asa2. A, B) Interaction of the Asa7 fragments and Asa2 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa2 was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which Asa7-N (A, lower panel) or Asa7-C (B, lower panel), both containing a 6His-tag, were previously bound. Western blot decorated with both anti-Asa2 and anti-Asa7 antibodies of the column fractions collected upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. Lane 1, crude extract loaded on the column; lane 2, protein excluded from the column; lanes 3 and 4, proteins excluded from the column after washing with 30 mM imidazole.

ORIGINAL ARTICLE

Overexpression of a monomeric form of the bovine odorant-binding protein protects *Escherichia coli* from chemical-induced oxidative stress

A. Macedo-Márquez¹, M. Vázquez-Acevedo¹, L. Ongay-Larios¹, H. Miranda-Astudillo¹, R. Hernández-Muñoz¹, D. González-Halphen¹, S. Grolli² & R. Ramoni²

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico, and ²Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma, Via del Taglio, Parma, Italia

Abstract

Mammalian odorant-binding proteins (OBPs) are soluble lipocalins produced in the nasal mucosa and in other epithelial tissues of several animal species, where they are supposed to serve as scavengers for small structurally unrelated hydrophobic molecules. These would include odorants and toxic aldehydes like 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), which are end products of lipid peroxidation; therefore OBP might physiologically contribute to preserve the integrity of epithelial tissues under oxidative stress conditions by removing toxic compounds from the environment and, eventually, driving them to the appropriate degradative pathways. With the aim of developing a biological model based on a living organism for the investigation of the antioxidant properties of OBP, here we asked whether the overexpression of the protein could confer protection from chemical-induced oxidative stress in *Escherichia coli*. To this aim, bacteria were made to overexpress either GCC-bOBP, a redesigned monomeric mutant of bovine OBP, or its amino-terminal 6-histidine-tagged version 6H-GCC-bOBP. After inducing overexpression for 4 h, bacterial cells were diluted in fresh culture media, and their growth curves were followed in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) and *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH), two reactive oxygen species whose toxicity is mainly due to lipid peroxidation, and menadione, a redox-cycling drug producing the superoxide ion. GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were found to protect bacterial cells from the insulting agents H_2O_2 and tBuOOH but not from menadione. The obtained data led us to hypothesize that the presence of overexpressed OBP may contribute to protect bacterial cells against oxidative stress probably by sequestering toxic compounds locally produced during the first replication cycles by lipid peroxidation, before bacteria activate their appropriate enzyme-based antioxidative mechanisms.

Keywords: lipocalins, lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal, reactive oxygen species, unsaturated fatty acids

Introduction

Oxygen is a highly reactive molecule that when partially reduced may give rise to the so-called reactive oxygen species (ROS) superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals (HO^{\bullet}) [1,2]. ROS are formed inside cells as a consequence of oxidative metabolic processes and may cause chemical modifications in lipids, DNA, and proteins [2–5]. A large part of the chemical toxicity determined by ROS is due to the peroxidation of unsaturated fatty acids, whose main end products are reactive unsaturated aldehydes of 7–11 carbon atoms [3–6]. These unstable molecules inactivate the biological functionality of proteins and nucleic acids by reacting, in a Michael type addition, with nucleophilic groups (-SH, -NH₂, and imidazole) of amino acids and nucleotides [3,4]. Of particular interest is 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), a molecule locally produced at millimolar levels during oxidative stress, which is involved in the pathogenesis of several acute and chronic diseases and cancer [3,4].

In eukaryotes, unsaturated aldehydes are generated through the peroxidation of membrane polyunsaturated fatty acids (PUFA) [3–6], which are compounds extremely

susceptible to the chemical reactivity of ROS. Although oxidative stress in bacteria has been extensively investigated [7], due to the lack of PUFA in these microorganisms, the toxicity induced by ROS-derived unsaturated aldehydes was not considered of particular interest for a long time. Nevertheless, bacteria exhibit high levels of membrane monounsaturated fatty acids, and recent investigations on *Escherichia coli* have shown that these molecules can be subjected to ROS-driven lipid peroxidation and give raise to the same toxic aldehydes that have been found in eukaryotes [8,9].

Although the inactivation of ROS and of their toxic derivatives is mainly achieved enzymatically, some experimental evidences on the odorant-binding protein (OBP), namely a carrier for small hydrophobic molecules originally purified from nasal mucosa of several mammalian species, have suggested that scavenging proteins could also play a role *in vivo* against the toxic effects of oxidative stress [10]. The connections between OBPs, biological oxidation, and/or the molecular mechanisms that cells and tissues oppose to the activity of ROS can be summarized as follows: (i) in mammals OBPs are expressed at high levels by epithelial tissues which are either directly exposed

to molecular oxygen (nasal mucosa, lachrymal and salivary glands, and lung), or subjected to high levels of oxidative stress (prostate, mammary gland, male deferent ducts, and placenta) [11,12]; (ii) OBPs from different animal species can bind with similar affinities toxic molecules produced by ROS such as several aldehydes derived from lipid peroxidation, including HNE [10,13]; (iii) *in-vitro*, in a simplified model resembling nasal epithelium, a 6-His amino terminal tagged version of native dimeric bOBP, coupled at low millimolar concentrations to Ni-NTA agarose, was able to protect an epithelial cell line derived from bovine turbinates from the toxicity of HNE [10].

OBPs belong to a family of small (140–166 amino acid) extracellular soluble proteins, spread from bacteria to mammals, named lipocalins, that bind hydrophobic compounds with molecular masses ranging from 150 to 300 Da [14]. While the primary structure of lipocalins varies widely, their tertiary structures are highly conserved and exhibit a unique structural frame, named lipocalin folding, formed by the three-dimensional arrangements of two domains: an eight stranded β -barrel (constituted by the first 110–120 amino acid residues) and a short carboxy-terminal α -helix. A short curved hinge (8–10 amino acid residues) connects the two domains, and their reciprocal position is stabilized through a disulfide bridge between two highly conserved cysteine residues [15]. The β -barrel gives rise to a cavity layered by hydrophobic residues that represents the ligand binding site, while the role of the conserved carboxy-terminal α -helix still remains to be defined [15].

