



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IMPORTACIÓN *in vitro* DE DOS SUBUNIDADES DE LA ATP SINTASA A LAS MITOCONDRIAS DEL ALGA *Polytomella* sp.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. FÉLIX VEGA DE LUNA

TUTOR PRINCIPAL
DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
[Facultad de Química, UNAM](#)

DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México. Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

RECONOCIMIENTOS

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

Se reconoce la asesoría técnica de la Química Bacterióloga Parasitóloga Miriam Vázquez Acevedo.

Este trabajo fue apoyado por los donativos DGAPA-UNAM IN-203114, CONACyT 239219.

Durante el desarrollo del proyecto el sustentante recibió una beca nacional para estudios de posgrado del CONACyT con el número 660082. El sustentante recibió apoyo para realizar una estancia de investigación en el laboratorio de Genética y Fisiología de Microalgas con el Dr. Pierre Cardol por parte del programa conjunto CONACyT – FNRS 245486 (México-Bélgica). Además, recibió apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir a un congreso nacional.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Sobeida Sanchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Dr. Ángel Zarain Herzberg	Facultad de Medicina, UNAM

El comité de revisión de Tesis y de Jurado de Examen estuvo integrado por:

Dra. Marietta Tuena Sangri	Presidente
Dr. Jorge Nieto Sotelo	Vocal
Dra. Georgina Garza Ramos Martínez	Vocal
Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva	Vocal
Dra. María Soledad Funes Argüello	Secretario

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está lleno de experiencias que merecen ser reconocidas, no sólo por la deuda que tengo con las personas con quienes conviví, sino porque hubo un aprendizaje significativo que marcó mi vida. Y ya que los favores no se pagan, sino que se agradecen, quiero expresar que tengo un profundo agradecimiento a los integrantes del laboratorio 324 Norte del Instituto de Fisiología Celular por haberme permitido desarrollar en distintos ámbitos durante este tiempo y espacio. Durante estos años aproveché y disfruté su compañía, sus pláticas, sus críticas, su comida, sus experiencias, sus preocupaciones, su hospitalidad, su risa, su tiempo, su sabiduría, su hermandad y un sinfín de conocimiento. Me siento muy orgulloso de haber sido considerado por ustedes como un miembro de este laboratorio y me llevo mucho aprendizaje de cada día que asistí.



El tiempo puede diluir los recuerdos del equipo con el que trabajé, por eso aquí una foto. De izquierda a derecha: Sr. Alfredo, Paco, Lilí, Héctor, Emma, Lorenzo, Alexa, Diego, Diana, Miriam y Félix. En marzo de 2016, y por supuesto que hubo comida (!).

Quiero decir también que, gracias al apoyo, cariño y amistad sinceros de mi familia, mis padres y hermanos, de mi familia adoptiva, Nohemí y los Bermúdez, de mis profesores y ahora compañeros amigos de Iztacala, Dr. Hugo Perales, Dra. Martha Salcedo, Mtra. Llaraí Gaviria, Dr. Roberto Velasco, de mis amigos David Sánchez, Arely Marcos, Saúl Camargo, he tomado la fuerza y motivación necesarias para seguir y mirar siempre adelante. Los consejos que ustedes me han dado me hacen un mejor ser humano, me siento muy afortunado por contar con todos ustedes todo el tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN	4
Importación de proteínas a la mitocondria.....	6
Importación de proteínas a las mitocondrias de <i>Polytomella</i>	10
La ATP sintasa de <i>Polytomella</i>	12
OBJETIVOS	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares	20
HIPÓTESIS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Clonación de los genes <i>asa6</i> y <i>atp6</i>	21
Síntesis de proteínas <i>in vitro</i>	24
Obtención de mitocondrias	24
Importación de proteínas a las mitocondrias.....	25
Análisis de secuencias.....	26
Análisis de estructuras	27
Búsqueda informática de secuencias en el transcriptoma de <i>Polytomella parva</i>	27
RESULTADOS.....	28
Las secuencias de <i>asa6</i> y <i>atp6</i> clonadas en el vector pSP64 se acoplan a la síntesis <i>in vitro</i>	28
Las mitocondrias aisladas son competentes para la importación de proteínas	29
Ensayo de importación <i>in vitro</i> de la subunidad Asa6.....	31
Ensayos de ensamblaje.....	35
Ensayo de importación <i>in vitro</i> de la subunidad Atp6.....	36
Análisis de secuencias de Asa6.....	44
La subunidad Atp6 de Chlamydomonadales tiene un patrón de hidrofobicidad atípico	45
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS	63
BIBLIOGRAFÍA	64
APÉNDICE.....	70

RESUMEN

La F₁F₀ ATP sintasa mitocondrial es un complejo altamente conservado en estructura y función, y su composición proteica suele ser producto de la expresión de genes codificados en el núcleo y en la mitocondria. El grupo de las algas verdes clorofíceas Chlamydomonadales es el único conocido en el que todas las subunidades del complejo están codificadas exclusivamente en el núcleo y en el que una porción significativa del complejo ha sido sustituida por proteínas de las que no se han encontrado homólogos. En este trabajo estudiamos los posibles requerimientos de las subunidades Asa6 y Atp6 de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. para ser importadas a mitocondrias aisladas.

Purificamos mitocondrias a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial y las incubamos con proteínas sintetizadas en un sistema *in vitro* y marcadas radiactivamente con [³⁵S] Met. Las reacciones fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografías. Realizamos la búsqueda de secuencias homólogas de las dos subunidades y estudiamos sus perfiles de hidrofobicidad y su posible topología para proponer su ruta biogénica.

Las subunidades Asa6 y Atp6 son importadas a las mitocondrias de *Polytomella* sp. de una manera dependiente del gradiente electroquímico. Su internalización a las mitocondrias procede con la eliminación proteolítica de la presecuencia de localización mitocondrial, sin embargo, no encontramos a esta proteína ensamblada en el complejo dimérico de ATP sintasa en las condiciones ensayadas. Deducimos que la subunidad Atp6 presenta una topología atípica acorde con su ruta biogénica y a una disminución importante de hidrofobicidad en el primer segmento transmembranal comparado con sus homólogos. Al mismo tiempo proponemos que la presencia de la subunidad Asa6 en el grupo de Chlamydomonadales pudo haber permitido que Atp6 presentara modificaciones hidrofóbicas importantes y probablemente la pérdida de un cruce transmembranal.

ABSTRACT

The mitochondrial F₁F₀ ATP synthase is a highly conserved complex, not only in function but also in structure. Its protein composition is usually the result of nuclear and mitochondrial gene expression. The Chlamydomonadales algae group is the only one known to encode these genes exclusively in the nucleus, and to possess a peripheral arm of the complex formed by non-homologous subunits. The requirements for *in vitro* protein import were assessed for Asa6 and Atp6 subunits in the isolated mitochondria of *Polytomella* sp.

We purified mitochondria from exponential growing cultures and exposed them to *in vitro* synthesized and radioactively tagged proteins. Reactions were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis and their autoradiographies were obtained. The subunits were used to search homologous sequences and to analyse hydrophobic patterns to propose the topology and the import pathway followed in their way to the mitochondrial inner membrane.

The Asa6 and Atp6 subunits were imported into the mitochondrion in an energy dependent manner, and their import was followed by the loss of a molecular mass portion equivalent to their mitochondrial targeting sequence. Their assembly into dimeric complexes was not observed in this work. We found that Atp6 probably has an atypical topology deduced from the very low hydrophobicity in its first transmembrane span conserved in several groups. This change is well explained with the biogenic pathway proposed for this nuclear encoded protein. We also propose that Asa6 allows this topology because it was found only in those groups where Atp6 lacks a transmembrane segment.

ABREVIATURAS

Asa – Proteína asociada a la ATP sintasa

ATP – Trifosfato de adenosina

AVO – Antimicina, valinomicina y oligomicina

BN-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

EIM – Espacio intermembranal

MIA – Maquinaria de ensamble del espacio intermembrana mitocondrial

MIM – Membrana interna mitocondrial

MIM-1 – Complejo de importación mitocondrial

MM – Matriz mitocondrial

MPP – Proteasa de procesamiento mitocondrial

MTS – Secuencia de localización mitocondrial

Oct1 – Octapeptidil aminopeptidasa

PAM – Motor asociado a la translocasa de presecuencias

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PK – Proteinasa K

PX – Proteínasa K y termolisina

SAM – Maquinaria de ensamble y entrega

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

TIM – Translocasa de la membrana mitocondrial interna

TOM – Translocasa de la membrana mitocondrial externa

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos que participan en distintos procesos relacionados con la función celular, como la producción de energía, la arquitectura organelar, el control metabólico y la expresión de genes (Ernster y Schatz, 1981). Estos organelos consisten de dos membranas, una externa y una interna, que participan en procesos como el movimiento por los microtúbulos del citoesqueleto, la fusión y fisión mitocondrial, la interacción con el retículo endoplásmico, la importación de proteínas y la fosforilación oxidativa. Además, contienen dos compartimentos separados por la membrana interna, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, donde se encuentran componentes enzimáticos de distintas vías metabólicas (Nicholls y Ferguson, 2013).

Las mitocondrias se originaron en las células eucariotas (Margulis, 1971) hace aproximadamente 1800 millones de años mediante un evento endosimbiótico. Se piensa que la relación debió llevarse a cabo entre un arqueón y una α -proteobacteria, que eventualmente daría origen a las mitocondrias (Lang, 2014). Desde el inicio del proceso endosimbiótico el contenido genético del endosimbionte comenzó a sufrir un proceso de reducción, debido principalmente a la relocalización de los genes del huésped hacia el núcleo y a la desaparición de genes o funciones redundantes. Estos eventos complejos pueden ser estudiados en la actualidad y sirven como evidencia de dicha teoría (Adams y Palmer, 2003). Los genes de la α -proteobacteria en su mayoría se perdieron, debido probablemente a una alta tasa de mutaciones por el tipo de división del nuevo organelo, aunque también es probable que haya sido por una pérdida de función, reemplazo del gen, o transferencia al núcleo en los tiempos tempranos de evolución del endosimbionte. Esto último presume que los genes del simbiote debieron ser transferidos e integrados en el genoma nuclear y, para que mantuvieran su función, tuvieron que ser activados para expresarse y que sus productos proteicos fueran importados a las mitocondrias (Adams y Palmer, 2003; González Halphen et al., 2003). El resultado de este proceso es que los genomas mitocondriales de diversos linajes están extremadamente reducidos y se encuentran generalmente en un intervalo de entre 15 a 60 kpb

(kilopares de bases), aunque existen ejemplos extremos de cromosomas mitocondriales de 6 y 2000 kpb en el género *Plasmodium* y la familia *Curcubitaceae* respectivamente (Burger et al., 2003). Además de lo anterior, el número de genes mitocondriales codificantes de proteínas es también variable, pudiendo ser desde 3 hasta casi 100 en los géneros *Plasmodium* y *Reclinomonas*, respectivamente (Barbrook et al., 2010).

Las proteínas originalmente presentes en las bacterias que dieron origen a las mitocondrias, modificaron su número y distribución, pudiendo haber desaparecido o bien haber sido relocalizadas o sustituidas. La diversidad de proteínas mitocondriales originales indudablemente sufrió una disminución, producto de la pérdida de genes redundantes durante la evolución de los eucariotas. Sin embargo, durante el proceso de diversificación temprana, un efecto muy interesante ocurrió con los complejos proteicos relacionados con la fosforilación oxidativa y el ribosoma mitocondrial: el número de subunidades que los conforman incrementó de manera gradual, efecto observado al comparar las proteínas mitocondriales con sus ortólogos en α -proteobacterias (Huynen et al., 2013). Aunque estos cambios dieron un nivel de complejidad estructural mayor a los complejos mitocondriales, su función principal permaneció a través del tiempo.

Una vez que los genes mitocondriales fueron recodificados en el núcleo, fue necesario contar con un mecanismo para que las proteínas fueran entregadas específicamente a su compartimento adecuado en la mitocondria. Funciones tan importantes como la producción de energía, la herencia de ADN mitocondrial, el metabolismo de biomoléculas como lípidos o aminoácidos, etcétera, se llevan a cabo gracias a que muchas proteínas codificadas en el núcleo son entregadas correctamente en el compartimento de las mitocondrias. Entender cuáles son los mecanismos por los cuales las proteínas codificadas en el núcleo se dirigen a la mitocondria, podría ayudar a desarrollar terapias para patologías mitocondriales que se presentan cuando una proteína codificada en el genoma mitocondrial no es funcional.

La comprensión de los mecanismos de entrega de las proteínas a los compartimentos mitocondriales, principalmente de aquellas dirigidas a la membrana interna mitocondrial, requiere tener una comprensión de la topología de ésta para poder asignar una ruta posible de biogénesis. En este trabajo se analizan dos subunidades de la ATP sintasa del alga *Polytomella parva*, de las cuales se exploró su ruta de biogénesis y su posible topología en la membrana interna mitocondrial.

Importación de proteínas a la mitocondria

Aproximadamente el 99% de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo (Meisinger et al., 2008), son sintetizadas en ribosomas citoplásmicos e importadas a las mitocondrias (Bolender et al., 2008). La entrega de estas proteínas a los compartimentos mitocondriales correctos depende de la actividad de un conjunto de maquinarias moleculares ancladas a las membranas mitocondriales interna y externa. Esta maquinaria ha evolucionado a partir de sistemas de secreción proteicos presentes en las bacterias que originaron a las mitocondrias, a las que posteriormente les fueron adicionadas subunidades proteicas eucariotas para conformar los distintos sistemas de translocación (Kutik et al., 2009). Los distintos complejos proteicos que realizan la translocación de proteínas han sido estudiados con mucho detalle en levaduras, pero están conservados en humanos y en los grupos eucariotas conocidos.

Se conocen distintas rutas que una proteína destinada a un compartimento mitocondrial puede seguir (Wiedemann et al., 2004). En levaduras se ha descrito el sitio de entrada general para las proteínas a la mitocondria, el cual está formado por el complejo Translocasa de la Membrana Externa (TOM, por sus siglas en inglés de *Translocase of the Outer Membrane*), un complejo que forma un poro por el que la mayoría de las proteínas son translocadas (Melin et al., 2014; Figura 1). Después del paso por este complejo, distintas maquinarias proteicas específicas dirigen a los precursores proteicos a los subcompartimentos mitocondriales (Endo et al., 2011). Por ejemplo, aquellas proteínas destinadas a la membrana externa mitocondrial pueden ser reconocidas por dos sistemas dependiendo de su dominio membranal. Las proteínas con dominios de plegamiento en estructuras de barril beta son integradas a la

membrana externa a través de la Maquinaria de Ensamble y Entrega (SAM, por sus siglas en inglés de *Sorting and Assembly Machinery*; Thornton et al., 2010), auxiliadas por pequeñas chaperonas (Small TIMs (Translocator of Inner Membrane)). Por otra parte, las proteínas que presentan plegamientos en estructura de hélices alfa con uno o varios cruces transmembranales son reconocidas por el complejo TOM e insertadas a la membrana por la Maquinaria de Importación Mitocondrial (MIM, por sus siglas en inglés de *Mitochondrial Import Machinery*; Dimmer et al., 2012).

La mayoría de proteínas que son importadas a la mitocondria presentan una secuencia de localización mitocondrial en el extremo amino (MTS por sus siglas en inglés de *Mitochondrial Targeting Sequence*; Schulz et al., 2015). Esta secuencia es rica en cargas positivas y permite que las proteínas sean dirigidas específicamente a las mitocondrias (Ge et al., 2014). Esta MTS, de entre 15 a 30 residuos, es regularmente escindida por peptidasas de procesamiento mitocondrial (MPP, por sus siglas en inglés de *Mitochondrial Processing Peptidase*) que se localizan en la matriz mitocondrial (Gakh et al., 2002). Una vez que los precursores proteicos pasan a través del complejo TOM, éstos son reconocidos por la Translocasa de Presecuencias de la Membrana Interna (TIM23, por sus siglas en inglés de *Translocase Inner Membrane*).

El complejo TIM23 es capaz de entregar proteínas tanto a la membrana interna mitocondrial como a la matriz mitocondrial (Park et al., 2013), además presenta un dominio intermembranal en algunas de sus subunidades que le permiten interactuar con el complejo TOM. TIM23 es un canal sensible al voltaje que utiliza el potencial de membrana para el movimiento electroforético de las proteínas a través de la membrana interna (Marom et al., 2011). Debido a ello, no es raro que se hayan descubierto distintas interacciones estructurales y funcionales de las subunidades que forman a la maquinaria de translocación de proteínas con distintos complejos respiratorios (Kulawiak et al., 2013). Una señal que permite al complejo TIM23 liberar al precursor proteico a la membrana interna mitocondrial es una secuencia

hidrofóbica interna (Stuart, 2002). Esta secuencia interrumpe el paso del precursor a través del complejo de translocación e induce su liberación lateral a la membrana interna mitocondrial.

Las proteínas que son dirigidas a la matriz mitocondrial, se valen del Motor Asociado a la translocasa de Presecuencias (PAM, por sus siglas en inglés de *Presequence translocase-Associated Motor*). Este sistema PAM, contiene proteínas chaperonas de unión a precursores dependiente de ATP (Ting et al., 2014).

Algunas proteínas precursoras mitocondriales que no presentan una presecuencia, sino una secuencia señal interna, se asocian a chaperonas citosólicas en la superficie mitocondrial donde son reconocidas por los receptores del complejo TOM. Este grupo de proteínas son los translocadores de la membrana interna mitocondrial tales como el translocador de fosfatos y el de ADP/ATP. Después del paso por este complejo, las pequeñas chaperonas TIM (Small TIMs) pueden dirigir las hacia el complejo de translocación de acarreadores (TIM22, por sus siglas en inglés de *Translocase Inner Membrane*), desde donde son insertados en la membrana interna mitocondrial (Jensen y Dunn, 2002).