OBPs are considered to be multifunctional extracellular protein carriers/scavengers involved in several biological processes that may occur independently or simultaneously in a specific tissue. For example, in the nasal epithelia, OBP dissolved in the mucus is supposed to be involved in olfactory perireceptor events behaving either as carrier of odorous compounds to their receptors or as a scavenger of excess odors [11,16]. In addition to this function, taking into account its ligand-binding capacity for molecules derived from lipid peroxidation, OBP [10] might also contribute to the removal, from the mucus, of cytotoxic molecules produced as a consequence of oxidative stress, driving them into the first tract of the digestive system where they can be inactivated. Thus OBP may protect to some extent from oxidative damage the olfactory receptors, whose integrity is crucial for both individual (food research, danger perception, etc.) and social (reproduction, establishment of hierarchic positions inside a group, etc.) behaviors of the animals. Among OBPs, the bovine form (bOBP) is atypical, since it is a homodimer stabilized by domain swapping, where each of the two lipocalin folding units that constitute its three-dimensional structure is formed by the alpha helix of one subunit and the beta barrel of the other [17,18]. The reason for this structural organization of bOBP resides on one hand on the lack of a glycine in position 122, that in monomeric lipocalins is responsible for the flexibility of the hinge that allows the alpha helix to make contact with the external surface of the beta barrel; and on the other hand, on the absence of

two conserved cysteine residues in positions 64 and 155 that form the inter-domain disulfide bridge that stabilizes the overall architecture of the protein. Based on the role of these three residues and on the structural features of the monomeric native porcine OBP [19], the bovine dimeric form was redesigned as a monomer by introducing three-point mutations: the insertion of a glycine in position 122 and two amino acid substitutions, W64C and H155C [20]. The resulting structurally simplified mutant (GCC-bOBP), whose three-dimensional arrangement is coincident with that of all monomeric lipocalins, maintains the same binding properties of the native, dimeric bOBP [20].

Bovine OBP, porcine OBP, GCC-bOBP, and its amino terminal-6-His-tagged version (6H-GCC-bOBP) bind with relative high affinity (K_d s in the range of 9.0 μM) toxic compounds produced by ROS such as HNE and other 7–11 carbon atoms aldehydes and unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation, and can resist their deleterious chemical activity [10 and Grolli et al., manuscript in preparation]. In addition, as mentioned above, a simplified model resembling nasal epithelium showed that extra-cellular immobilized OBP could protect a cell line derived from bovine turbinates from toxic amounts of HNE added to the culture medium [10]. We therefore hypothesized that over-expression of monomeric GCC-bOBP as well as 6H-GCC-bOBP by properly transformed *E. coli* strains could preserve, to some extent, the viability of the bacterium subjected to externally chemical-induced oxidative stress. This would involve the removal by OBP of toxic compounds locally produced, some of which probably derived from lipid peroxidation, before bacteria synthesize and activate the appropriate detoxifying enzymes [21,22]. To this aim, after inducing overexpression of the OBPs for 4 h, bacterial growth curves were followed in the presence of increasing concentrations of three compounds that induce oxidative stress: menadione [23], a strong generator of the superoxide radical, and two ROS, that is, H_2O_2 and *tert*-butyl hydroperoxide [21], which initiate the production of reactive toxic aldehydes and unsaturated aldehydes through lipid peroxidation with a similar chemical mechanism but a different reactivity, being the second more hydrophobic and therefore favored to react with membrane lipids.

Materials and methods

Strains

E. coli BL21-CodonPlus competent cells were obtained from Stratagene (La Jolla, California).

Protein analysis

Denaturing gel electrophoresis was carried out in a Tricine-SDS-PAGE system [24], as indicated. Proteins were loaded on 12.5% polyacrylamide gels. The stacking gel contained 4% (w/v) polyacrylamide. Protein concentrations of the purified OBP samples were determined on

the spectrophotometer [20], while for the crude extracts or partially purified preparations, the protein contents were estimated following a modification of the Lowry procedure [25].

Overexpression of recombinant proteins

E. coli BL21-CodonPlus competent cells were transformed by heat shock at 42°C for 2 min with an empty pT7-7 vector or pT7-7 vectors containing the appropriate cDNA constructs required to express GCC-bOBP or 6H-GCC-bOBP [20,26]. Bacteria were grown in LB media supplemented with ampicillin (100 µg/mL). Proteins were over-expressed in the presence of the inducing agent isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) [27].

Purification of recombinant proteins

E. coli BL21-CodonPlus transformed with pT7-7 vector containing the cDNA of 6H-GCC-bOBP were grown in two liters of culture media at 37°C until an absorbance value of 0.6 at 600 nm was attained. Then IPTG was added to a 0.1 mM final concentration and the culture was incubated for 4 additional hours. The culture was then centrifuged at 6,000 g for 15 min, and the resulting pellet (4.0 mL/L of culture medium) was resuspended in 50 mM of NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.8. Cells were broken by sonication with six pulses of 1 min each followed by 1 min interruptions using a Branson-450 sonifier (settings: 5 watts, 50% output). From there on, all steps were carried out at 4°C. The broken cells were centrifuged at 12,000 g for 10 min and the supernatant containing 6H-GCC-bOBP recovered. Imidazole was added to the sample to a final concentration of 10 mM. Then, the sample was loaded on a 5 mL of HisTrap FF crude column (GE Healthcare) equilibrated with PBS. The column was washed with the same buffer containing 30 mM imidazole. Then, the protein was eluted with a 30–500 mM imidazole gradient in the same buffer. The fractions obtained from the column were analyzed using SDS-Tricine-PAGE, and the pure 6H-GCC-bOBP protein was collected, concentrated, and preserved at –70°C until used.