Los precursores que presentan un motivo rico en cisteína, después de pasar por el complejo TOM, son transferidos a la Maquinaria de Ensamble del espacio Intermembrana Mitocondrial (MIA, por sus siglas en inglés de *Mitochondrial Intermembrane space Assembly Machinery*), en donde son oxidadas, lo que permite su plegamiento por la introducción de puentes disulfuro. Luego de una serie de reacciones de óxido-reducción, los electrones son cedidos al citocromo *c* de la cadena respiratoria (Stojanovski et al., 2012).

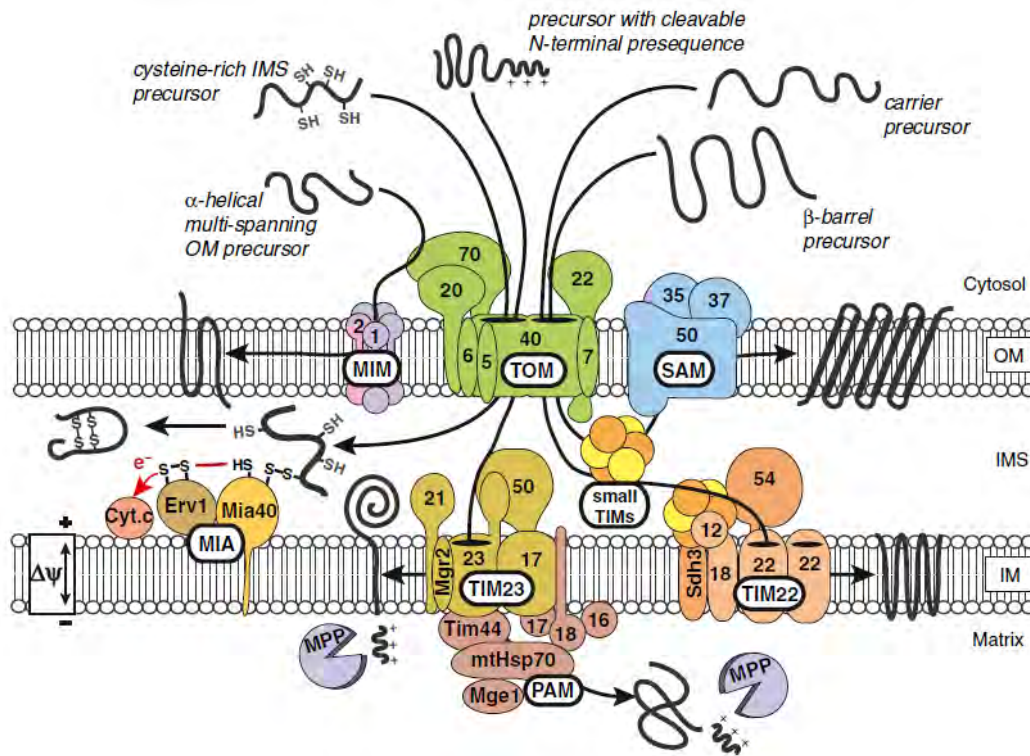


Figura 1. Rutas de importación de precursores de proteínas a los subcompartimentos mitocondriales en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Tomado de Böttinger et al., 2015). Ver detalles en el texto.

La gran cantidad de proteínas que son distribuidas a los distintos compartimentos mitocondriales, son dirigidas por el sistema de importación de proteínas. Recientemente comienza a entenderse cómo es que este sistema es regulado para permitir que la multitud de proteínas involucradas en las distintas vías metabólicas de este organelo puedan acoplarse a la función celular. Por lo anterior, el sistema de translocación de proteínas a la mitocondria podría ser un blanco importante para entender la compleja red de señalización que modula la actividad mitocondrial y el metabolismo celular (Opalinska y Meisinger, 2015).

En plantas, en un análisis *in silico* de los componentes proteicos de la maquinaria de importación descrita para levaduras (Carrie et al., 2010) se encontró que, si bien los componentes centrales de los complejos están conservados, algunas subunidades como las receptoras del complejo TOM no tiene equivalentes

en la levadura. Los autores argumentan que las diferencias en los receptores pueden deberse a la selectividad que deben tener éstos para discriminar a las presecuencias mitocondriales de las plastídicas. En algas clorofíceas, también mediante análisis bioinformáticos, se describió la presencia de las subunidades que conforman a los complejos de translocación de proteínas (Figuroa-Martínez et al., 2008). Estos complejos se encuentran conservados en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, salvo algunas subunidades como Tom70, Mim1, Mas37, Tim12, Tim21, Pam17, Tim54 y Tim18, comparado con los componentes de levadura y Arabidopsis (Figura 2). Considerando la relación filogenética cercana entre los géneros *Chlamydomonas* y *Polytomella*, inferimos que ambos comparten los sistemas de importación predichos para el primero.

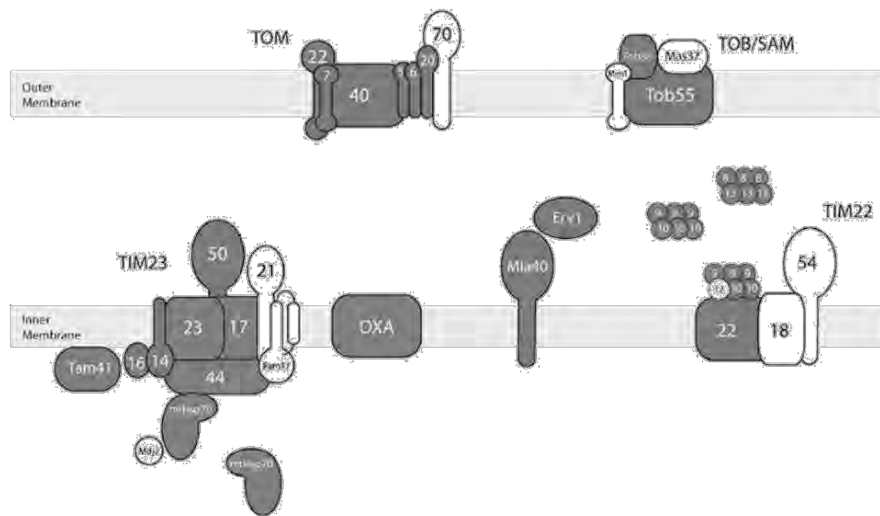


Figura 2. Homólogos de la maquinaria de importación mitocondrial en *C. reinhardtii*. Tomado de Figuroa-Martínez et al., 2008. Los componentes identificados en la levadura y presentes también en el alga se muestran en gris.

Importación de proteínas a las mitocondrias de *Polytomella*

La importación de proteínas ha sido un tema muy estudiado en levaduras, sin embargo, algunos otros organismos han comenzado a servir como modelo para entender cómo es la internalización de proteínas en las mitocondrias. *Polytomella* sp. ha sido utilizada para estudiar la biogénesis de la subunidad Cox2,

que en algas clorofíceas es el producto de dos genes independientes que dan lugar a las subunidades Cox2a y Cox2b (Rodríguez-Salinas et al., 2012).

En el trabajo de Jiménez-Suárez et al. (2012), se determinó que las subunidades Cox2a y Cox2b se importan en las mitocondrias de *Polytomella* sp., siguiendo dos vías diferentes. La de Cox2a, que es el péptido que contiene dos cruces transmembranales, requiere de la presencia del gradiente electroquímico, probablemente para permitir el paso del primer cruce transmembranal hasta la matriz mitocondrial en donde la proteína es editada proteolíticamente removiéndose su MTS. Se argumenta que el segundo cruce transmembranal podría liberarse de manera lateral, y finalmente el extremo amino sería insertado a la membrana interna por un sistema de translocación distinto. En el caso de Cox2b, la vía de importación no requiere de la presencia del gradiente electroquímico, evidenciado por un ensayo de protección a proteasas en presencia de una mezcla de inhibidores. Esta proteína tampoco es procesada proteolíticamente. Además, gracias al análisis de estructuras cristalográficas de la subunidad Cox2 de bovino y de alineamientos de secuencias, se infirió que la subunidad Cox2b es el equivalente del dominio soluble que se expone hacia el espacio intermembranal (Pérez-Martínez et al., 2001), por lo que los escasos requerimientos energéticos encontrados se ajustan con la ruta de biogénesis propuesta para este péptido.

Por otra parte, la subunidad Cox3 del complejo IV respiratorio en las algas clorofíceas se encuentra codificada en el genoma nuclear (Pérez-Martínez et al., 2002) y su MTS mostró una edición proteolítica bipartita. La primera parte de esta MTS parece funcionar como señal de dirección a la mitocondria y la segunda permite su inserción en la membrana interna mitocondrial (Vázquez-Acevedo et al., 2014). En este caso, a diferencia de lo que ocurre con las subunidades Cox2a y Cox2b, se pudo demostrar la incorporación de la subunidad Cox3 en el complejo IV respiratorio mediante geles de segunda dimensión. Este resultado es importante porque la vía propuesta de biogénesis resulta tanto en la importación como en el ensamblado de la subunidad al complejo.

Algunos reportes han indicado que el utilizar la secuencia de localización mitocondrial (MTS) de subunidades naturalmente nucleares, como la de la subunidad “a” de *Chlamydomonas reinhardtii*, fusionada a proteínas codificadas en el genoma mitocondrial, permitiría dirigirlas a dicho organelo en los casos en que las versiones mitocondriales naturales hayan dejado de ser funcionales debido a mutaciones deletéreas (Ojaimi et al., 2002; Figueroa-Martínez et al., 2011). Este enfoque de expresión alotópica podría ser eventualmente utilizado como terapia en el tratamiento de patologías mitocondriales (Manfredi et al., 2002; Dunn y Pinkert, 2011).

Se han realizado experimentos en los cuales se diseñan quimeras proteicas entre una presecuencia de localización mitocondrial típica y proteínas componentes de algún complejo respiratorio, para estudiar cómo se dirigen desde el citosol a las mitocondrias. Para esto, proteínas típicamente codificadas en la mitocondria son recodificadas para su expresión desde el genoma nuclear. En el laboratorio se han ensayado construcciones quiméricas en las que la MTS de la subunidad Atp6 de *C. reinhardtii*, codificada de manera natural en el genoma nuclear (Funes et al., 2002) se fusionó con el extremo amino a la secuencia de Atp6 humana (Figueroa-Martínez et al., 2011). Sin embargo, dicha construcción sólo permitió observar una co-localización de la proteína con las mitocondrias, es decir, no fue posible afirmar que las proteínas fueron incorporadas a la mitocondria, ni se recuperó la síntesis de ATP en líneas celulares con la mutación T8993G en el gen Atp6 mitocondrial.

La ATP sintasa de Polytomella

El Complejo V (o ATP sintasa, de aproximadamente 600 kDa en bovino y levadura) forma dímeros y oligómeros en las crestas mitocondriales y se asocia con acarreadores de nucleótidos de adenina y de fosfato, conocidos en conjunto como ATP sintasomas (Dabbeni-Sala et al., 2012).

La ATP sintasa humana se encuentra organizada en dos sectores: F₁ y F_O (Figura 3). El sector F₁, cuyas subunidades se nombraron con letras griegas, se encuentra conformado por un trímero de dímeros de subunidades α y β donde se lleva a cabo la función catalítica de la enzima, un eje central formado por las

subunidades γ , δ y ϵ , y que transmite la energía de rotación hacia la región catalítica. El sector F_0 , cuyas subunidades se nombran con letras latinas, consiste de un anillo formado por ocho copias de subunidades c , que transforma la energía del gradiente electroquímico en movimiento rotatorio, y una copia de la subunidad a , que forma dos hemicanales por los que entran y salen los protones de un lado a otro de la membrana. También existen las subunidades b , d , e , f , g , $A6L$, $F6$ y $OSCP$, que forman un brazo periférico que mantiene unidos ambos sectores del complejo y que también participa en la dimerización de la enzima (Jonckheere et al., 2012).

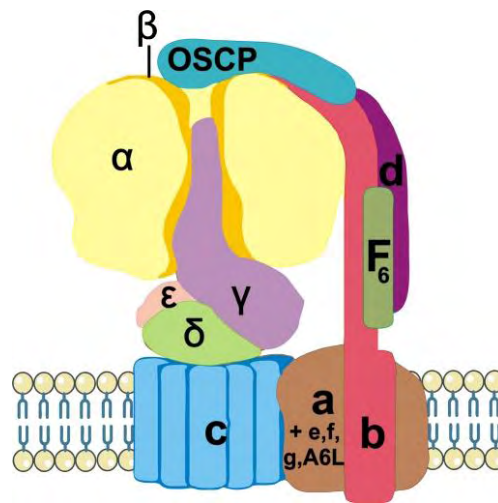


Figura 3. Esquema de la composición y arquitectura de la ATP sintasa humana. Tomado de Jonckheere et al. (2012).

En algas clorofíceas el dímero de ATP sintasa tiene un peso molecular mucho mayor al reportado para levaduras, mamíferos y plantas, ya que es de aproximadamente 1600 kDa (van Lis et al., 2005). Se trata de un dímero que es altamente estable (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

La búsqueda de los genes correspondientes a las subunidades de la ATP sintasa, mostró que *C. reinhardtii* contiene sólo siete homólogos del complejo de *Arabidopsis*, que corresponden a las subunidades ATP5, ATP6, ATP9, α , β , γ y δ (Cardol et al., 2005). Nueve proteínas adicionales fueron identificadas como componentes estructurales del brazo periférico de la ATP sintasa de *C. reinhardtii* y de *Polytomella* sp., y nombradas subunidades ASA 1 a 9 (por sus siglas en inglés de *ATP Synthase-Associated protein*; Vázquez-Acevedo et al., 2006). Las subunidades Asa se han encontrado sólo en el grupo de las algas

clorofíceas, aunque probablemente éstas hayan aparecido gradualmente previo a la divergencia de este grupo (Lapaille et al., 2010). Además, la obtención de la secuencia amino terminal de las subunidades Asa por degradación de Edman (Figura 4) permitió hacer una búsqueda en los marcos de lectura abiertos para encontrar las secuencias de las proteínas en el transcriptoma de diversas algas clorofíceas.

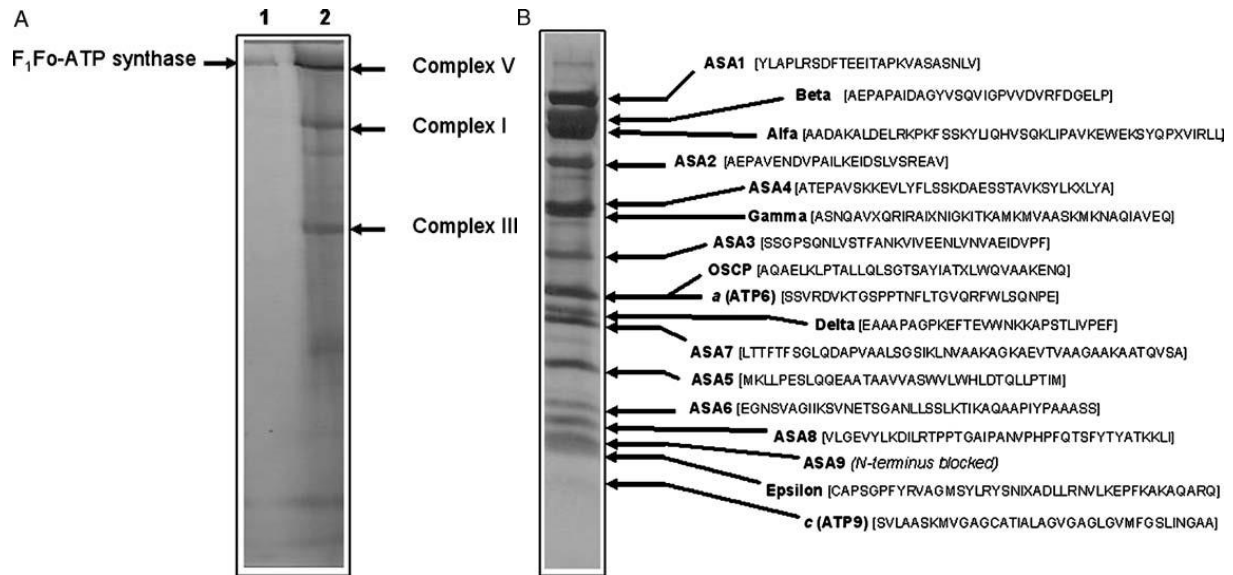


Figura 4. Patrón electroforético teñido con Azul de Coomassie de las ATP sintasas purificadas de *Polytomella* sp. En A) se muestra el patrón electroforético de un gel azul nativo con la ATP sintasa obtenida de gradientes de glicerol (1) y la fracción de proteínas mitocondriales (2) de la propia alga incolora. En B) se muestra el patrón electroforético de un gel desnaturalizante con SDS con las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. y las secuencias amino terminales de las subunidades que constituyen al complejo (Tomado de Vázquez-Acevedo et al., 2006).

Se ha hecho un esfuerzo por conocer cómo es que las proteínas Asa pudieron sustituir al conjunto canónico complejo de proteínas de la ATP sintasa, ya que no se han encontrado proteínas homólogas o que compartan algún ancestro con las subunidades Asa en otros organismos. Algunos trabajos (Cano-Estrada et al., 2010; Miranda-Astudillo et al., 2014) se han enfocado en conocer las interacciones que establecen las subunidades Asa en el complejo intacto o en subcomplejos del mismo.

Al realizar un análisis de predicción de estructura secundaria y de cruces transmembranales de las nueve subunidades Asa de *Polytomella parva* con distintos servidores (CCTOP, HMMTOP, Octopus, Phobius;

Dobson et al, 2014), se predijeron tres posibles proteínas de membrana. Asa6 presenta al menos un cruce transmembranal, aunque posiblemente sean dos, mientras que Asa8 y Asa9 presentan sólo un cruce transmembranal. El resto de las subunidades (Asa1, Asa2, Asa3, Asa4, Asa5 y Asa7) parecen ser proteínas muy hidrofílicas que se encuentran expuestas hacia la matriz mitocondrial y que forman el brazo periférico de la ATP sintasa.