Untagged GCC-bOBP was purified using FPLC according to previously published procedures [20] starting from a soluble bacterial extract prepared like that of 6H-GCC-bOBP (see above, this same paragraph).

Antibody production and immunoblotting

Antibodies were generated against 6H-GCC-bOBP. Twenty microgram of the recombinant, isolated protein were resolved using Tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) in the presence of 25 mg/L of Serva Blue G in the upper buffer as described [24]. 6H-GCC-bOBP was excised from the gel, grinded in the presence of 20 mM Tris (pH 7.0), mixed with Freund's complete adjuvant and injected into rabbits for antibody production. For Western blot analysis, samples were subjected to SDS-Tricine-PAGE, and gels were electro-transferred

onto a nitrocellulose Trans-Blot membrane (BioRad) for immune-detection [28]. Membranes were washed, blocked, and incubated with the antibody raised against the 6H-GCC-bOBP. An alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (diluted 1:3000 for 2 h) was used as a secondary antibody. Protein colorimetric detection was carried out with 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt and nitro-blue tetrazolium chloride. The images of the polypeptide bands decorated with the insoluble black-purple precipitates were recorded using a HP Scanjet G4050.

Growth curves

Bacterial growth curves were followed in a BIOSCREEN C apparatus that allows monitoring bacterial growth in culture volumes of 300 µl under controlled temperature and agitation. Where indicated, cultures were subjected to increasing concentrations of chemical agents known to induce ROS production. For this purpose, 10 mL cultures of the three strains of *E. coli* were grown overnight at 37°C in 50-mL flasks in LB media containing 100 µg/mL ampicillin, until they reached an O.D. at 600 nm between 0.8 and 1.0. One mL of each culture was diluted with 9.0 mL of LB media and induced for 4 h at 37°C in the presence of 0.1 mM IPTG. Then, 700 µl of the induced culture were transferred to sterile 15 mL Falcon tubes, to reach an O.D. (600 nm) of 0.2 in a final volume of 10 mL of LB media containing 100 µg/mL ampicillin but lacking IPTG. Thus, the IPTG concentration of the samples was diluted down to only 7 µM, a level that is ineffective to induce significant amounts of newly synthesized heterologous protein. Aliquots of the culture were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes to which increasing concentrations of the selected insulting agent were added. Finally, triplicates of 300 µl of each culture media were transferred to a 100-well plate and growth followed at 40-min intervals at 37°C in a BIOSCREEN C apparatus at maximum agitation for up to 15 or 20 h. Growth curves for representative experiments were collected. The absorbance values at 600 nm obtained for the same experiment were normalized taking the maximal value as 1.0. Each experiment (with different cultures in different days) was also carried out by triplicate.

Results

In order to address the effects of OBP in *E. coli* under oxidative stress stimuli, two proteins, namely monomeric GCC-bOBP and its histidine tagged version 6H-GCC-bOBP were first overexpressed in the BL21-Codon Plus strain as already reported [20,26]. Figure 1A shows a Coomassie Blue-stained acrylamide gel of samples of the same amounts of bacteria transformed with pT7-7 vectors bearing the different OBP constructs at 0, 4, 6, and 8 h after induction with IPTG. A control with bacteria containing an empty vector (EV) is also shown. Both GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were overexpressed, being