También se han podido identificar aquellas subunidades Asa que presentan un segmento en el extremo amino que funciona como señal de localización mitocondrial, y que posteriormente es eliminado de la proteína por proteasas mitocondriales (Asa1, Asa2, Asa3, Asa4, Asa6 y Asa7).

Un modelo de la topología de las distintas subunidades que conforman al complejo ATP sintasa de *P. parva* se puede apreciar en la Figura 5A (Vázquez-Acevedo et al., 2016). En este modelo las subunidades Asa se encargan de formar una estructura robusta que estabiliza al estator y al rotor, los que están formados por subunidades conservadas en casi todos los organismos (Cano-Estrada et al., 2010). Resultados obtenidos por criomicroscopía electrónica (Allegretti et al., 2015) corroboraron que las subunidades conservadas forman una estructura similar a la encontrada en levadura, bovino y bacterias, y una región altamente electrodensa que es formada por las subunidades Asa en el brazo periférico del nanomotor (Figura 5B).

Las subunidades conservadas en la ATP sintasa de *Polytomella parva* se encargan de la función característica de este complejo mitocondrial, esto es, acoplan el potencial electroquímico generado por los complejos respiratorios con la síntesis de ATP. Las subunidades solubles se encuentran formando el dominio catalítico (α , β y OSCP) y el tallo rotatorio (γ , δ , ϵ), mientras que las subunidades membranales se encuentran formando el canal de translocación de protones (subunidad *a*) y el anillo oligomérico membranal (formado por subunidades *c*) que transduce la energía liberada del gradiente electroquímico en la rotación, dando lugar a los cambios conformacionales en el dominio catalítico que permiten la síntesis de ATP.

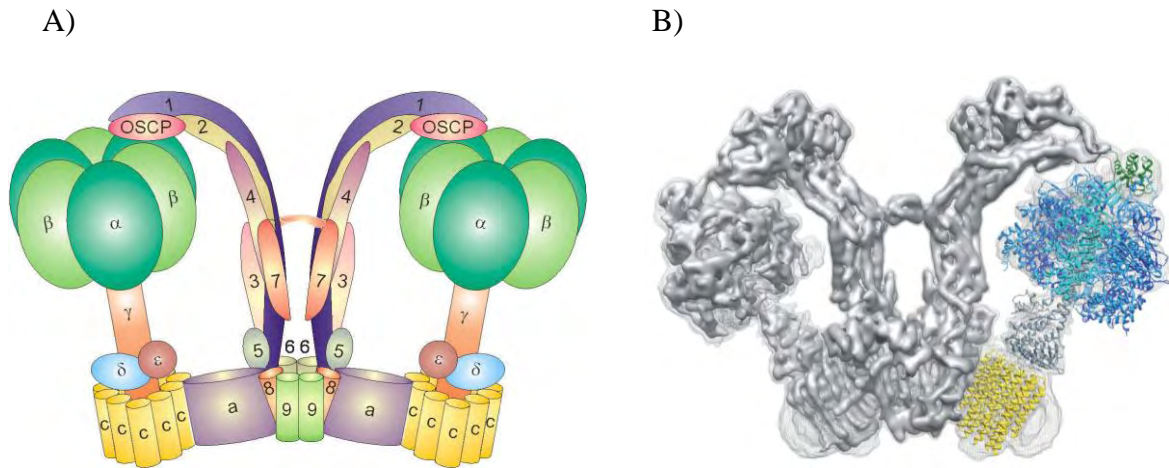


Figura 5. Modelo tridimensional del complejo V mitocondrial dimérico de *Polytomella* sp. A) Modelo topológico que muestra las interacciones de las subunidades de la ATP sintasa, los números corresponden al número de la subunidad Asa, y las letras a las subunidades conservadas (Tomado de Vázquez-Acevedo et al., 2016). B) Estructura de alta resolución obtenida por criomicroscopía electrónica, las subunidades del dominio catalítico (azul y cian) y del dominio rotatorio (amarillo y gris) se modelaron a partir de estructuras cristalográficas (Tomado de Allegretti et al., 2015).

Cuando se dilucidó la estructura de la ATP sintasa de levadura (Stock et al., 1999) se obtuvieron detalles estructurales acerca de las subunidades del dominio catalítico y su asociación con el oligómero de subunidades *c*. La subunidad *a* por su parte, se resolvió recientemente en complejos diméricos de ATP sintasa de *Polytomella* sp. como una proteína con alfa hélices horizontales al plano de la membrana interna mitocondrial (Figura 6A, Allegretti et al., 2015). La topología de esta proteína permitió entender cómo es que los protones pasan a través del complejo ATP sintasa y se acoplan a la síntesis de ATP. Esta subunidad se encuentra conservada en las F_1F_0 -ATP sintasa, por lo que no fue extraño encontrar esta estructura conservada en la enzima de otros organismos filogenéticamente distantes como lo es *Bos taurus* (Figura 6B; Zhou et al., 2015).

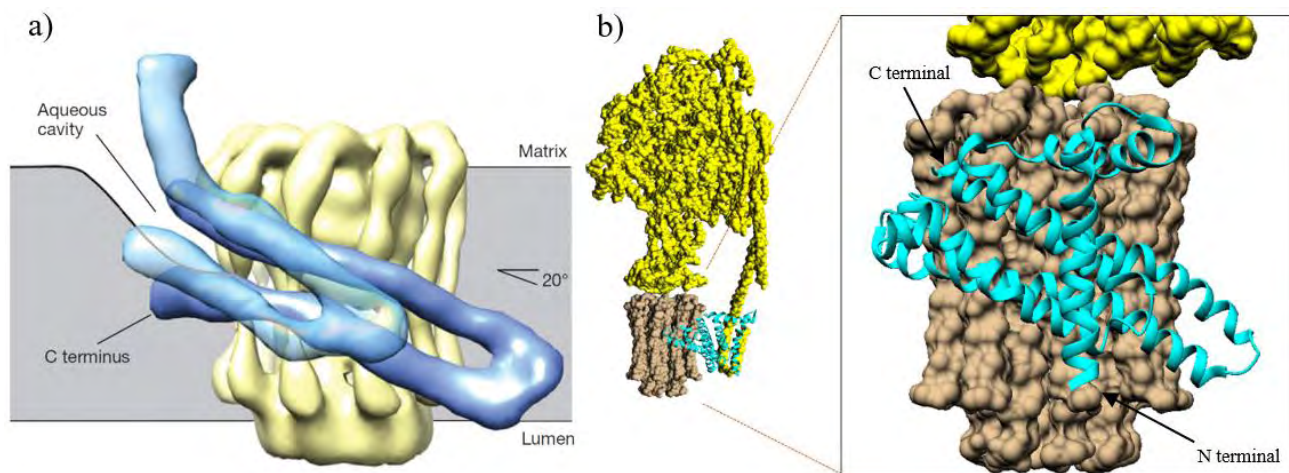


Figura 6. Topología de la subunidad Atp6 en el complejo ATP sintasa. a) Región membranar de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. en la que se muestran las hélices horizontales de la subunidad Atp6 en azul y el oligómero de subunidad c en amarillo, además se indica el hemicanal con que se forma una cavidad acuosa a través de la cual salen los protones en su paso a través del complejo (tomado de Allegretti et al., 2015). b) Estructura de la ATP sintasa de bovino (PDB 5ARA; Zhou et al., 2015) en la que se aprecia en color cian la subunidad a y en café el oligómero de subunidades c.

La subunidad “a” de *Polytomella* y de bovino tienen estructuras y funciones conservadas, aunque los genes que codifican para estas proteínas se encuentran en compartimentos distintos. Mientras que en levaduras, mamíferos y plantas, al menos dos subunidades de la ATP sintasa son codificadas en el genoma mitocondrial (las subunidades a y c), las subunidades en algunas algas clorofíceas están codificadas en el genoma nuclear (Vázquez-Acevedo et al., 2006; Lapaille et al., 2010).

En *C. reinhardtii* el gen de la subunidad a (*Atp6*), después de haber sido transferido al genoma nuclear y cambiado su uso de codones, adquirió una secuencia codificante para un péptido señal en el extremo amino, lo que permitió que la proteína se dirija a la mitocondria (Funes et al., 2002). El grupo de las algas clorofíceas es el único grupo taxonómico conocido en el que la subunidad a se encuentra codificada en el núcleo (Funes et al., 2002; Ojaimi et al., 2002). Por lo anterior, la secuencia peptídica de la subunidad Atp6 es editada posterior a su ingreso a la mitocondria, eliminándose así un segmento de 107 residuos para dar lugar a la proteína madura. La subunidad a de *P. parva* tiene una estructura primaria con una

similitud alta con la de *C. reinhardtii* (Figura 7) y posee una MTS de 94 residuos. Además, es notable que existe un conjunto de aminoácidos altamente conservados en el extremo C-terminal de las secuencias de clorofíceas que alinean muy bien con la secuencia de bovino, y que corresponden al dominio que forma los hemicanales y que interaccionan con el anillo de subunidades *c*.

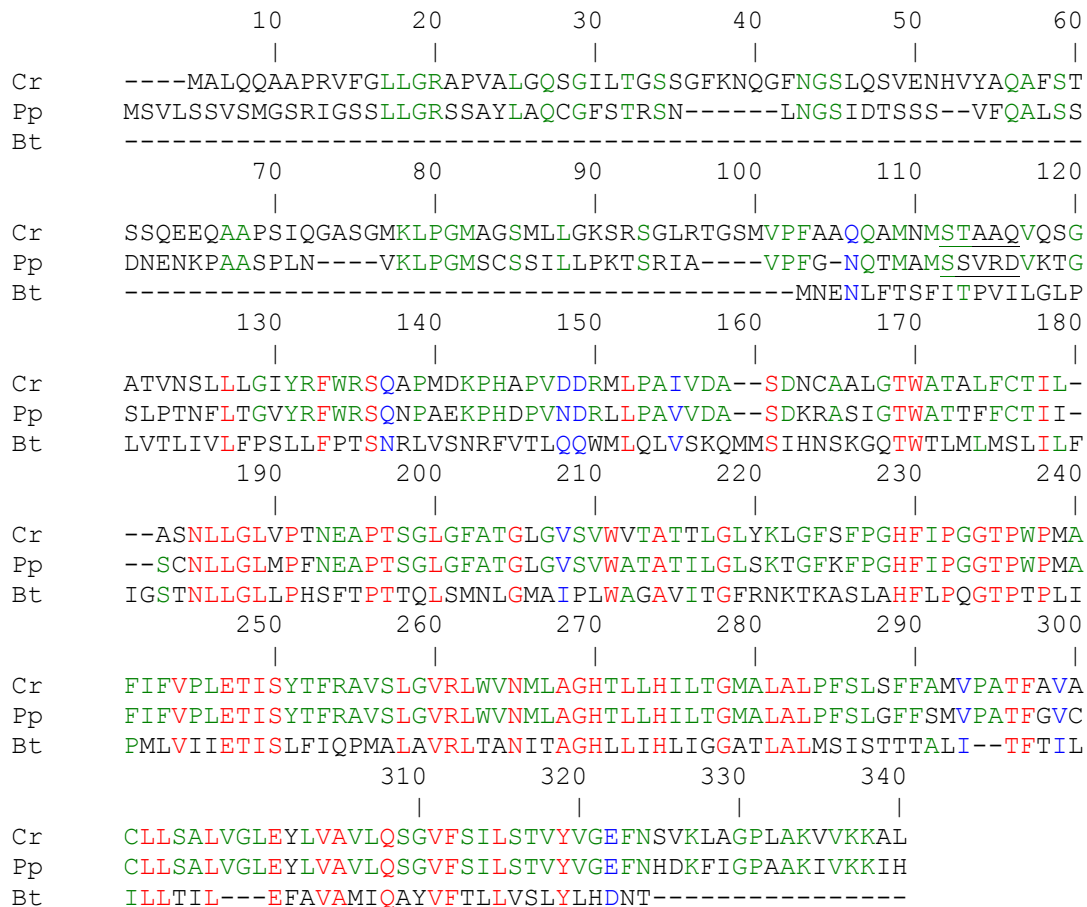


Figura 7. Alineamiento de las secuencias polipeptídicas de la subunidad *a* de *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr; XP_001689492.1), *Polytomella parva* (Pp; CBK55668.1) y *Bos taurus* (Bt; YP_209210.1). El inicio de la proteína madura se indica con las letras subrayadas de las secuencias de Cr y Pp. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW (Thompson et al., 1994).

La ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas es un complejo que se ensambla completamente a partir de subunidades codificadas en el genoma nuclear. Su estudio ofrece una oportunidad valiosa para conocer un mecanismo único de ensamblado de una ATP sintasa en eucariotas. En este trabajo los requerimientos posibles para la correcta importación de proteínas (como su dependencia por el gradiente electroquímico, la presencia de motivos en las secuencias y de características fisicoquímicas de las

proteínas) se analizaron en el alga incolora *Polytomella* sp. mediante enfoques distintos, utilizando como base dos proteínas del complejo V mitocondrial.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la importación *in vitro* de las subunidades Atp6 y Asa6 de la ATP sintasa a las mitocondrias del alga *Polytomella* sp.

Objetivos particulares

- Clonar los genes que codifican a los precursores de las subunidades Atp6 y Asa6 del alga *Polytomella* sp., en un plásmido que permita la síntesis de las proteínas *in vitro*.
- Sintetizar *in vitro* las proteínas Atp6 y Asa6 con una marca radiactiva de metionina [³⁵S].
- Aislar mitocondrias del alga *Polytomella* sp., que presenten control respiratorio, capacidad de formar un gradiente electroquímico transmembranal y de realizar la importación de proteínas.
- Llevar a cabo ensayos de importación *in vitro* de las proteínas mencionadas, estudiando el efecto de proteasas e inhibidores de la fosforilación oxidativa.

HIPÓTESIS

Las proteínas Asa6 y Atp6 son importadas *in vitro* a las mitocondrias aisladas de *P. parva* de una manera dependiente del gradiente electroquímico. La presecuencia de localización mitocondrial que presenta cada proteína es editada posterior a la importación de éstas y son seguidas de su ensamblado en un complejo ATP sintasa dimérico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación de los genes asa6 y atp6

Las moléculas de cDNA codificantes para las subunidades Asa6 y Atp6, se obtuvieron mediante amplificación por PCR a partir de una genoteca de cDNA. Los cebadores de ADN utilizados para la amplificación de los cDNAs correspondientes del alga incolora *Polytomella* sp. se diseñaron con sitios de restricción en cada extremo de las secuencias para su manipulación (oligonucleótido Forward Atp6 (Sall) 5'-GCG TCG ACC ATG TCT GTT CTA AGC AGT GTG-3' y oligonucleótido Reverse Atp6 (BamHI) 5'-CGC GGA TCC TTA ATG GAT CTT CTT AAC AAT-3', oligonucleótido Forward Asa6 (HindIII) 5'-GCC AAG CTT ATG ATG CTC AGG ACT CTT ACT-3' y oligonucleótido Reverse Asa6 (BamHI) 5'-CGC GGA TCC TTA AAG GCT GAT GGA GCT GAA-3').

La mezcla de reacción contiene 2 µl de dNTPs (10 mM), 5 µl de amortiguador 10x (600 mM Tris-HCl, 60 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 20 mM MgSO₄, pH 8.3), 2 µl de oligonucleótidos cebadores (200 µg/µl), 0.5 µl de Taq polimerasa (2.5 U/µl; Acuzzyme, BolineTM), 3 µl de la genoteca de cDNA de *Polytomella* sp. (Atteia et al., 2005) y 37.5 µl de H₂O Milli Q. La reacción de polimerización fue antecedida con un periodo de desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, antes de la adición de la enzima. El proceso comenzó con tres ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, alineamiento a 45°C durante dos minutos y extensión a 72°C durante dos minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, alineamiento a 65°C durante dos minutos y extensión a 72°C durante dos minutos. El último ciclo tuvo una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa (agarosa 0.8 %, Tris-Acetato 4 mM y EDTA-Na₂ 2 mM) en presencia de 1 µl de bromuro de etidio (BrEt 1%) durante la electroforesis a 75 volts con amortiguador Tris-acetato (4 mM)- EDTA-Na₂ (2 mM). La banda correspondiente al gen amplificado se cortó con una navaja en un transiluminador UV y el ADN fue purificado con el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) en un volumen final de 20 µl de agua libre de nucleasas. El ADN

se sometió a un ciclo de adenilación, en el que 20 μ l de ADN purificado se mezclaron con 3 μ l de amortiguador 10x (Tris-acetato 330 mM pH 8.3, acetato de potasio 625 mM, acetato de magnesio 100 mM, espermidina 40 mM, ditiotreititol 5 mM), 0.9 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 0.6 μ l de dATP (10 mM), 0.5 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l), y 5 μ l de H_2O Milli Q, a 70 °C durante 30 minutos. Después de purificar el ADN adenilado (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), se cuantificó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Se adecuó la relación molar inserto:vector a 3:1, utilizando 1 μ l del plásmido pGEM T-Easy (50 μ g/ μ l; Promega). La reacción de ligación contuvo 1 μ l de T4 DNA ligasa (400 U/ μ l; New England Biolabs), 10 μ l de amortiguador 10x de ligación (Tris-HCl 500 mM, $MgCl_2$ 100 mM, ATP 10 mM, DTT 100 mM, pH 7.5), y H_2O Milli Q hasta un volumen final de 20 μ l de reacción y las mezclas se mantuvieron toda la noche a 4 °C.