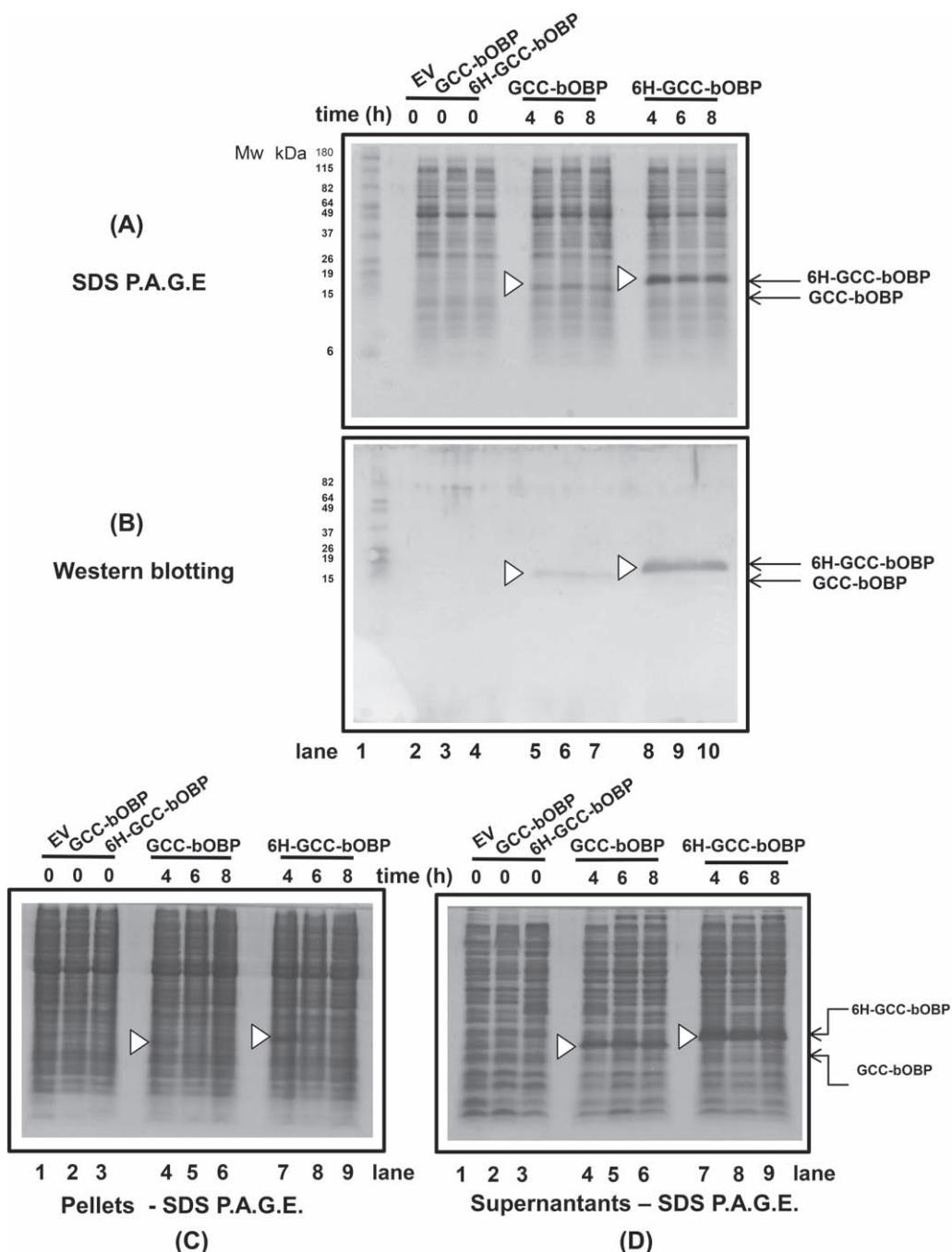


Figure 1. Overexpression of GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP. (A) Tricine-SDS polyacrylamide gel showing the polypeptide pattern of bacterial crude extracts overexpressing GCC-bOBP (lanes 3 and 5–7) and 6H-GCC-bOBP (lanes 4 and 8–10) at 0, 4, 6, and 8 h. The crude extract of control cells containing the EV are shown for comparison (lanes 2). The identities of the two overexpressed proteins are indicated (white arrows and labels on the right hand side). The apparent molecular masses (in kDa) of the protein markers resolved in the same gel (Mw, lane 1) are indicated in the left part of the panel. 6H-GCC-bOBP exhibits a slightly higher apparent molecular mass (~18 kDa) than GCC-bOBP (~17 kDa) due to the presence of the 6His-tag. (B) Western blot analyses carried out on bacterial crude extracts carrying the EV (EV, lanes 2), or overexpressing GCC-bOBP (lanes 3 and 5–7) or 6H-GCC-bOBP (lanes 4 and 8–10) at 0, 4, 6, and 8 h. The apparent molecular masses of the protein markers resolved in the same gel (Mw, lane 1) are indicated in the left part of the panel. (C) and (D) Bacterial cells carrying the EV (EV, lane 1), or overexpressing GCC-bOBP (lanes 2 and 4–6) or 6H-GCC-bOBP (lanes 3 and 7–9) at 0, 4, and 6, and 8 h, were broken, subjected to differential centrifugation and separated into pellets (panel C) and supernatants (panel D), which were resolved in Tricine-SDS polyacrylamide gels.

overexpression of 6H-GCC-bOBP five times higher than that of GCC-bOBP, as judged by densitometric analysis. As expected, no OBP protein band was observed when induction was carried out in the presence of an EV. The higher molecular mass of 6H-GCC-bOBP revealed by

SDS PAGE under reducing conditions can be ascribed to the six histidine residues at the amino terminal, that contribute by an extra 930 Da value to the mass of the protein. In order to unambiguously identify the presence of the two overexpressed proteins, Western blot analysis was carried

out. A similar gel to the one shown in Figure 1A was transferred to a nitrocellulose membrane and revealed with an anti-6H-GCC-bOBP antibody. Figure 1B shows the Western blot of bacterial total protein extracts obtained at 0, 4, 6, and 8 h after induction with IPTG. Four hours of IPTG induction were used in subsequent experiments. In order to assess whether the overexpressed proteins were in soluble form or in inclusion bodies, the bacterial cells expressing GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were homogenized, centrifuged, and the resulting pellets and supernatants were subjected to SDS-PAGE. The largest amount of the overexpressed proteins could be recovered in the supernatants, indicating that they are present mainly in a soluble form (Figure 1C and D).

The two OBP forms that were purified from the bacterial supernatants after 4 h IPTG induction, gave production yields of 8.0 and 40.0 mg/liter of bacterial culture media for GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP, respectively. These data substantially confirm the ratio between the concentration levels obtained by densitometric analysis on the crude bacterial extracts after SDS-PAGE and, more qualitatively, from the immunoblotting (Figure 1B). It must be underlined that, due to the loss of protein during the chromatographic step and to the underestimation of the volume of the bacterial cytosol obtained either from the volume of the cell pellets (about 4.0 mL/liter of culture media) and from the optical density at 600 nm of the bacterial suspension (about 1.1 OD units) [29], the real amounts of protein expressed in bacteria must have been higher than those obtained after purification. Just focusing on the volumes of the wet pellets of 4.0 h induced bacterial cultures, which were about 4.0 mL/liter of culture media, it can be estimated that the intracellular concentrations of the two protein forms were certainly higher than 0.13 and 0.55 mM for GCC-bOBP and GCC-bOBP-6H, respectively. Therefore, taking into account that the dissociation constants of the OBP-ligand binding complexes are in the micromolar range, the presence of at least low-millimolar levels of both OBP forms in the *E. coli* cytosol allowed us to explore the possible protective scavenging effects by these proteins on toxic ligands eventually produced by the activity of ROS in cells subjected to insults with different chemical oxidizing agents.