El producto de la ligación se utilizó para la transformación genética de bacterias competentes *Escherichia coli* XL1-Blue. En un tubo de reacción se mezclaron 50 μ l de células competentes, 15 μ l de la mezcla de ligación y 50 μ l de solución KCM (KCl 100 mM, $CaCl_2$ 30 mM, $MgCl_2$ 50 mM), se incubaron en hielo durante 30 minutos y luego a 42 °C durante dos minutos. Después, en hielo, se les adicionó 1 ml de medio LB (Bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Las células transformadas fueron sembradas en cajas Petri conteniendo medio LB- agar 2 %, ampicilina 0.1 mg/ml, IPTG 1.9 mg, X-Gal 0.5 mg, y se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37 °C. Las colonias transformadas se eligieron mediante la discriminación de colonias azules, estriando en cajas nuevas con medio LB-agar-ampicilina. Después de un día de incubación a 37°C se corroboró la presencia de ADN plasmídico utilizando el método de precipitación con etanol (Sambrook et al., 1989). Se extrajeron las bacterias crecidas en la caja Petri anterior utilizando un palillo de dientes estéril y se resuspendieron en 200 μ l de Tris (2M) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se adicionaron 5 μ l de RNasa (10 mg/ml) y 200 μ l de una disolución NaOH (1M), SDS (10%). Después de agitar por inversión cuatro

veces se adicionaron 200 μ l de solución de acetato de potasio (1.32M, pH 5.2). La mezcla se centrifugó a 14000 rpm en una microcentrífuga (*Eppendorf Centrifuge 5424*, Thermo Fisher Scientific) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se vertió en un tubo Eppendorf conteniendo 500 μ l de isopropanol (100%) frío y la mezcla se centrifugó a la misma velocidad durante 10 minutos. Enseguida se desechó el sobrenadante y el ADN precipitado se lavó adicionando 1 ml de etanol 70% al tubo, se centrifugó durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Para eliminar el etanol restante en el tubo, éste se incubó durante 15 minutos a 65°C, posteriormente se dejó enfriar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN plasmídico se resuspendió en 30 μ l de agua bidestilada estéril utilizando un agitador vortex, se centrifugó durante un minuto a máxima velocidad y se transfirió a un tubo limpio. La comprobación de la clonación se realizó mediante una digestión con la enzima EcoRI, con la cual se corroboró la liberación de un fragmento con el tamaño molecular esperado del gen *atp6* o *asa6*.

Se llevó a cabo la subclonación de las secuencias clonadas en el vector pSP64 Poly (A) Vector (Promega) utilizando los sitios de restricción de los cebadores. Una digestión analítica para el plásmido pSP64 (*Asa6*) con las enzimas AflIII y NheI, y para el plásmido pSP64(*Atp6*) con las enzimas NcoI y NheI, permitió recuperar las subclonaciones exitosas. Las colonias seleccionadas se crecieron en 30 ml de medio LB ampicilina, hasta una densidad óptica de 0.6 ($\lambda=650$ nm). A partir de este cultivo se realizaron cinco alícuotas de 800 μ l de cultivo más 300 μ l de glicerol 100 % en criotubos de 1.8 ml y se almacenaron a -80°C. El resto del cultivo se utilizó para la purificación de ADN plasmídico utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. De seis clonas que liberaron el inserto adecuado durante la digestión analítica, dos se enviaron a secuenciación (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular-UNAM) para comparar y corroborar mediante un alineamiento los resultados y las secuencias conocidas de *Atp6* (GenBank FN689527.1) y *Asa6* (GenBank GU112182.1).

Síntesis de proteínas in vitro

El plásmido pSP64 conteniendo al gen clonado, fue utilizado para la síntesis *in vitro* de proteínas marcadas radiactivamente con [³⁵S]Met utilizando el sistema TNT Coupled Wheat Germ Extract System (Promega). De acuerdo con las recomendaciones del proveedor, 1 µg de ADN plasmídico (0.5 µg/µl) se adicionó a una mezcla de 48 µl del sistema acoplado de transcripción-traducción *in vitro* (25 µl de extracto de germinado de trigo, 2 µl de amortiguador de reacción, 1 µl de RNA polimerasa Promotor SP6, 1 µl de mezcla de aminoácidos sin metionina, 1 µl de [³⁵S]Met, 18 µl H₂O estéril). La mezcla de síntesis *in vitro* se incubó durante dos horas a 30°C. Transcurrido el tiempo se adicionó RNasa a una concentración final de 0.2 mg/ml, se incubó a la misma temperatura durante 5 minutos y enseguida se transfirió a hielo.

Obtención de mitocondrias

Precultivos de *Polytomella* sp. en fase de crecimiento exponencial fueron inoculados en un matraz de fondo ancho de 2.5 litros de capacidad, conteniendo 2 litros de medio de crecimiento (acetato de sodio 4 g/l, MES 7.8 g/l, 1ml/l de fosfato de potasio (1M pH 7.0), 10 ml/l de solución de Beijerincks (NH₄Cl 40 g/l, CaCl₂ 5 g/l, MgSO₄ 6.5 g/l), 1 ml/l de solución de elementos traza (CuSO₄ 0.5 mg/l, H₃BO₃ 40 mg/l, KI 0.1 g/l, FeCl 6H₂O 0.2 g/l, MnSO₄ 2H₂O 0.4 g/l, NaMoO₄ 2H₂O 0.2 g/l, ZnSO₄ 0.4 g/l), después de esterilizar mediante autoclave se adicionaron 100 µl/l de una solución de vitaminas (tiamina 0.2 mg/ml, cianocobalamina 0.01 mg/ml)). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 horas sin agitación y fueron cosechados por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5B (rotor F14-6x250y).

Las mitocondrias fueron purificadas como se describe en Jiménez (2011). La pastilla de células fue resuspendida en amortiguador sorbitol-manitol (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, ácido TRIS-maleico 10 mM, albúmina de suero de bovino deslipidada 0.1 %, pH 6.8) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos en el mismo rotor que utilizó para la cosecha de las células. La pastilla se resuspendió con un pincel en

el mismo amortiguador (2 ml amortiguador/g pastilla) con la adición de PMSF 1 mM y EDTA 1 mM (pH 8.1). Para romper mecánicamente las células se utilizó un homogeneizador Dounce de 7 ml, haciendo pasar el pistilo 3 veces, y manteniendo el sistema sobre una cama de hielo. El lisado celular se sometió a una centrifugación diferencial a 4 °C durante 10 minutos a 1500 rpm utilizando el rotor F21s-8x50, en la misma centrífuga, enseguida el sobrenadante se sometió a 10 minutos de centrifugación a 12000 rpm en el mismo rotor. A continuación, la pastilla se resuspendió en 100 µl de amortiguador sorbitol-manitol sin albúmina utilizando un pincel de cerdas finas.

La concentración de proteínas mitocondriales fue cuantificada mediante el método de Biuret (Gornall et al., 1949). Una fracción de 25 µl de mitocondrias aisladas se mezcló con 125 µl de desoxicolato de sodio (5 %), y reactivo de Biuret a un volumen final de 2.5 ml. Quince minutos después de incubar a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 540 nm.

Importación de proteínas a las mitocondrias

Las reacciones de importación se llevaron a cabo en un amortiguador de transporte (sorbitol 0.375 M, manitol 0.2 M, ácido TRIS-maleico 10 mM, BSA 1 mg/ml, fosfato de potasio 10 mM, MgCl₂ 200 µM, metionina 0.75 mg/ml) suplementado con ATP (2 mM), NAD⁺ (2 mM), GTP (2 mM), malato (10 mM), fosfocreatina (10 mM) y fosfocreatina cinasa (25 U). Treinta y siete µl de la reacción de traducción *in vitro* fueron puestas en contacto con la mezcla anterior y 300 µg de proteínas mitocondriales durante 40 minutos a 25 °C, inmediatamente después fueron incubadas en hielo. Una fracción de 125 µl de la mezcla de reacción fue adicionada con proteinasa K (50 µg/ml) en hielo durante 30 minutos y enseguida se adicionó PMSF (1 mM) para inhibir la actividad de la proteasa. Después de este paso, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 14000 rpm en una microcentrífuga (MiniSpin Plus, *Eppendorf*) a 4°C, la pastilla se resuspendió en 500 µl de medio de lavado (sorbitol 0.375 mM, ácido maleico 10 mM, pH 7.2), y se centrifugó de nuevo a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C en el mismo rotor. A la pastilla se le adicionaron 20 µl de amortiguador de carga para geles desnaturizantes de SDS (SDS 10%, glicerol

30% v/v, Tris-HCl 10 mM, azul de bromofenol 0.3%, mercaptoetanol 4%, pH 6.8) y se cargó en un gel de acrilamida al 14 % (SDS-PAGE). Después de la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia semihúmeda (amortiguador del ánodo: ácido ϵ -amino-n-capróico 300 mM, SDS 0.05 %; amortiguador del cátodo: Tris 150 mM, Tricina 50 mM, metanol 20 %) durante 90 minutos a 1 mA/cm² de membrana. Después de secarse, se marcó con un punto de solución de desecho radiactiva aquellas bandas correspondientes al marcador de pesos moleculares. Enseguida la membrana fue expuesta a una pantalla Phosphor-Imager (GE Healthcare) durante al menos 4 horas para la detección de las señales de radiactividad y su imagen fue digitalizada (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare).

Análisis de secuencias

Con las secuencias primarias de las subunidades Atp6 (número de acceso de GenBank: CBK55668) y Asa6 (número de acceso de GenBank: ADE93002) se llevó a cabo un análisis de hidrofobicidad como se describe en el apartado de resultados. Se utilizó el servidor en línea TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y Octopus (<http://octopus.cbr.su.se/>) para realizar predicciones de cruces transmembranales. Los análisis de hidrofobicidad se realizaron considerando la escala obtenida por Botelho et al. (2011) y los promedios y gráficas se llevaron a cabo con el programa Excel (Microsoft 2016).

Las secuencias de la subunidad Atp6 analizadas fueron las de las siguientes especies: *Bos taurus* (YP_209210.1), *Yarrowia lipolytica* (NP_075433.2), *Pichia angusta* (5LQX_Y), *Paracoccus denitrificans* (5DN6_X), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_009313.1), *Hordeum vulgare* (BAV58098.1), *Ulva prolifera* (YP_009183719.1), *Helianthus annuus* (YP_008999577.1), *Arabidopsis thaliana* (NP_085503.1), *Zea mays* 1 (CAA77868.1), *Zea mays* 2 (ACZ65558.1), *Chlorella sorokiniana* (YP_009049975.1), *Tetrademus obliquus* (AAF72060.1), *Bracteacoccus aerius* (YP_009054588.1), *Gonium pectorale* (KXZ48726.1), *Volvox carteri* (XP_002956659.1), *Haematococcus pluvialis* (número

de acceso del transcriptoma NCBI GEO GSE71986), *Dunaliella tertiolecta* (https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/AlgoBLAST/algoBlast_mainpage.php).

Análisis de estructuras

Los mapas de densidad electrónica de estructuras publicadas resueltas por criomicroscopía electrónica de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. (EMD 2852), *Bos taurus* (EMD 3164), *Pichia angusta* (EMD 4100) y *Yarrowia lipolytica* (EMD 8151) fueron analizados con el programa Chimera (UCSF Chimera 1.10.2, University of California).

Búsqueda informática de secuencias en el transcriptoma de Polytomella parva

La base de datos conteniendo las secuencias de transcritos utilizada fue aquella que obtuvo el grupo de David Smith, disponible en <http://camera.calit2.net/> bajo el ID MMETSP0052 (Smith y Lee, 2014). Se utilizaron como secuencias blanco las anotadas en el proteoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* (Atteia et al., 2009). Las bases de datos fueron manipuladas para realizar alineamientos de secuencias mediante los programas Geneious R8.1 (<http://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012) y BioEdit (BioEdit Sequence Alignment Editor; Hall, 1999).

RESULTADOS

Las secuencias de asa6 y atp6 clonadas en el vector pSP64 se acoplan a la síntesis in vitro

Las secuencias codificantes de los precursores de las subunidades Asa6 y Atp6, componentes de la región membranal del estator de la ATP sintasa de *Polytomella parva*, fueron clonadas en el vector pSP64. Este vector tiene al promotor SP6 río arriba de la región en la que se insertó la secuencia amplificada y una región rica en adenina (Poly(A)) que queda río abajo del codón de paro de la secuencia clonada. Estos elementos son utilizados por el sistema de transcripción *in vitro*. Una digestión analítica (Figura 8) y la secuenciación de los plásmidos obtenidos confirmaron la clonación exitosa de cada subunidad.

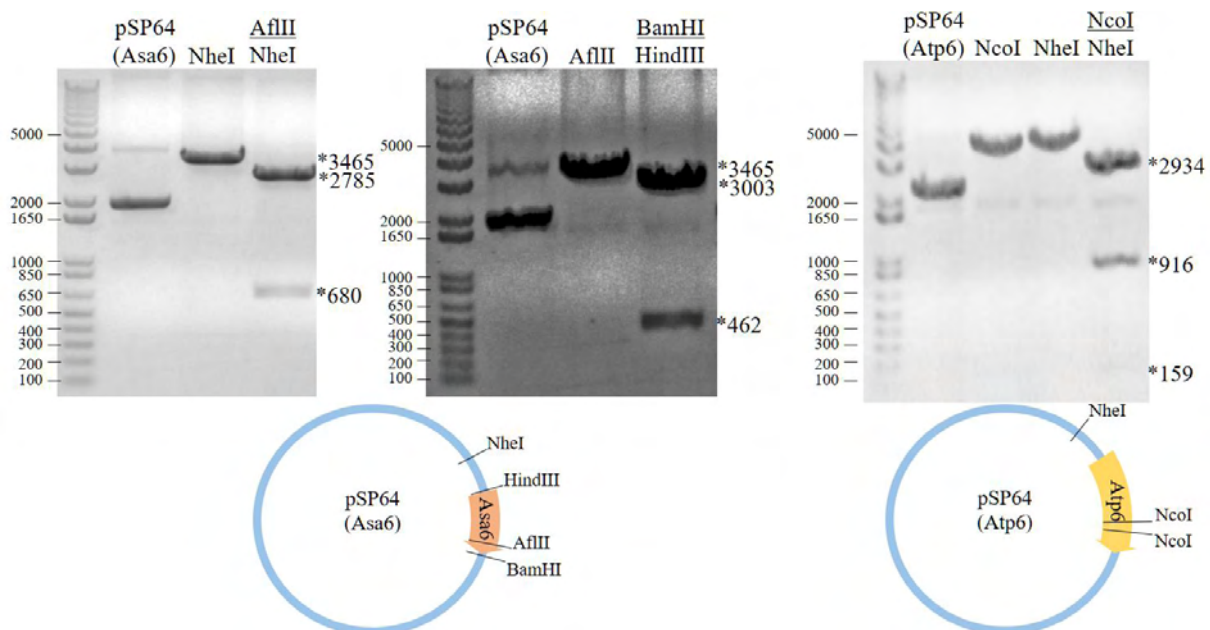


Figura 8. Digestión analítica de los plásmidos pSP64 conteniendo las secuencias codificantes para Asa6 y Atp6 clonados bajo el promotor SP6 (no esquematizado). Las digestiones analíticas se llevaron a cabo con 1 µg de ADN en un volumen final de 12 µl y 20 U de enzima durante dos horas. En los gels se indican los productos de digestión y sus tamaños aparentes.

El sistema acoplado de transcripción y traducción *in vitro* de extracto de germinados de trigo (Promega) fue utilizado para obtener las subunidades Asa6 y Atp6 marcadas radiactivamente con [³⁵S] Met (Figura 9). La síntesis de las proteínas fue corroborada mediante la autorradiografía de una muestra separada en gels de poliacrilamida al 14% (SDS-PAGE) y transferida a una membrana de nitrocelulosa. Las

proteínas obtenidas tuvieron una masa molecular de alrededor de 34 kDa para Atp6 y 15 kDa para Asa6, similar al valor teórico calculado a partir de las secuencias primarias, de 34.77 y 15.89 kDa respectivamente. La proteína luciferasa fue utilizada como control de síntesis, de la cual también se reveló una banda principal de radiactividad con la masa molecular esperada, 61 kDa. En este sistema de síntesis *in vitro* se sintetizan de manera colateral otras bandas con masas moleculares menores. Estas bandas se encuentran en menor cantidad y podrían representar versiones truncas de la síntesis de la misma proteína para cada caso (ver Figura 9).

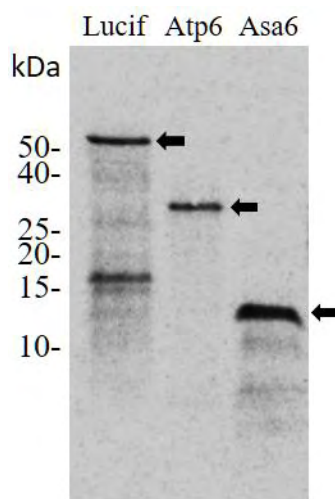


Figura 9. Síntesis *in vitro* de las subunidades Atp6 (34.7 kDa) y Asa6 (15.8 kDa) de *P. parva* marcadas radiactivamente con [³⁵S] Met. La proteína luciferasa (Lucif) es un control de síntesis que contiene el sistema de transcripción y traducción *in vitro* del sistema Promega. Una fracción de 2 μ l de la mezcla de reacción de síntesis fue cargada en un gel de acrilamida al 14% (SDS-PAGE), se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se expuso a una pantalla para el revelado. Las flechas negras indican la banda principal obtenida para la síntesis de cada proteína.

Las mitocondrias aisladas son competentes para la importación de proteínas

La subunidad Cox3 del complejo IV mitocondrial de *P. parva* se importa y ensambla en el complejo respiratorio en presencia del gradiente electroquímico generado por la actividad respiratoria (Vázquez-Acevedo et al., 2014). El protocolo desarrollado en el laboratorio para este ensayo, permite obtener mitocondrias acopladas y competentes para la importación de estas proteínas. Por lo tanto, el utilizar

como control a la proteína Cox3 en un ensayo de importación, da indicios de la calidad de las mitocondrias obtenidas y de su competencia para importar proteínas.