To this aim GCC-bOBP or 6H-GCC-bOBP were overexpressed in properly transformed *E. coli* for 4 h, and then after removal of IPTG by dilution, bacterial growth curves were followed in the presence of increasing concentrations of insulting agents that induce oxidative stress. Control cells containing the empty expression vector were also subjected to induction in the presence of IPTG for 4 h and then treated as those overexpressing the two OBP forms. Three insulting agents were used: menadione, hydrogen peroxide (H_2O_2), and *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH). Several bacterial growth curves were carried out in order to establish the range of concentrations in which the different agents affected growth in the three bacterial strains. The established ranges of concentrations to be assayed were: for menadione, from 125 to 225 μ M; for H_2O_2 , from 0.6 to 1.0 mM; and for tBuOOH, from 175 to 275 μ M.

Figure 2A shows representative examples of growth curves obtained for the control cells (with the EV) in the absence of menadione and in the presence of increasing concentrations of the quinone (from 125 to 225 μ M). Growth curves for the cells expressing GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP are shown in Figure 2B and C, respectively. The growth curves of cells expressing GCC-bOBP exposed to increasing concentrations of quinone were similar to the growth curves of cells expressing only the EV, while 6H-GCC-bOBP overexpression seems to have a deleterious effect on the bacterial cells, and no growth was observed at concentrations of 175, 200, and 225 μ M menadione. Figure 3A shows the growth curves obtained for the control cells (with the EV) in the absence of H_2O_2 and in the

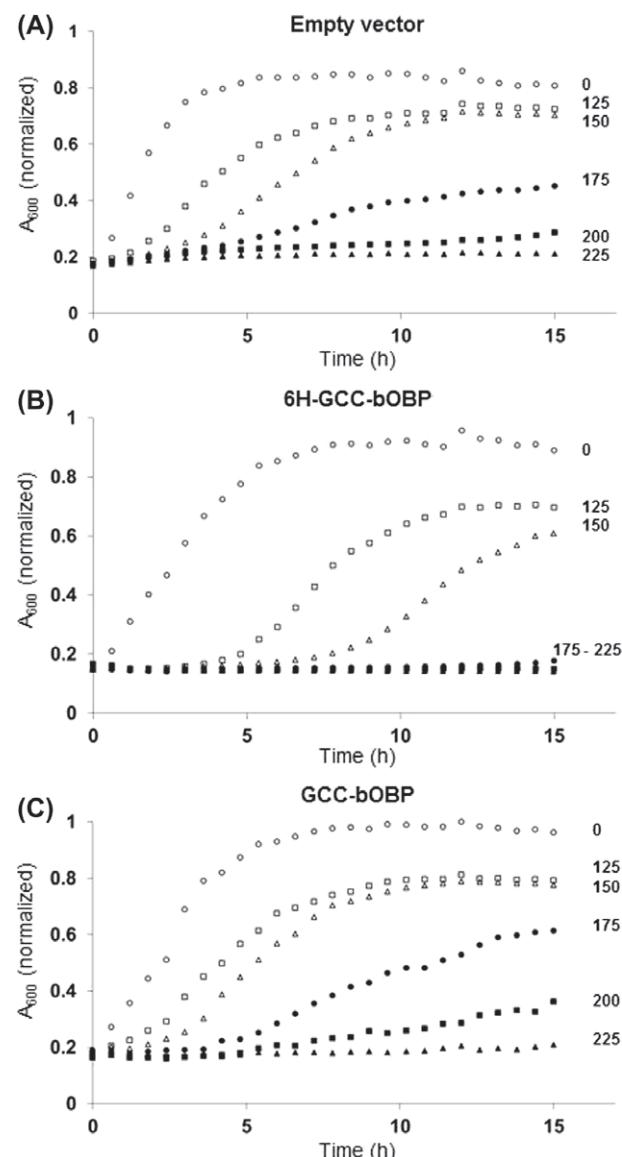


Figure 2. Bacterial growth curves at increasing concentrations of menadione. Bacteria were induced with IPTG for 4 h previous to monitoring their growth at 600 nm. The three samples were exposed to increasing concentrations of menadione as indicated (μ M concentrations). (A) Growth of *E. coli* cells containing only empty vector. (B) Growth of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. (C) Growth of *E. coli* cells overexpressing GCC-bOBP.

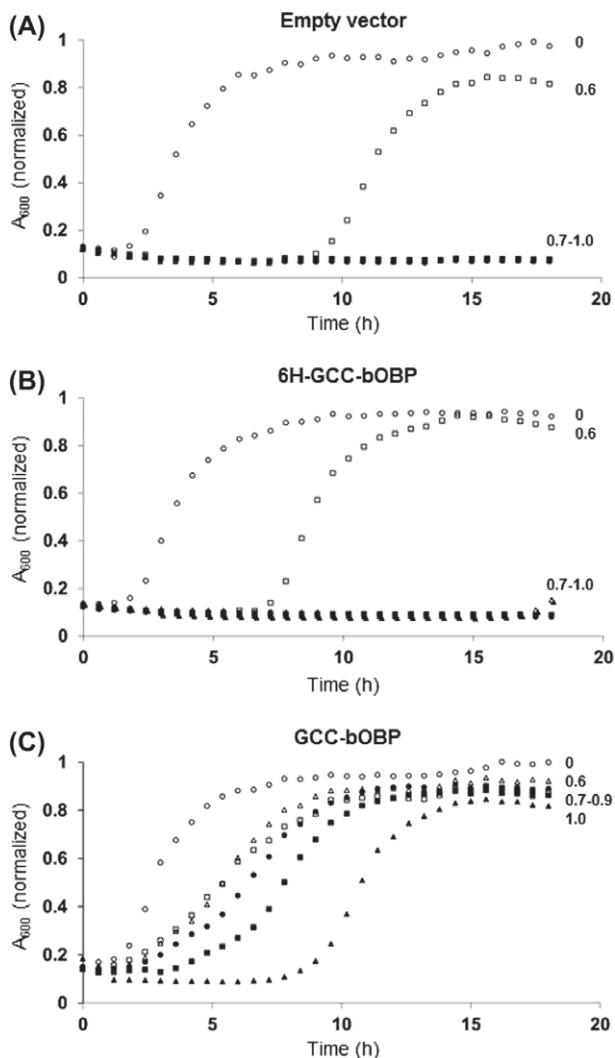


Figure 3. Bacterial growth curves at increasing concentrations of H_2O_2 . Bacteria were induced with IPTG for 4 h previous to monitoring their growth at 600 nm. The three samples were exposed to increasing concentrations of hydrogen peroxide as indicated (mM concentrations). (A) Growth of *E. coli* cells containing empty vector. (B) Growth of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. (C) Growth of *E. coli* cells overexpressing GCC-bOBP.

presence of increasing concentrations of the oxidizing agent (from 0.6 to 1.0 mM). Growth curves for the cells expressing 6H-GCC-bOBP and GCC-bOBP are shown in Figure 3B and C, respectively. Cells with the EV or cells overexpressing 6H-GCC-bOBP showed a strong lag phase in the growth curves in the presence of 0.6 mM H_2O_2 , and were unable to grow at concentrations above 0.6 mM of the oxidizing agent. In contrast, the cells overexpressing GCC-bOBP, although they also exhibited lag phases progressively longer, were able to grow at concentrations as high as 1.0 mM H_2O_2 . Thus, GCC-bOBP overexpression could significantly protect bacterial cells from the deleterious effects of hydrogen peroxide.

We explored the effects of a third chemical agent, tBuOOH. Figure 4A shows the growth curves obtained for the control cells (EV) in the absence of tBuOOH and in the presence of increasing concentrations of the oxidizing agent (from 175 to 275 μ M). Growth curves for the cells

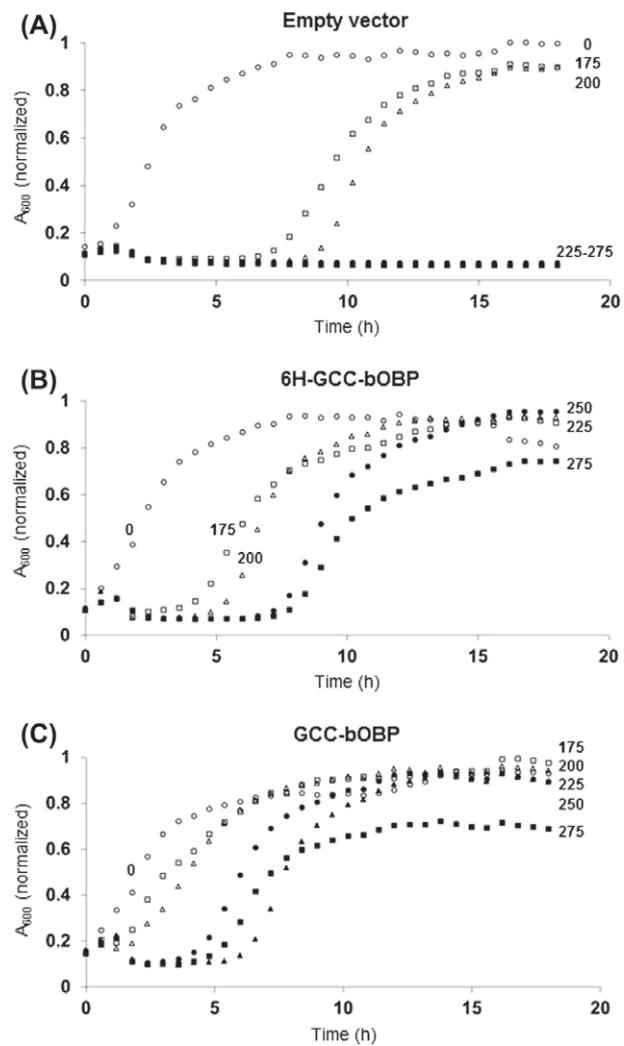


Figure 4. Bacterial growth curves at increasing concentrations of tBuOOH. Bacteria were induced with IPTG for 4 h previous to monitor their growth at 600 nm. The three samples were exposed to increasing concentrations of tBuOOH as indicated (μ M concentrations). (A) Growth of *E. coli* cells containing empty vector. (B) Growth of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. (C) Growth of *E. coli* cells overexpressing GCC-bOBP.

expressing 6H-GCC-bOBP and GCC-bOBP are shown in Figure 4B and C, respectively. Control cells carrying the EV exhibited a long lag phase but were able to grow at concentrations of 175 and 200 μ M tBuOOH. Cells expressing 6H-GCC-bOBP were able to grow at 250 μ M of tBuOOH, while those expressing GCC-bOBP grew up to 275 μ M tBuOOH. Thus, a moderate protective effect of both GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP is exerted when bacterial cells are exposed to the oxidative agent tBuOOH.

Discussion

ROS are short-lived radical intermediates generated as a consequence of oxidative metabolism that are believed to damage, following different chemical pathways, cells subjected to oxidative stress [2]. Among these mechanisms,

a relevant role is played by the lipid peroxidation of membrane unsaturated fatty acids, a complex process that produces several toxic low molecular mass reactive aldehydes that can damage and inactivate proteins and nucleic acids by attacking their nucleophilic groups and forming covalent adducts [3].

Since several data from the literature (tissue expression *in-vivo* and biochemical properties) allowed to hypothesize an involvement of OBP in the molecular mechanisms that tissues and cells oppose to biological oxidation, we tested if high expression levels of this protein were able to protect, to some extent, a living organism subjected to ROS and ROS-inducing chemicals. Our chosen biological model was *E. coli*, whose lipid membrane composition has 50% unsaturated and 50% saturated fatty acids [21,30]. We worked with BL21-CodonPlus, a commercial strain commonly employed to produce recombinant proteins including OBPs [10,20]. *E. coli* cells were transformed with pT7-7 expression vectors containing either the cDNA of the monomeric mutant of bovine OBP (GCC-bOBP), or that of its 6-His amino terminal tagged version (6H-GCC-bOBP). GCC-bOBP was chosen because it is a structurally simplified version of the dimeric swapped bOBP with a 3D-structure resembling that of all monomeric lipocalins [20] that might exhibit a facilitated folding mechanism *in vivo*, and also because it retains the same ligand-binding specificities and affinities of bOBP [20].