Un ensayo de importación de la subunidad Cox3 se observa en la Figura 10, en la que se muestra que la proteína sintetizada *in vitro* tiene una masa molecular aproximada de 40.6 kDa (carril 2) y es susceptible de degradación cuando se adiciona proteinasa K, esto es que la banda desaparece (carril 1). En el sistema de importación *in vitro* se adicionan mitocondrias competentes en presencia de la proteína marcada radiactivamente. Esto permite a las proteínas ser importadas a las mitocondrias, por lo que se observa una banda nueva de 30 kDa que corresponde a la proteína editada debido a la actividad mitocondrial (carril 3). Esta última banda fue resistente a la degradación por proteinasa K (carril 4), cuya actividad se restringe al medio extra-mitocondrial, por lo que esto arroja evidencia de la internalización de Cox3 en las mitocondrias. Por otra parte, cuando el ensayo se realiza en presencia de una mezcla de inhibidores de la fosforilación oxidativa como antimicina, valinomicina y oligomicina (AVO), las bandas tanto de 40.6 como de 30 kDa disminuyen de intensidad (carril 5), y no se observan cuando se realiza la digestión con la proteinasa K (carril 6). Esto corrobora que la importación de Cox3 a las mitocondrias de *P. parva*, se lleva a cabo de una manera dependiente del gradiente electroquímico.

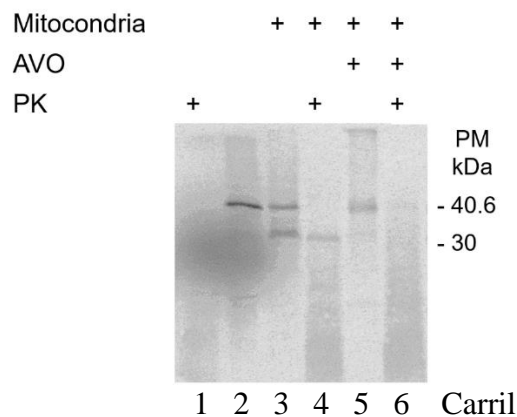


Figura 10. Importación de Cox3 a las mitocondrias de *P. parva*. La adición de los componentes se indica con un símbolo de más (+). Se muestra la autorradiografía de un gel de acrilamida al 14 % (SDS-PAGE). La proteína marcada radiactivamente se muestra en el carril 2 y su degradación por proteinasa K en el carril 1. La importación se muestra en los carriles 3 y 4, y

aquellos en los cuales se adicionaron inhibidores de la fosforilación oxidativa (mezcla AVO) en los carriles 5 y 6.

Con este ensayo confirmamos que la importación de proteínas es viable y que obtuvimos mitocondrias competentes para llevarla a cabo. Las mitocondrias obtenidas mediante este protocolo fueron utilizadas en experimentos para tratar de entender cómo es que la subunidad Asa6 y Atp6 se importan a las mitocondrias del alga *P. parva*. Realizamos ensayos de importación *in vitro* en los que utilizamos las proteínas marcadas radiactivamente para seguir la señal de éstas en su incorporación a las mitocondrias aisladas. El procedimiento de aislamiento de las mitocondrias competentes es el mismo que el descrito en Jiménez-Suárez et al. (2012).

Ensayo de importación in vitro de la subunidad Asa6

La subunidad Asa6 es una proteína con al menos un segmento hidrofóbico, aunque lo más probable es que sean dos, y que conforma el sector de dimerización de la ATP sintasa mitocondrial de *P. parva* en la región membranal. Para evidenciar la importación de esta proteína a las mitocondrias de *P. parva* en un sistema *in vitro*, realizamos experimentos como los descritos para Cox3.

En la Figura 11 se muestra el experimento de importación de Asa6 en el que se utilizaron las condiciones descritas anteriormente. La proteína sintetizada *in vitro* y marcada radiactivamente tiene una masa molecular aproximada de 15 kDa (carril 2) y es susceptible a la degradación por proteinasa K (carril 1). Después de la reacción de importación, en presencia de mitocondrias, obtuvimos una señal de la proteína con una masa molecular menor (13 kDa, flecha en el carril 3) que corresponde con la proteína editada, esto es la eliminación proteolítica de 27 residuos en el N-terminal. Esta banda es resistente a la actividad de la proteinasa K debido a su internalización a las mitocondrias, aunque con una intensidad mucho menor (carril 4). Una explicación a este hecho es que esta proteína (XP_001701878) presenta tres residuos de metionina en su forma precursora, que son los que dan la señal de radiactividad, mientras

que la forma madura presenta sólo uno, además a esto se le podría sumar una tasa de importación de Asa6 baja. Al realizar este experimento en presencia de AVO (carril 5), observamos una ligera disminución de la banda correspondiente a la proteína madura cuando incubamos con proteinasa K (carril 6) además de la desaparición del precursor de Asa6. En este experimento no fue muy claro el efecto de la mezcla de inhibidores de la fosforilación oxidativa sobre la presencia de la forma madura de Asa6, probablemente debido a que el tiempo de incubación de la reacción de importación fue de 40 minutos, en los experimentos siguiente exploramos la acumulación de esta forma de la proteína en distintos intervalos de tiempo. Las bandas que se observan con una masa molecular inferior a las referidas podrían corresponder a formas truncas de la síntesis *in vitro* de Asa6 (ver también Figura 9), o a formas degradadas de la proteína. En los carriles 4 y 6, una señal de radiactividad aparece como producto de la actividad de la proteinasa K con una masa molecular interior a los 6 kDa.

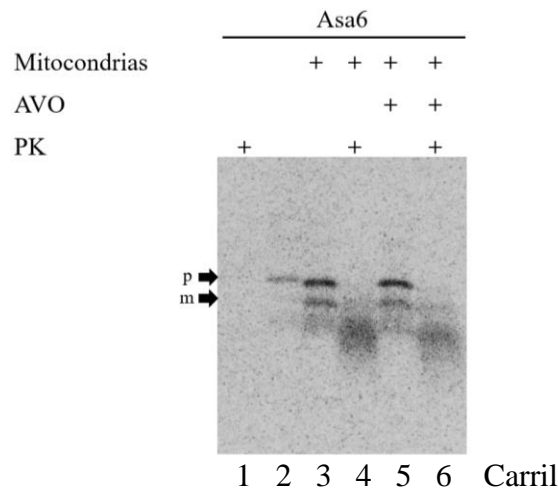


Figura 11. Importación de Asa6 marcada radiactivamente a las mitocondrias de *Polytomella* sp. La adición de los componentes a la reacción de importación se indica con un símbolo de más (+). La imagen es una autorradiografía después de haber separado las proteínas. Se muestra a la proteína marcada radiactivamente (carril 2) con una flecha (p), además de su degradación por proteinasa K (PK, carril 1). La importación se muestra en los carriles a los cuales se le adicionaron mitocondrias además de inhibidores de la fosforilación oxidativa (mezcla AVO). La proteína madura se indica con una flecha (m).

Para discernir si la banda de 13 kDa observada en la Figura 11 (carril 3 y 4) corresponde a la proteína Asa6 madura, realizamos un experimento para analizar la acumulación de las dos formas de la proteína Asa6 a distintos intervalos de tiempo en presencia y ausencia de AVO (Figura 12 a y b). El experimento se realizó entre 0 y 30 minutos, después de los cuales disminuimos la temperatura a 4°C para detener la reacción. Observamos la acumulación de las dos bandas previas (flechas negras en la Figura 12) que corresponden a la masa molecular del precursor de Asa6 de 15.8 kDa y de la forma madura de la proteína con una masa molecular de 13 kDa. Esas mismas bandas fueron resistentes al tratamiento con proteinasa K (Figura 12 a), lo que demuestra que fueron protegidas en algún compartimento mitocondrial, es decir, demuestra su internalización a las mitocondrias y su acumulación significativa en el tiempo. En un experimento paralelo, pero con la adición de la mezcla de inhibidores AVO, la señal de las bandas anteriores disminuyó, siendo la más afectada la de 13 kDa, que corresponde a la proteína madura (Figura 12b). Es interesante que el precursor de Asa6 mantuvo una señal de radiactividad en presencia de AVO y tuvo un efecto de acumulación. Probablemente este resultado se deba a una internalización al espacio intermembrana, ya que a pesar de presentar una acumulación comparable al sistema que no tiene AVO, no presenta una edición proteolítica importante, indicando que esta proteína acumulada no ingresó hasta el compartimento donde se encuentra la enzima que la edita, la matriz mitocondrial. Esta dependencia de la localización de Asa6 con la presencia del gradiente electroquímico, abatido por AVO, indica que uno de los sistemas más probables que permite la llegada de Asa6 a la matriz mitocondrial es TIM23, el complejo translocador de la membrana interna dependiente de gradiente electroquímico (Geissler et al., 2000).

La banda de masa molecular menor a 6 kDa, observada anteriormente (Figura 11), se mantuvo presente a lo largo del experimento en ausencia de AVO, sin embargo, esta señal de radiactividad no corresponde a alguna forma funcional conocida de Asa6, por lo que podría corresponder a una forma trunca del extremo amino del precursor, región que contiene la señal de localización mitocondrial. Esta última

banda incrementa la señal en presencia de proteinasa K, por lo que es más probable que corresponda a una forma degradada de la subunidad Asa6 que se mantiene expuesta a la actividad de la proteasa después de la reacción de importación.

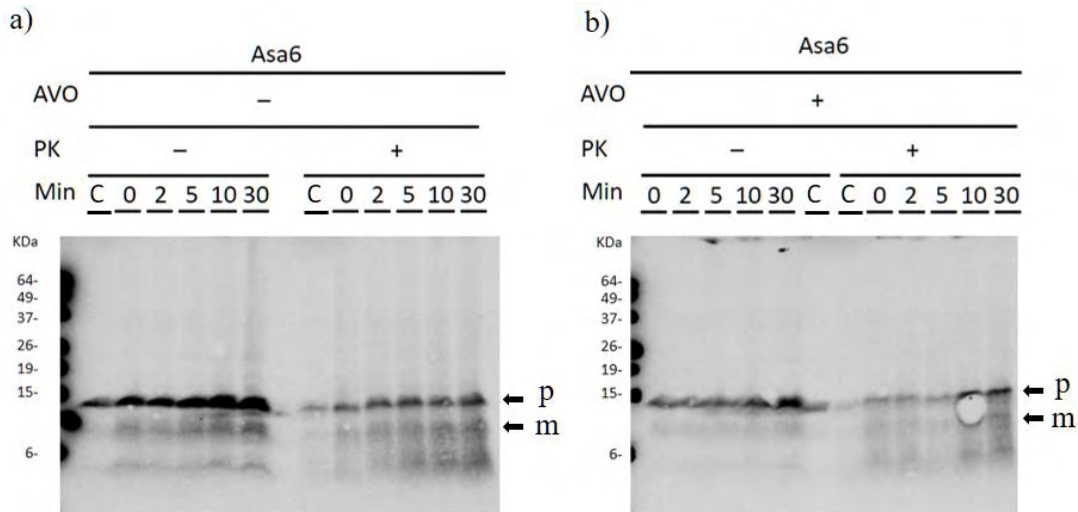


Figura 12. Importación de Asa6 dependiente del tiempo de incubación. Se muestra a la izquierda la autoradiografía después de hacer una transferencia del gel de separación. a) Ensayo de importación en el tiempo en las condiciones descritas en Métodos. b) Ensayo de importación en presencia de la mezcla de inhibidores AVO. Las flechas negras indican el precursor de Asa6 (p) y la proteína editada con una menor masa molecular aparente (m). El control de síntesis de Asa6 se cargó en el carril indicado con la letra “C”.

Una detección mediante Western blot permitió revelar a la proteína Asa6 presente en las mitocondrias utilizadas durante el ensayo de importación, para ello utilizamos las mismas membranas en las que se detectó la señal de radiactividad de la acumulación de Asa6 en el tiempo (Figura 13). La señal obtenida por el anticuerpo se encontró a la altura de la banda de 13 kDa que se acumuló en las reacciones de importación (Figura 12). Debido a que la cantidad de proteína marcada radiactivamente es extremadamente baja, la señal detectada en el western blot sólo corresponde a la proteína Asa6 endógena, que ya contenían las mitocondrias del alga al momento de iniciar la reacción de importación. Este experimento indica que la señal de 13 kDa encontrada en la autoradiografía corresponde a la proteína

editada confirmando que se trata de la forma madura, la cual muestra la misma movilidad electroforética que la subunidad Asa6 que se encuentra en la ATP sintasa.

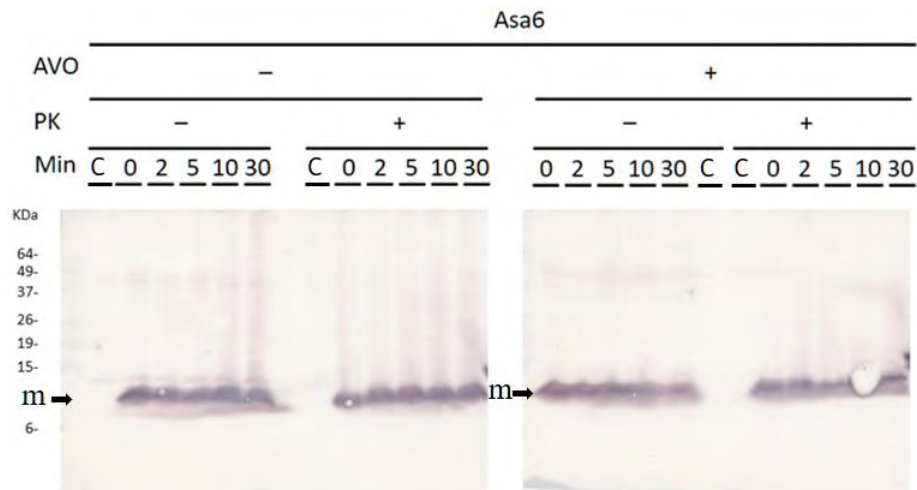


Figura 13. Detección mediante Western blot de la subunidad Asa6 en los experimentos de importación *in vitro*. Se utilizó un anticuerpo anti-Asa6 para el reconocimiento en las membranas de nitrocelulosa obtenidas después de la transferencia en el experimento de curso de tiempo. La señal del anticuerpo se debe al reconocimiento de la proteína Asa6 mitocondrial (m, indicado con una flecha negra) presente en la ATP sintasa de la fracción mitocondrial utilizada en el ensayo de importación. El control de síntesis *in vitro* de Asa6 se cargó en el carril indicado con la letra “C”.

Ensayos de ensamblaje

Para determinar si la proteína internalizada y editada se encontraba formando parte del complejo mitocondrial realizamos una solubilización con lauril-maltósido de las mitocondrias obtenidas de la reacción de importación, y las sometimos a una separación en geles azules-nativos en gradiente del 4 al 12% (BN-PAGE). El carril completo fue transferido a un gel desnaturizante de poliacrilamida al 14% (SDS-PAGE) y después transferido a una membrana de nitrocelulosa para su exposición y digitalización. Encontramos que la banda del precursor (aproximadamente 16 kDa) no se localizó en la zona correspondiente al complejo dímérico de ATP sintasa, sino en una forma agregada que no ingresó al gel de primera dimensión. La proteína editada que observamos en los experimentos anteriores se encontró en una forma libre que migró hasta el frente del gel nativo, por lo que en la segunda dimensión fue posible

localizarlo mediante su masa molecular (Figura 14a). Cuando a la reacción se adiciona la mezcla de inhibidores AVO, el precursor aún se encuentra en la forma agregada, pero no se encuentra la forma editada libre (Figura 14b).

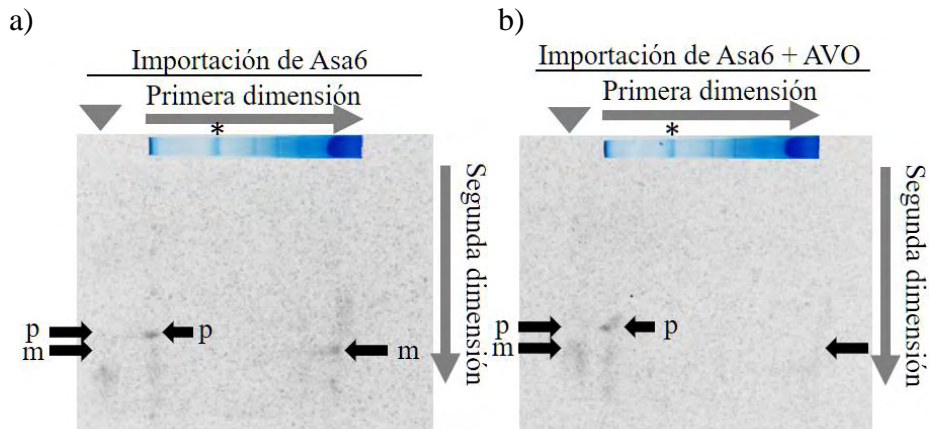


Figura 14. Separación bidimensional de la subunidad Asa6 internalizada a las mitocondrias de *Polytomella* sp. Se muestra la separación en primera dimensión en un gel azul-nativo de complejos mitocondriales solubilizados en laurilmaltósido, en el que el asterisco indica el complejo dimérico de ATP sintasa, además de la autorradiografía de la segunda dimensión hecha en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 14 %. a) Mitocondrias de una reacción solubilizadas y separadas. b) Mitocondrias de una reacción de importación que contuvo desde un principio inhibidores de la fosforilación oxidativa (AVO) y al cuál se le hizo el mismo análisis. Las flechas negras indican las bandas obtenidas en los experimentos anteriores, corresponden al precursor (p) y a la proteína editada (m).

Este experimento nos permite decir que la proteína Asa6 en las condiciones experimentales ensayadas es capaz de ser importada y editada proteolíticamente, pero que no es ensamblada en el complejo V mitocondrial, al menos no en los niveles de detección utilizados.

Ensayo de importación in vitro de la subunidad Atp6

La proteína Atp6 fue sintetizada con el sistema de extracto de germinado de trigo como se indicó antes, y fue utilizada para realizar experimentos de importación *in vitro* al exponerla a las mitocondrias de *Polytomella* sp. recién aisladas para seguir su internalización.

Como se mencionó, la proteína Atp6 es altamente hidrofóbica, por lo que ensayamos dos condiciones en las que la proteína adquiere conformaciones distintas, una es la recién sintetizada en la que el producto de la síntesis *in vitro* se utiliza directamente en el experimento. La otra condición es aquella en la que la proteína recién sintetizada es precipitada en sulfato de amonio (saturado) durante media hora en hielo, y el precipitado se resuspende en urea (8.0 M). Pensamos inicialmente que la modificación en la estructura tridimensional de la proteína que supone este tratamiento, podría arrojar diferencias en la actividad de translocación por parte de las mitocondrias aisladas.

En la Figura 15 se puede observar el patrón de bandas una vez realizada la reacción de importación con la proteína Atp6 marcada radiactivamente (carriles a1 y b1), en ambas condiciones del experimento recién sintetizada y precipitada, respectivamente. A pesar de la digestión de la proteína mediante la proteinasa K, diversas bandas mantienen resistencia a la degradación independientemente de la conformación de ésta (carriles a2 y b2). Pudimos observar algunas bandas extras al adicionar mitocondrias competentes para la importación de proteínas, una de ellas presentó una masa molecular aparente aproximada de 20 kDa con una señal importante y que podría corresponder a la versión madura de Atp6 en ambas condiciones (flecha negra en los carriles a3 y b3) además de que fue resistente a la actividad de la proteinasa K (carril 4 a y b). La subunidad Cox3 fue utilizada como control de importación de la misma manera que se describe en los apartados anteriores (carriles 5 al 8). En este caso se observa que la importación de la proteína en el ensayo de precipitación y resuspensión con urea disminuye la eficiencia con respecto al del ensayo con la proteína recién sintetizada.

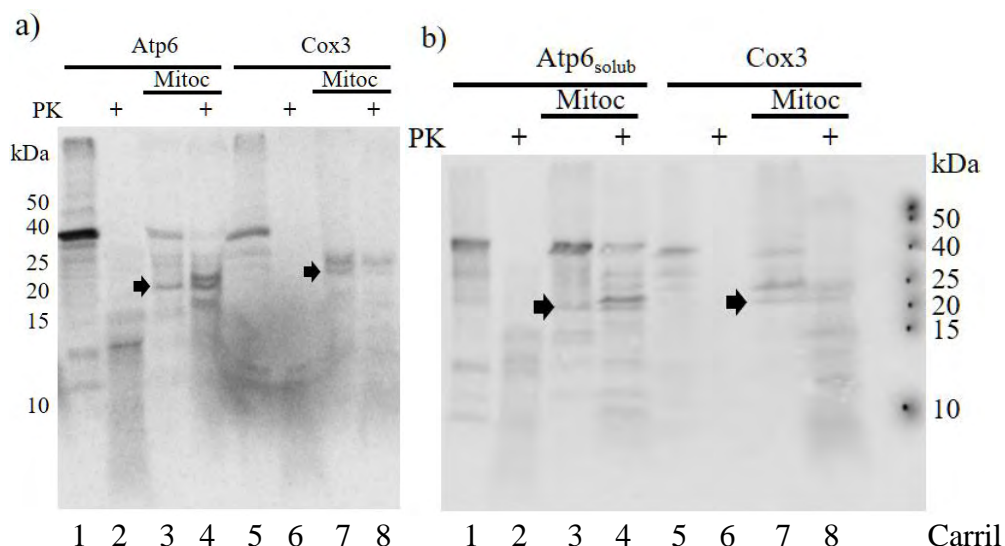


Figura 15. Importación de la subunidad Atp6 marcada radiactivamente a las mitocondrias de *Polytomella* sp. a) Ensayo de importación de la subunidad Atp6 recién sintetizada (Atp6). b) Ensayo de importación de la subunidad Atp6 precipitada y solubilizada (Atp6_{solub}). Mitoc – mitocondrias aisladas, PK - proteinasa K. Cox3 se utilizó como control de importación. Las flechas negras indican las proteínas editadas (formas maduras) de Atp6 y Cox3 en cada caso.

Intentamos evidenciar la acumulación de la banda de 20 kDa obtenida en la imagen anterior y que potencialmente corresponde a la de la proteína Atp6 editada en las mitocondrias. Preparamos un ensayo similar al descrito para Asa6, en el que la misma condición de importación fue detenida en distintos intervalos de tiempo y analizada utilizando la resistencia a proteinasa K como evidencia de la protección brindada por las mitocondrias.

En la Figura 16 se muestra una autoradiografía del resultado con una sobreexposición de tres días. Desde el tiempo inicial y hasta los 40 minutos observamos la presencia de la banda de 20 kDa, aunque su acumulación no es muy evidente en el tiempo (flecha negra en la Figura 16a, carriles 3 al 9). Esta banda se encuentra presente en el experimento de importación, esto es cuando se encuentran presentes mitocondrias en la reacción, y no en la muestra de síntesis de proteínas *in vitro* (el precursor de la proteína Atp6 se indica con una flecha blanca en la Figura 16a, carril 1). Cuando a este mismo sistema de acumulación en el tiempo de Atp6 se adiciona proteinasa K después del tiempo de importación (Figura 16b) se observa que la banda de 20 kDa se mantienen y es resistente a la actividad de la proteasa (carriles

3 al 9 de la Figura 16b). Un conjunto de bandas de masa molecular variable se observa en la Figura 16 que podrían corresponder con versiones truncas durante la síntesis *in vitro* ya que se vuelven más evidentes cuando se hace la sobreexposición (comparar carriles 1a y 1b de la Figura 15 con la Figura 16).

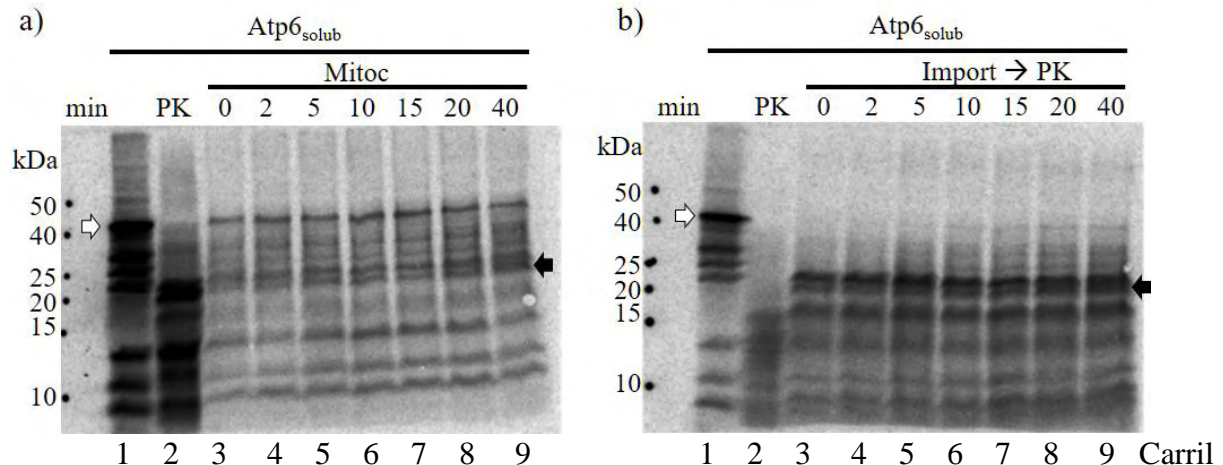


Figura 16. Ensayo de curso de tiempo de acumulación de la subunidad Atp6 marcada y solubilizada en urea (Atp6_{solub}) frente a mitocondrias aisladas. Los números indican los minutos (min) que fueron incubadas las muestras a 25°C durante la importación. Después de dicho tiempo las muestras fueron incubadas en hielo y fueron analizadas (a) o se les adicionó proteinasa K (PK 50 µg/ml) para después ser analizadas de la misma manera (b). Los carriles 1 y 2 corresponden a la proteína Atp6 marcada y su degradación con PK, respectivamente. Las flechas blancas indican el precursor en los carriles control (1) y las flechas negras la banda de 20 kDa que se observó durante la importación.

Debido a que en el control de degradación de la proteína Atp6 marcada se observó cierta resistencia a la degradación por proteinasa K (Figura 16a y b carriles 2) además de un gran número de bandas con masa molecular alrededor de los 20 kDa, no podemos afirmar concretamente que las bandas observadas a lo largo de los carriles hayan sido protegidas de la degradación, sino más bien que la degradación de la proteína por la proteinasa K fue incompleta.

Para estudiar la capacidad de degradación de la proteinasa K en los experimentos de importación, utilizamos concentraciones crecientes de ésta durante 30 minutos en hielo (Figura 17). Después de exponer a la proteína precursora (carril 1) a una concentración de proteinasa K diez veces mayor a la que

utilizamos en los experimentos anteriores, aún podemos ver bandas resistentes a la degradación (carril 2). Por otra parte, cuando a las mitocondrias obtenidas de los experimentos de importación se les adicionan diferentes concentraciones de proteinasa K (carriles 4 al 9) observamos una disminución de las bandas correspondientes a pesos moleculares entre los 40 y 20 kDa, pero no de los de menor masa. La banda de 20 kDa que apareció después de la reacción de importación en los experimentos anteriores se mantuvo como una banda muy tenue a concentraciones de proteinasa K de hasta 500 $\mu\text{g/ml}$ (flecha negra en el carril 9 de la Figura 17) a pesar de que el resto de las bandas de proteínas se difuminaron después del tratamiento proteolítico, además, la forma precursora desapareció con una mayor concentración de proteinasa K.

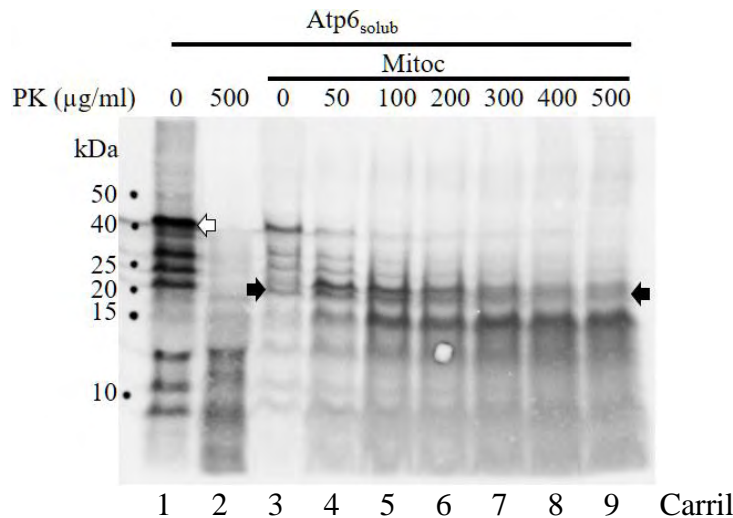


Figura 17. Resistencia de la subunidad Atp6 importada a la degradación por proteinasa K (PK). Después de la reacción de importación de 30 minutos se adicionaron concentraciones crecientes de proteinasa K (PK), 30 minutos después se adicionó PMSF (2 mM) en hielo durante 10 minutos para inhibir la actividad proteolítica. La flecha blanca indica el precursor (carril 1) y las flechas negras la banda de 25 kDa que fue resistente a la degradación por PK.

La resistencia de la proteína Atp6 a la degradación por proteinasa K podría suponer un problema si es que la banda de interés es de una intensidad muy baja. Por ello, para determinar la sensibilidad de Atp6 marcada radiactivamente realizamos un ensayo de degradación con una proteasa distinta, termolisina (Figura 18). Realizamos pruebas con concentraciones estándar (100 $\mu\text{g/ml}$) para experimentos de

importación durante 30 minutos en hielo (carril 1) y con el doble esa concentración (carril 2). En ambos casos se observó el mismo resultado que con la sola adición de proteinasa K (carril 5), una degradación parcial de la proteína. Inclusive la presencia de CaCl₂, un activador de la actividad de la termolisina, no provocó ningún cambio en el patrón de degradación (carril 3). Al adicionar al mismo tiempo ambas proteasas (carril 4 y 8 con y sin CaCl₂, respectivamente) se observó un ligero decremento en las bandas de mayor masa molecular, pero un incremento en las de alrededor de 20 kDa. Cuando llevamos la reacción de degradación a una temperatura de 30 °C, fue posible observar una degradación más acentuada de esta proteína (carril 7 y 9 con y sin CaCl₂, respectivamente), y sólo cuando elevamos la temperatura hasta los 70 °C, temperatura en la que presenta mayor actividad la termolisina, observamos la degradación casi completa de la proteína Atp6.

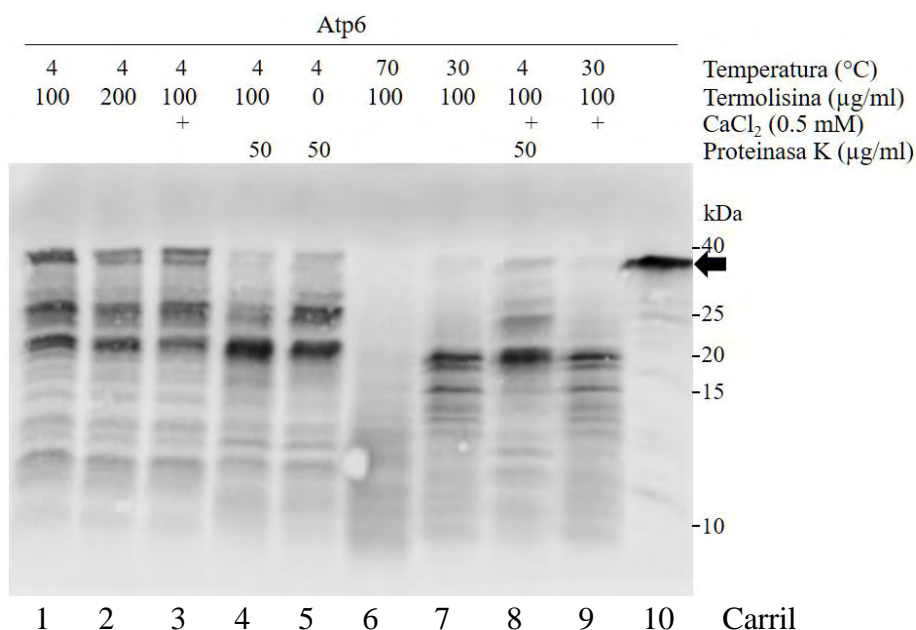


Figura 18. Sensibilidad de la proteína Atp6 marcada radiactivamente frente a la acción de termolisina y proteinasa K. Se ensayó con un volumen de 5 µl de la reacción de síntesis en un volumen final de 10 µl. La reacción de proteólisis se mantuvo a la temperatura indicada durante 30 minutos y se detuvo al adicionar PMSF 2mM para inhibir a la proteinasa K o EDTA 10 mM para inhibir a la termolisina. La presencia de un activador de la termolisina como el CaCl₂ no tuvo ningún efecto sobre su actividad en las condiciones ensayadas. La proteína control se cargó en el carril 10 (flecha negra). Este ensayo se llevó a cabo en ausencia de la fracción mitocondrial.

Al parecer la digestión a temperaturas bajas se ve afectada debido probablemente a que Atp6 es una proteína altamente hidrofóbica. A una temperatura de 30°C con termolisina es posible degradar una fracción significativa de Atp6, debido a esto realizamos una prueba a temperaturas de 15 y 25 °C con la mezcla de proteasas para encontrar una condición adecuada de degradación de esta proteína. Encontramos que una excelente temperatura de degradación fue 15 °C utilizando la mezcla de proteasas, este mismo resultado se obtiene a 25°C con la misma mezcla (Figura 19).

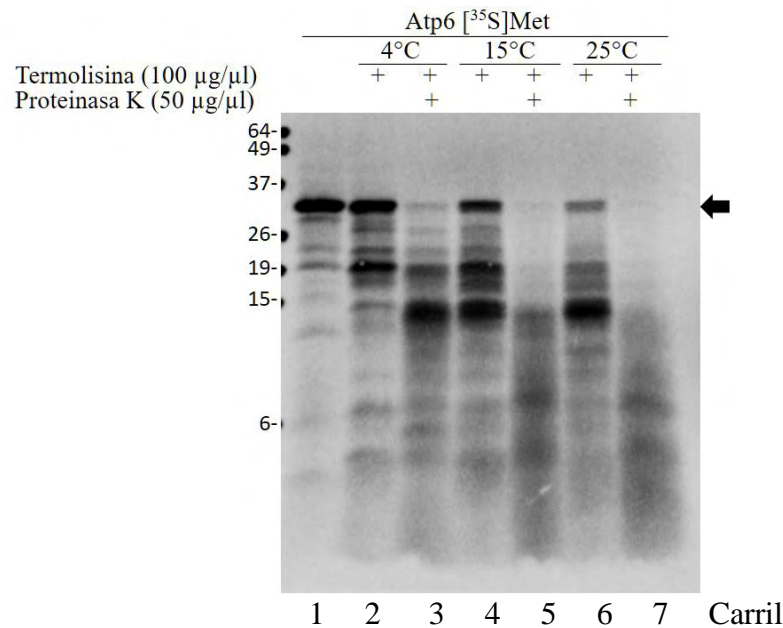


Figura 19. Sensibilidad de la proteína Atp6 marcada radiactivamente frente a la acción de termolisina y proteinasa K en tres temperaturas diferentes. La condición de ensayo fue la misma que para el experimento anterior, excepto que no se adicionó en ningún momento CaCl₂. La proteína control se cargó en el carril 1 (flecha negra). Este ensayo se llevó a cabo en ausencia de la fracción mitocondrial.