As judged by Coomassie-Blue stained gels and Western blot analysis (Figure 1), competent cells over-expressed 6H-GCC-bOBP around five-fold more than the untagged protein. Although significantly different, both clones produced more than 8.0 mg of OBP/L of culture medium, a reasonable high level reached by recombinant proteins expressed in *E. coli*. Even if the average concentration of OBP/single *E. coli* cell after 4-h IPTG induction cannot be accurately determined, both from the volume of the bacterial pellets (about 4.0 mL/liter of culture media) and from the optical density at 600 nm of the bacterial suspension (about 1.1 OD units) [29], it can be estimated that it must be in the low millimolar range. Taking into account that the dissociation constants of the OBP ligands are generally in the micromolar range [23,30], it can be concluded that the concentration of OBP present in a soluble form in the *E. coli* cells, is high enough to guarantee that the protein can effectively scavenge from the cytoplasm equimolar amounts of toxic molecules and/or chemical intermediates produced by the activity of ROS (either derived from lipid peroxidation or of different chemical nature), that can fit its ligand binding site. In addition, it must be considered that an extra antioxidant function might also be played by the two cysteine residues of GCC-bOBP. The purified recombinant GCC-bOBP exhibits the interdomain disulfide bridge characterizing the lipocalin folding, as shown by X-ray diffractometry [20]. Nevertheless, it cannot be excluded that in the reducing environment of *E. coli* cytoplasm a fraction of the cysteines residues, that would be eventually exposed on the protein surface as free thiols, might contribute to mitigate the noxious effects of oxidative stress by reacting either with ROS or with their oxida-

tion end products. A similar behavior has been hypothesized in mitochondria, where protein thiols may play a role in intracellular antioxidant defenses against oxidative damage [31]. Thus, the protective effect played by the reduced protein cysteine residues would not be alternative, but rather complementary, to the OBP-driven scavenging activity of toxic molecules. In fact, previous experiments have shown that the stabilization of the two domains that constitute the protein, (the beta barrel and the carboxy-terminal alpha helix) either by domain swapping or disulfide bridge formation leaves unmodified the ligand binding properties of the monomeric bOBP mutant [32].

OBP over expression could protect, to some extent, *E. coli* cells from the oxidative injuries of hydrogen peroxide and tBuOOH, but not from those induced by menadione (Figures 2–4). Hydrogen peroxide and organic peroxides, including tBuOOH, primarily exert their cytotoxicity in living cells by inducing peroxidation of unsaturated fatty acids, whose main end products are short-chain reactive aldehydes and, in particular, 2-alkenals (including HNE) [2,9]. Therefore, the resistance observed in *E. coli* cells expressing GCC-bOBP might be due mainly to the removal of the toxic end products of lipid peroxidation and eventually to the reactivity of those reduced cysteine residues exposed to the solvent as free thiols [31]. A direct scavenging effect of OBP on tButOOH and H₂O₂ can be excluded just on the basis of their molecular weights, which are by far smaller than those of the typical ligands of the protein (150–300 Da). The lower protective effect played by OBP in the case of tBuOOH could be due to the chemical nature of this substance, and in particular to the presence of a tert-butyl radical that provides the molecule with a certain degree of hydrophobicity which is completely lacked in H₂O₂. This physical property, in fact, might significantly contribute to drive most of the tBuOOH to the cell membrane, where the direct contact with the hydrophobic tails of the unsaturated fatty acids might facilitate their peroxidative transformations.

With regard to the redox-cycling drug menadione (2-methyl-1,4-naphtoquinone), also named vitamin K₃, its cytotoxicity is due to the production of intracellular superoxide, a reactive radical that, if not transformed immediately into hydrogen peroxide by superoxide dismutase (SOD), can be deleterious for both eukaryotic and bacterial cells also at picomolar concentration levels [33,34]. The mechanisms of superoxide toxicity are the result of a combination of different reactive pathways including reduction of high-potential ferricytochromes [35], oxidation of low-potential iron–sulfur clusters [33–37] and H₂O₂-driven chemical reactions, whose cellular damages, as demonstrated here by the treatments with this same compound discussed above, can be mitigated, at some extent, by OBP. Because iron oxidation is considered the main pathway of biological superoxide it can be hypothesized that the amounts of H₂O₂ generated by exposure to menadione might be much lower than those produced when cells are directly exposed to hydrogen peroxide itself or to tBuOOH. This may be especially true immediately after the exposition to menadione, when SOD, whose

synthesis is driven by the SoxRS regulon [38,39], is absent or present in low concentrations.

Surprisingly, cells over-expressing GCC-bOBP, although accumulating less recombinant protein, showed more resistance to peroxide-induced oxidative stress than those over-expressing 6H-GCC-bOBP (Figures 2 and 3). Since the binding specificities and affinities of both untagged and tagged GCC-bOBP are super imposable [26,40 and Grolli et al., manuscript in preparation], we assume that the different resistance to oxidative stress of the two strains of bacteria should not be ascribed to the amino terminal hexa-histidine tag impeding HNE and/or other toxic molecules to access the ligand binding site by steric hindrance. We rather hypothesize that, because the metabolism of *E.coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP is committed almost exclusively to the production of the protein, bacterial cells are unable to activate rapidly enough the appropriate enzymatic protective mechanisms before chemically induced oxidation has produced enough damage to drive most of the cells to death.

Surprisingly, the control cells with EV resisted higher concentrations of menadione than cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. We suggest, based on the same reasons stated above, that producing very high levels of 6H-GCC-bOBP may be stressful for the bacterial cells to begin with, and thus they become more prone to the detrimental effects induced by the ROS-generating quinone than the cells that are not overexpressing proteins.