La utilización de la mezcla de proteasas descritas en el párrafo anterior (proteínasa K 50 µg/ml + termolisina 100 µg/ml) fue ensayada en una reacción de importación durante 30 minutos en hielo (Figura 20). Se pudo obtener la degradación completa de la proteína control, además de la resistencia de la banda de 20 kDa a la acción de ambas proteasas después de la reacción de importación a las mitocondrias.

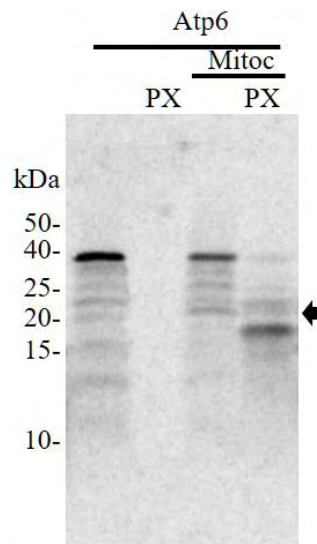


Figura 20. Ensayo de importación de la proteína Atp6. Se utilizó la mezcla de proteasas (PX) proteinasa K (50 $\mu\text{g/ml}$) más termolisina (100 $\mu\text{g/ml}$). La flecha negra indica la banda de 25 kDa que presenta resistencia a proteasas.

Una fracción de la reacción de importación de Atp6 fue cargada en un gel azul nativo en gradiente de acrilamida del 4 al 12% para separar los complejos mitocondriales en condiciones nativas. Las mitocondrias fueron solubilizadas con digitonina y cargadas en el gel para su análisis en segunda dimensión en condiciones desnaturizantes (datos no mostrados). En la primera dimensión encontramos la presencia de la banda característica de la ATP sintasa dimérica, mientras que en la segunda dimensión pudimos observar que la señal de radiactividad de la subunidad Atp6 se encontró en una sección del gel que no corresponde a la del complejo dimérico. Sin embargo, esta señal corresponde a las bandas observadas en las imágenes anteriores cuando aparece la proteína de 20 kDa, que en la autorradiografía es la señal principal. Este experimento indicó que la proteína ingresó a las mitocondrias y fue editada, sin embargo, probablemente se encuentra en una fracción agregada, ya que no se incorporó en la ATP sintasa en niveles detectables.

Análisis de secuencias de Asa6

La subunidad Asa6 sólo se encuentra codificada en el genoma nuclear de organismos pertenecientes al orden Chlamydomonadales (Tabla 1), fuera de este grupo no se han encontrado homólogos (Lapaille et al., 2010). Esta subunidad presenta una MTS de 27 residuos en *P. parva*, de acuerdo con la determinación de la secuencia amino terminal por degradación de Edman (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Al realizar la búsqueda de sitios de corte proteolítico mediante el predictor MitoFates (Fukasawa et al., 2015) encontramos que esta subunidad presenta potencialmente dos sitios de procesamiento para la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) en la posición 19 y para la proteasa octapeptidil aminopeptidasa 1 (Oct1) que remueve un octapéptido del precursor intermediario formado por MPP. El motivo de corte de MPP y Oct1 es RX(↓)(F/L/I)XX(T/S/G)XXXX(↓), que en Asa6 de *Polytomella* corresponde a la secuencia: MMLRTLTRSSAVAGQAVRL ↓ FKTSAAAA ↓ EGNSVA. Esta coincidencia indica fuertemente que la edición proteolítica de la subunidad Asa6 en las mitocondrias de *P. parva* la llevan a cabo las enzimas MPP y Oct1 de manera secuencial.

Asa6 presenta dos regiones hidrofóbicas con la longitud suficiente para formar dos cruces transmembranales (de las posiciones 72 a 90 y 105 a 130), sin embargo, la mayoría de programas muestran resultados poco claros cuando se intenta hacer predicciones, ya que la mayoría de ellos sólo muestra al segundo con mayor probabilidad de formar el cruce. También es posible encontrar un motivo de hélice reentrante (Cross-family reentrant motif L-[AT]-G-[FI]-[AILV]-x-[IPV]-[IL]; (MeMotif)) en las posiciones 79 a 86, que cae precisamente en la primera región transmembranal predicha:

```
71                               91
|                               |
YSTQAKIALF GALSWILYRA
```

Con esto, la predicción de la topología se vuelve difícil de inferir, ya que tendríamos que considerar dos cruces transmembranales o un solo cruce más una hélice reentrante.

La subunidad Atp6 de Chlamydomonadales tiene un patrón de hidrofobicidad atípico

Por otra parte, realizamos una búsqueda de homólogos de la subunidad Atp6 en organismos de grupos taxonómicos diversos y encontramos algunas diferencias importantes. Sólo las algas Chlamydomonadales (como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gonium pectorale*, *Haematococcus pluvialis*, *Polytoma uvella*, *Polytomella parva*, *Volvox carteri*, entre otros) contienen a todos los genes de la ATP sintasa codificados en el genoma nuclear (Tabla 1). En otras algas clorofíceas, como en el orden Sphaeropleales, al menos dos subunidades, Atp6 y Atp9, se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial. Mientras que en las algas de la clase Trebouxiophyceae, como *Coccomyxa subellipsoidea*, en dicho genoma están codificadas las subunidades Atp1, Atp4, Atp6, Atp8 y Atp9.

En nuestra búsqueda encontramos también que las subunidades Asa están distribuidas entre las algas clorofíceas (Lapaille et al., 2010) de una manera no tan uniforme. Su presencia es constante en el grupo de Chlamydomonadales, ya que sólo en *P. uvella* no se encuentra el transcrito de Asa8. Por otro lado, en tres Sphaeropleales pudimos notar la ausencia de Asa6 y sólo en *Colelastrella* sp. la ausencia de Asa9, en el resto de las algas no hay información suficiente para realizar las búsquedas.

Tabla 1. Composición de genes de ATP sintasa en algas clorofíceas de los órdenes Chlamydomonadales (amarillo) y Sphaeropleales (verde). *Coccomyxa subellipsoidea* pertenece a la clase Trebouxiophyceae. “n”- gen codificado en el genoma nuclear, “mt”- gen codificado en el genoma mitocondrial, “ni”- secuencia codificada en el genoma nuclear, aunque sin información suficiente de que formen un transcrito, “-” secuencia no encontrada. Los cuadros vacíos indican que no hay información suficiente en las bases de datos con la que se pueda realizar una búsqueda bioinformática.

Familia	Especie	Alfa (Atp1)	Beta (Atp2)	Gama (Atp3)	Delta (Atp16)	Epsilon (Atp15)	OSCP (Atp5)	A6L (Atp8)	a (Atp6)	b (Atp4)	c (Atp9)	Asa1	Asa2	Asa3	Asa4	Asa5	Asa6	Asa7	Asa8	Asa9
Chlamydomonadales	<i>Polytomella parva</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Chlamydomonadales	<i>Polytoma uvella</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	-	n
Dunaliellaceae	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Haematococcaceae	<i>Haematococcus pluvialis</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Volvocaceae	<i>Gonium pectorale</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Volvocaceae	<i>Volvox carteri</i>	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Selenastraceae	<i>Monoraphidium neglectum</i>	n	n	n	n	ni	n	-	mt ?	-	mt	ni	n	n	n	n	-	n	n	n
Scenedesmaceae	<i>Acutodesmus obliquus</i>	n	n	n	n	n	n	-	mt	-	mt	ni	ni	ni	n	n	-	n	n	n
Scenedesmaceae	<i>Coelastrella sp.M60</i>	n	n	n	n	n	n	-	mt	-	mt	ni	ni	n	n	n	-	n	n	-
Bracteacoccaceae	<i>Bracteacoccus minor</i>							-	mt	-	mt									
Chromochloridaceae	<i>Chromochloris zafingiensis</i>							-	mt	-	mt									
Hydrodictyceae	<i>Hydrodictyon reticulatum</i>							-	mt	-	mt									
Hydrodictyceae	<i>Pediastrum duplex</i>							-	mt	-	mt									
Mychonastaceae	<i>Mychonastes homosphaera</i>							-	mt	-	mt									
Neochloridaceae	<i>Chlorotetraedron incus</i>							-	mt	-	mt									
Pseudomuriellaceae	<i>Pseudomuriella schumacherensis</i>							-	mt	-	mt									
Rotundellaceae	<i>Rotundella rotunda</i>							-	mt	-	mt									
Selenastraceae	<i>Ourococcus multisporus</i>							-	mt	-	mt									
Sphaeropleaceae	<i>Atractomorpha echinata</i>							-	mt	-	mt									
Microsporaceae	<i>Microspora stagnorum</i>	mt						mt	mt	mt	mt									
Coccomyxaceae	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	mt	n	n	n	n	n	mt	mt	mt	mt	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Existen diferencias significativas con respecto a la longitud de la secuencia de la proteína Atp6, sin embargo, no es posible, salvo en casos contados, decir que existe una modificación proteolítica de las subunidades durante su biogénesis. En mamíferos como *Homo sapiens* o *Bos taurus*, esta subunidad tiene una longitud de 226 residuos (25 kDa), mientras que en levaduras como *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia angusta*, ésta tiene una longitud de 255, 259 y 261 residuos, respectivamente. En plantas esta subunidad presenta una longitud mayor, siendo de 337 residuos en *Oryza sativa*, 385 en *Arabidopsis thaliana* y 410 en *Zea mays*. En algas de la clase Trebouxiophyceae como *Chlorella sorokiniana* y *C. subellipsoidea*, la subunidad está formada por 249 residuos. En algas Chlorophyceae del orden Sphaeropleales, como *Bracteacoccus aerius*, la subunidad está compuesta por 296 residuos, o en *Acutodesmus obliquus* por 304. En el orden Chlamydomonadales la subunidad es más grande, en *C. reinhardtii* está compuesta por 340 residuos, en *G. pectorale* por 323, en *H. pluvialis* por 332, en *P. uvella* por 323, en *P. parva* por 327 y en *V. carteri* por 337.

Nos preguntamos si las diferencias en longitud de secuencia tendrían un efecto importante en las regiones membranales de esta subunidad. Además, buscamos diferencias entre las secuencias codificadas en el genoma mitocondrial, con respecto a aquellas codificadas en el genoma nuclear.

Realizamos un alineamiento múltiple de secuencias utilizando aquellas de organismos que codifican a Atp6 en el genoma mitocondrial (no mostrado), y encontramos que existe un alto grado de conservación entre ellas, sólo cuando consideramos a las secuencias de organismos que la codifican en el genoma nuclear encontramos una divergencia importante en este último grupo.

La subunidad Atp6 de *P. parva* presenta una MTS de 94 residuos que debe procesarse durante la biogénesis de la proteína. Por su parte, la proteína madura contiene los segmentos hidrofóbicos (Figura 21a) que le permiten permanecer en la membrana interna mitocondrial y realizar su función de conducir los protones durante la actividad de la ATP sintasa.

Al comparar el perfil de hidrofobicidad promedio de las secuencias de *P. parva* y de *C. reinhardtii* con las de *B. taurus* (cuya estructura ha sido resuelta por crio-microscopía electrónica) y de *S. cerevisiae* (Figura 21b), encontramos que, a pesar de las diferencias en el tamaño de las secuencias, se conservan los mismos segmentos altamente hidrofóbicos desde la posición 150 hasta el extremo carboxilo en las proteínas de las algas. La gráfica de la Figura 21b se realizó respetando el alineamiento de secuencias de estas cuatro proteínas (ver en el Apéndice), por lo que se observa que los picos de hidrofobicidad se agrupan todos hacia el extremo carboxilo.

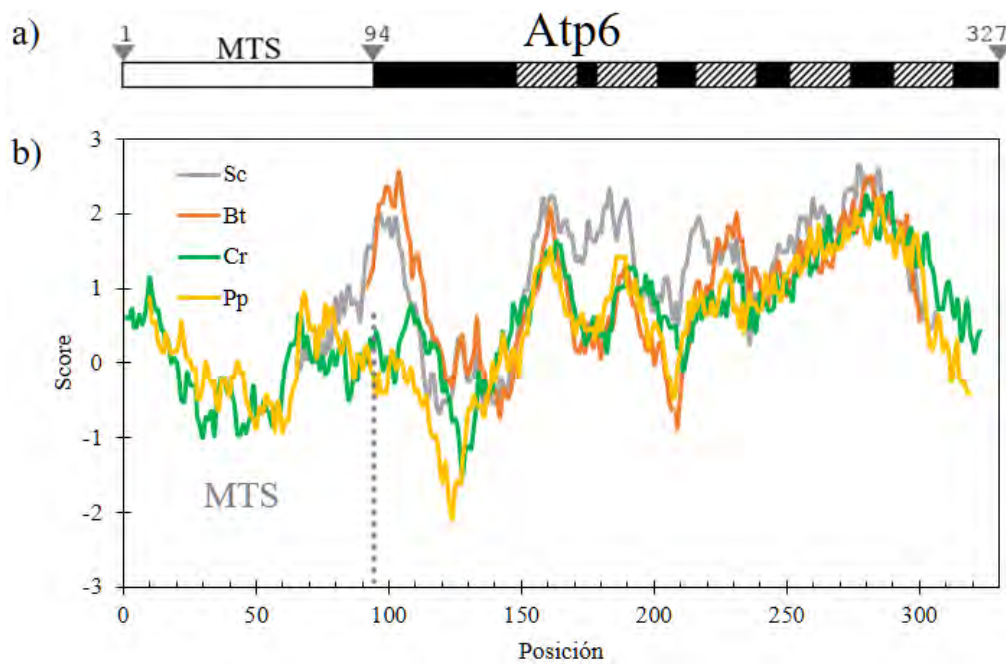


Figura 21. Esquematación de la hidrofobicidad predicha para la subunidad Atp6 de *P. parva*. a) Los números indican los residuos de la proteína, la sección del residuo 1 al 94 indica la presecuencia de localización mitocondrial (MTS), y el resto la predicción de hélices transmembranales de la proteína de acuerdo con el programa TMHMM v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). b) Perfil de hidrofobicidad de la subunidad Atp6 de *P. parva* (Pp), *B. taurus* (Bt), *S. cerevisiae* (Sc) y *C. reinhardtii* (Cr) en el color indicado (el sitio de procesamiento de la secuencia de Cr está en la misma posición que en la de Pp en esta gráfica, indicado con la línea gris punteada). Los perfiles se obtuvieron utilizando la escala de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) con una ventana de 19 residuos.

Las diferencias más importantes al comparar la hidrofobicidad de las secuencias se encuentran en el extremo amino, alrededor de la posición 100, en la que las algas no muestran un segmento hidrofóbico que sí está presente en mamífero y en levadura. Las secuencias de *C. reinhardtii* y de *P. parva* que componen el complejo ATP sintasa tienen una masa molecular similar a la de *B. taurus* y *S. cerevisiae*, por lo que consideramos que el alineamiento en los perfiles de hidrofobicidad es válido y demuestra una diferencia muy importante en las subunidades codificadas en los genomas nucleares de las algas Chlamydomonadales.

Con base en lo anterior, utilizamos las secuencias de Atp6 de organismos representativos de grupos taxonómicos diversos para obtener una predicción de cruces transmembranales (Figura 22). Encontramos que los segmentos hidrofóbicos predichos se conservan en la región carboxilo terminal de las subunidades comparadas, de igual forma que en el perfil de hidrofobicidad anterior. Sin embargo, el primer cruce transmembranal que se observa en las secuencias que son codificadas en el genoma mitocondrial, no fue predicho en las secuencias de las algas que están codificadas en el genoma nuclear.

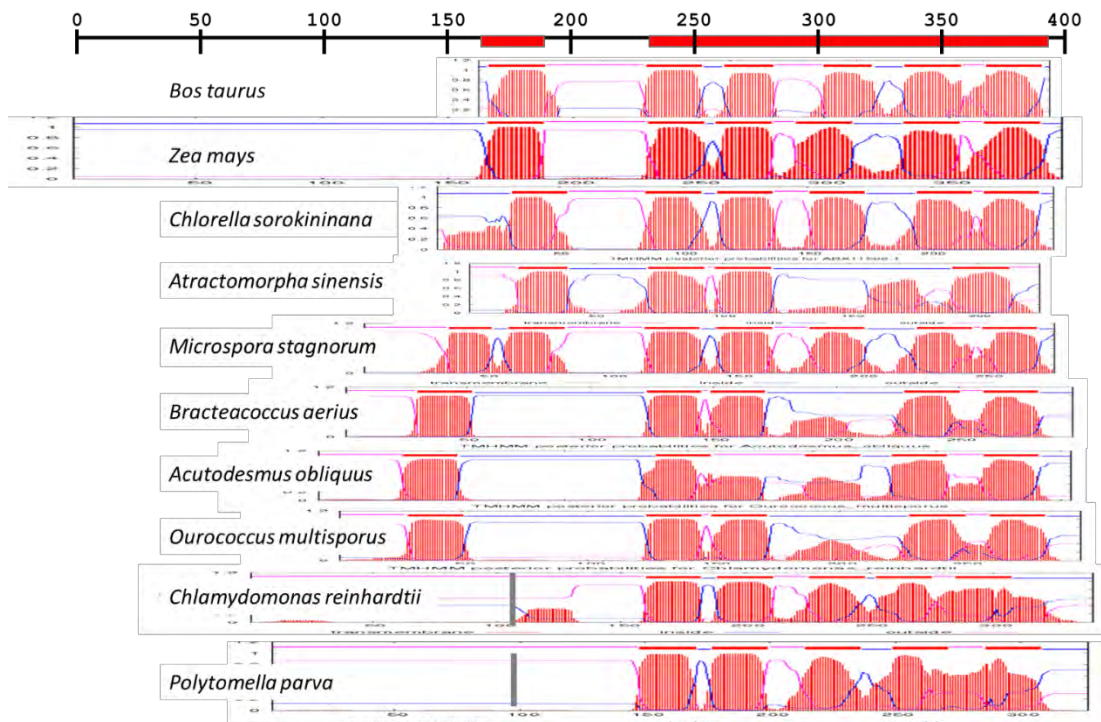


Figura 22. Predicción de cruces transmembranales en secuencias de Atp6 de diferentes organismos. La predicción se obtuvo del servidor TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y las gráficas de resultado de probabilidad fueron copiadas y acomodadas respetando la misma escala de posición. La línea superior indica la posición de los residuos de la proteína de *Zea mays*; las barras rojas muestran las regiones con mayor probabilidad de tener cruces transmembranales. La barra vertical gris en los gráficos de *C. reinhardtii* y *P. parva* indican el inicio de la proteína madura.