In conclusion, the data from the present investigation show that, although nasal mucosa and the *E. coli* cells transformed with cDNAs expressing OBP are two extremely different biological systems, in both cases sufficient amounts of OBP are present to exert the role of an effective scavenger for toxic ligands, thereby produced by the chemical activity of ROS. Further research, and in particular the characterization of the chemical nature of the ligands bound to GCC-bOBP purified from *E. coli* treated with H_2O_2 and tBuOOH, will aid to shed light on the molecular details of the protective role played physiologically by the protein in living organisms subjected to oxidative stress conditions.

Acknowledgments

We thank Dr. Héctor Malagón (IFC, UNAM) for his help in antibody production and Dr. Virna Conti (Univ. of Parma) for technical assistance.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This work was partially supported by grants Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) 128110 and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico) IN203311-3 to D.G.-H. The work was also supported by the bilateral research

project ‘MX11MO10’ funded by CONACyT (Mexico) and the Italian Minister of Foreign Affairs (MAE, Italy). CONACyT also supported with a fellowship the Ph.D. studies of A.M.-M. (Biochemical Sciences Graduate Program at UNAM, fellowship No 176940).

References

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC (eds.). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2006.
- [2] Miwa S, Muller FL, Beckman KB. The basics of oxidative biochemistry. In: Miwa S, Beckman KB, Muller FL (eds.). Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
- [3] Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress (review). *Prog Lipid Res* 2003;42:318–343.
- [4] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes (review). *Free Radic Biol Med* 1991;11:81–128.
- [5] Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products (review). *Free Radic Res* 2010;44:1098–1124.
- [6] Møller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58:459–481.
- [7] Imlay JA. “Pathways of oxidative damage”. *Ann Rev Microbiol* 2003;57:395–418.
- [8] Pérez JM, Arenas FA, Pradenas GA, Sandoval JM, Vásquez CC. *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *J Biol Chem* 2008;283: 7346–7353.
- [9] Pradenas GA, Díaz-Vásquez WA, Pérez-Donoso JM, Vásquez CC. Monounsaturated fatty acids are substrates for aldehyde generation in tellurite-exposed *Escherichia coli*. *Biomed Res Int* 2013;2013:563756.
- [10] Grolli S, Merli E, Conti V, Scaltriti E, Ramoni R. Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS J* 2006;273:5131–5142.
- [11] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996;318:1–14.
- [12] Flower DR, North ACT, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:9–24.
- [13] Lacazette E, Gachon AM, Pitiot G. A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum Mol Genet* 2000;9:289–301.
- [14] Mitchell GB, Clark ME, Siwicki M, Caswell JL. Stress alters the cellular and proteomic compartments of bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;125: 111–125.
- [15] Pevsner J, Hou V, Snowman AM, Snyder SH. Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J Biol Chem* 1990;265:6118–6125.
- [16] Briand L, Eloit C, Nespolous C, Bézirard V, Huet JC, Henry C, et al. Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* 2002;41: 7241–7252.
- [17] Tegoni M, Ramoni R, Bignetti E, Spinelli S, Cambillau C. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat Struct Biol* 1996; 3:863–867.
- [18] Bianchet MA, Bains G, Pelosi P, Pevsner J, Snyder SH, Monaco HL, Amzel LM. The three-dimensional structure of bovine

- odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat Struct Biol* 1996;3:934–939.
- [19] Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Bonicel J, Cambillau C, Tegoni M. The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry* 1998;37:7913–7918.
- [20] Ramoni R, Spinelli S, Grolli S, Conti V, Merli E, Cambillau C, Tegoni M. Deswapping bovine odorant binding protein. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:651–657.
- [21] Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008;77:755–776.
- [22] Mongkolsuk S, Helmann JD. Regulation of inducible peroxide stress responses (review). *Mol Microbiol* 2002;45:9–15.
- [23] Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J Biol Chem* 1982;257:12419–12425.
- [24] Schägger H, Link TA, Engle WD, Von Jagow G. Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. *Methods Enzymol* 1986;126:224–237.
- [25] Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206–210.
- [26] Ramoni R, Bellucci S, Gryczynski Z, Grolli S, Staiano M, De Bellis G, et al. The protein scaffold of the lipocalin odorant-binding protein is suitable for the design of new biosensors for the detection of explosive components. *J Phys-Condens Matt* 2007;19:1–7.
- [27] Studier FW, Moffat BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986;189:113–130.
- [28] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4354.
- [29] Volkmer B, Heinemann M. Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *PLoS One* 2011;6:e23126.
- [30] Morein S, Andersson AS, Rilfors L, Lindblom G. Wylde-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a “window” between gel and non-lamellar structures. *J Biol Chem* 1996;271:6801–6809.
- [31] Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J* 2010;277:1465–1480.
- [32] Ramoni R, Vincent F, Ashcroft AE, Accornero P, Grolli S, Valencia C, et al. Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein. *Biochem J* 2002;365:739–748.
- [33] Gort AS, Imlay JA. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J Bacteriol* 1998;180:1402–1410.
- [34] Imlay JA. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* 2006;59:1073–1082.
- [35] Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. Reactivity of HO₂/O₂^{•-} radicals in aqueous solution. *J Phys Chem* 1985;14:1041–1091.
- [36] Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS, Gralla EB. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem* 2000;275:29187–29192.
- [37] Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002;7:55–57; author reply 59–60.
- [38] Greenberg JT, Monach P, Chou JH, Josephy PD, Demple B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6181–6185.
- [39] Tsaneva IR, Weiss B. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1990;172:4197–4205.
- [40] Polverini E, Lardi P, Mazzini A, Sorbi RT, Conti V, Ramoni R, Favilla R. Characterization of a deswapped triple mutant bovine odorant binding protein. *Int J Mol Sci* 2011;12:2294–2314.