Pensamos que la pérdida de hidrofobicidad del segmento N-terminal está asociada al hecho de que en algas Chlamydomonadales esta subunidad esté codificada en el núcleo. Sin embargo, para evidenciar la hidrofobicidad del extremo carboxilo conservado, realizamos un análisis en el que dividimos las secuencias en dos regiones. La primera corresponde a la región N-terminal, desde el inicio de la secuencia madura, pasando por el primer segmento transmembranal y hasta el inicio de la primer alfa hélice horizontal hidrofóbica. Esta última región fue determinada mediante los alineamientos realizados previamente, tanto de secuencia como de perfil de hidrofobicidad. Utilizamos como base las secuencias de las proteínas cuyas estructuras han sido determinadas mediante crio-microscopía electrónica o cristalografía de rayos X, estas fueron las subunidades Atp6 de *B. taurus*, *Paracoccus denitrificans*, *Y. lipolytica* y *P. angusta*. Todas estas estructuras comparten cuatro alfa hélices horizontales hidrofóbicas y un cruce transmembranal ortodoxo (perpendicular al eje de la membrana) como se esquematiza en la Figura 23.

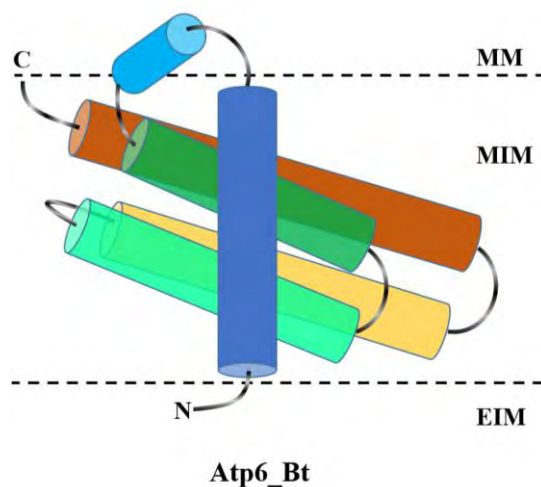
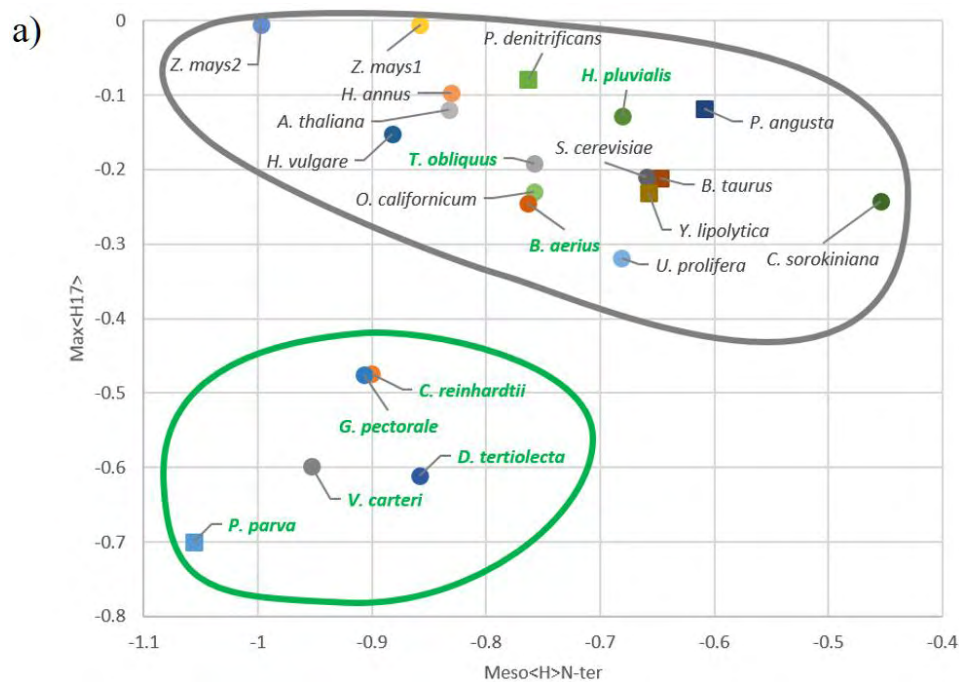


Figura 23. Topología de la subunidad Atp6 de *B. taurus* (Atp6_Bt). El esquema se realizó basado en las observaciones obtenidas mediante crio-microscopía electrónica de la ATP sintasa de *B. taurus* (Zhou et al., 2015). Las alfa hélices se representan con cilindros de colores y las líneas punteadas indican la membrana interna mitocondrial (MIM) en la que se encuentra embebida esta subunidad. Se indican los extremos N y C de la proteína, orientados hacia el espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial (MM) respectivamente.

La segunda región corresponde a las cuatro alfa-hélices horizontales hidrofóbicas y hasta el extremo carboxilo. Esta región se encuentra en contacto con el anillo de subunidades Atp9 en el complejo ATP sintasa. Esta región conservada participa directamente en la formación de los hemicanales por los que los protones cruzan la membrana.

El análisis consistió en obtener la hidrofobicidad promedio (Meso<H>) de cada región y compararla con la hidrofobicidad máxima obtenida de una ventana de 17 residuos a lo largo de cada segmento (Max<H17>; Figura 24; Claros et al., 1995). Utilizamos una escala de hidrofobicidad deducida a partir de cambios en la energía libre en péptidos transmembranales en los cuales se modificaron los residuos que los componen (Botelho et al., 2011).



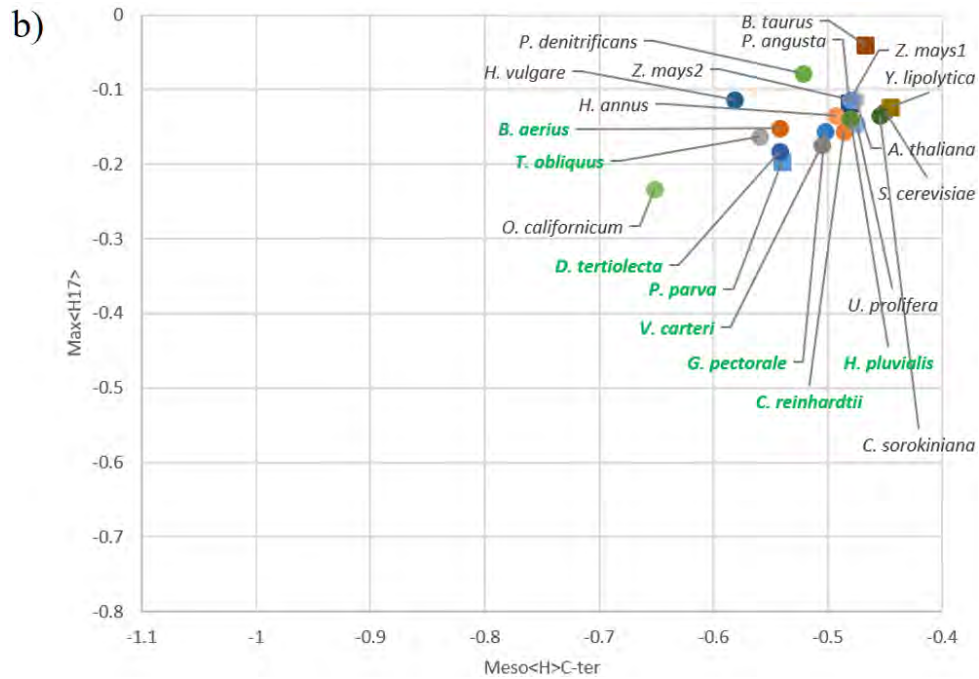


Figura 24. Gráficos de mesohidrofobicidad (Meso<H>) contra la máxima hidrofobicidad local en una ventana de 17 residuos (Max<H17>) de la secuencia Atp6 segmentada en dos regiones, N-ter (a) y C-ter (b). Los nombres de cada especie se asocian con cada punto de la gráfica, los valores correspondientes al grupo Chlorophyceae se muestran en verde. El óvalo gris delimita las subunidades codificadas en la mitocondria, y el verde las codificadas en el núcleo. Los símbolos cuadrados indican que su estructura tridimensional se conoce.

Las secuencias mitocondriales correspondientes al extremo amino (Figura 24a) se distribuyeron en la región superior de la gráfica, que corresponde a las secuencias con un pico de hidrofobicidad alto y que forma el cruce transmembranal ortodoxo. Por su parte, las secuencias N-terminales correspondientes a las proteínas codificadas en el núcleo se agruparon en una región con un máximo de hidrofobicidad muy disminuido y de baja hidrofobicidad. Esta gráfica muestra que el extremo amino de las secuencias nucleares no presenta un pico de hidrofobicidad suficientemente alto como el que exhiben las proteínas codificadas en las mitocondrias.

Cuando comparamos la hidrofobicidad del extremo carboxilo de las secuencias estudiadas, encontramos que éstas se mantienen agrupadas en una misma región altamente hidrofóbica y con un segmento de 17 residuos muy hidrofóbico (Figura 24b). Esta región de la proteína presenta un alto grado de conservación

estructural para poder llevar a cabo la función que desempeña translocando protones a través de sus hemicanales.

De acuerdo con la información presentada, un modelo de la topología de la subunidad Atp6 en algas Chlamydomonadales, como *P. parva*, podría dibujarse como uno que no presenta el cruce transmembranal ortodoxo, pero que mantiene la topología de las cuatro hélices horizontales que forman los hemicanales (Figura 25).

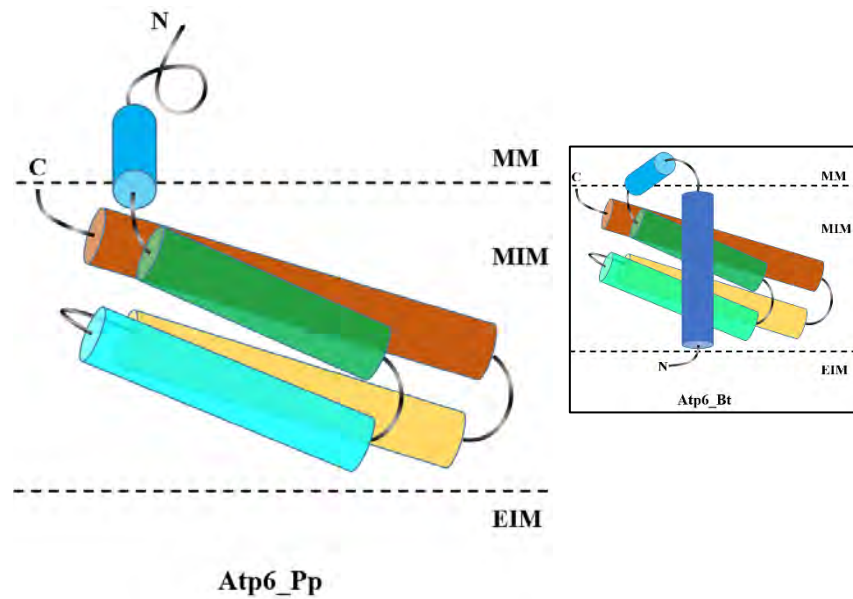


Figura 25. Propuesta de la topología de la subunidad Atp6 de *Polytomella* (Atp6_Pp) en la membrana interna mitocondrial. El esquema considera la información reportada mediante criomicroscopía electrónica a partir de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* (Allegretti et al., 2015) y la que obtuvimos mediante los análisis de hidrofobicidad. Las alfa hélices se representan con cilindros de colores y las líneas punteadas indican la membrana interna mitocondrial (MIM). Se indican los extremos N y C de la proteína, ambos orientados hacia la matriz mitocondrial (MM). EIM- espacio intermembrana. En el inserto se muestra de nuevo el modelo para las subunidades ortodoxas que se sintetizan dentro de la mitocondria (Figura 23)

DISCUSIÓN

Las ATPasas rotatorias, entre las que se encuentran las F_1F_0 -ATP sintasas, son complejos altamente conservados en función y en estructura. Las subunidades implicadas directamente en la translocación de protones y en la síntesis de ATP se encuentran bien conservadas entre grupos taxonómicos distantes (Kühlbrandt y Davies, 2016).

En *Polytomella parva*, un alga clorofícea perteneciente al orden Chlamydomonadales, la ATP sintasa mitocondrial es un dímero estable con una masa molecular de 1600 kDa (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009), las subunidades que la conforman se encuentran todas codificadas en el genoma nuclear. Además, el brazo periférico de este complejo es atípico pues se forma a partir de subunidades Asa (Vázquez-Acevedo et al., 2006) que solamente se encuentran en el grupo de las algas clorofíceas (Tabla 1). Las subunidades membranales Atp6, Asa6, Asa8 y Asa9, se localizan en la membrana interna mitocondrial y sirven como ancla del brazo periférico que a su vez conecta con la región catalítica del complejo (Figura 5).

Las subunidades estudiadas en este trabajo fueron Atp6, subunidad que forma los hemicanales que conducen los protones a través de la membrana interna mitocondrial (Allegretti et al., 2015), y Asa6 que probablemente participa en la dimerización del complejo en la región membranal (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

La subunidad Atp6 de *P. parva* presenta algunos elementos estructurales atípicos que pueden estar relacionados con el camino que sigue durante su importación a la mitocondria y repercute en su topología final. Difiere de aquellas subunidades Atp6 que siguen una ruta biogénica ortodoxa, que están codificadas en la mitocondria y que se sintetizan dentro del organelo.

Los estudios de importación *in vitro* nos permitieron explorar las vías de translocación de estas dos proteínas. Los experimentos de importación que llevamos a cabo en este trabajo nos mostraron que las subunidades Asa6 y Atp6 son internalizadas en mitocondrias aisladas y parecen ser procesadas

proteolíticamente (Figura 12 y Figura 15). Las proteínas editadas, sin embargo, no parecen ensamblarse en el complejo dimérico de la ATP sintasa en las condiciones en que se realizó el ensayo (Figura 14). La subunidad Atp6 de *P. parva*, contiene una presecuencia de localización mitocondrial de 94 residuos de aminoácidos. La forma madura de la proteína contiene regiones altamente hidrofóbicas, y su patrón de hidrofobicidad es similar al que muestran sus contrapartes de organismos como levadura, bovino y el alga verde *Chlamydomonas* (Figura 21). Solamente la región cercana al sitio de procesamiento es distinta entre las secuencias de las algas clorofíceas con las de bovino y levadura. Al parecer este segmento N-terminal que muestra una menor hidrofobicidad (Figura 24), permite que la proteína pueda ser transportada a través de los complejos de translocación mitocondriales desde el citosol hasta la matriz mitocondrial. Esta modificación está relacionada con el hecho de que la proteína está codificada en el núcleo, se sintetiza en el citosol y se importa a la mitocondria (Funes et al., 2002, González-Halphen et al., 2003).

Un fenómeno similar de disminución de la hidrofobicidad se ha observado con la subunidad Cox2 de este mismo grupo de algas (Pérez-Martínez et al., 2001), la cual se fragmentó en dos segmentos, uno que presenta una menor hidrofobicidad y que migró primero al genoma nuclear cuando divergió el grupo Chlorophyceae (Cox2b; Rodríguez-Salinas et al., 2012), y otro que contiene los dos cruces transmembranales (Cox2a) que exhiben una hidrofobicidad promedio menor que aquellos codificados en el genoma mitocondrial. Además, en plantas leguminosas, en las que existe una copia de la subunidad Cox2 tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial, existe una diferencia importante en la hidrofobicidad del primer cruce transmembranal de ambas secuencias, presentando la menor hidrofobicidad aquella que está codificada en el núcleo (Daley et al., 2002).

El modelo existente de la estructura de la ATP sintasa de *Polytomella* no tiene la resolución suficiente para resolver con claridad el extremo N-terminal de la proteína Atp6 (Allegretti et al., 2015), por lo que no se sabe si el cruce transmembranal encontrado en bovino tiene su correspondiente en *Polytomella*.

Con base en los resultados de análisis de secuencia de esta subunidad (Figura 21 a la 25) proponemos que el cruce transmembranal no se encuentra presente en la subunidad del alga.

La subunidad Asa6 es una proteína pequeña que presenta dos regiones hidrofóbicas, de las cuales es difícil inferir su topología. Fuera del grupo Chlamydomonadales no pudimos encontrar homólogos (Tabla 1) por lo que nos pareció interesante que la distribución de esta subunidad se encuentra restringida al mismo clado en el que la subunidad Atp6 se encuentra codificada en el genoma nuclear. Una explicación posible a este hecho es que sea Asa6 la subunidad que sustituyó la función estructural del cruce transmembranal que perdió Atp6. De acuerdo con esta hipótesis, la interacción de la subunidad Atp6 con Asa6 le proporciona la estabilidad estructural que tendría si aún conservara el cruce transmembranal. Una propuesta de la equivalencia de los cruces transmembranales de la enzima del alga con respecto a una ATP sintasa clásica (*Y. lipolytica*) se muestra en la Figura 26. En esta propuesta se indica que la subunidad Asa6 presenta dos cruces transmembranales y que se encuentran en una región equivalente a la que se encontraría el primer cruce transmembranal de Atp6.

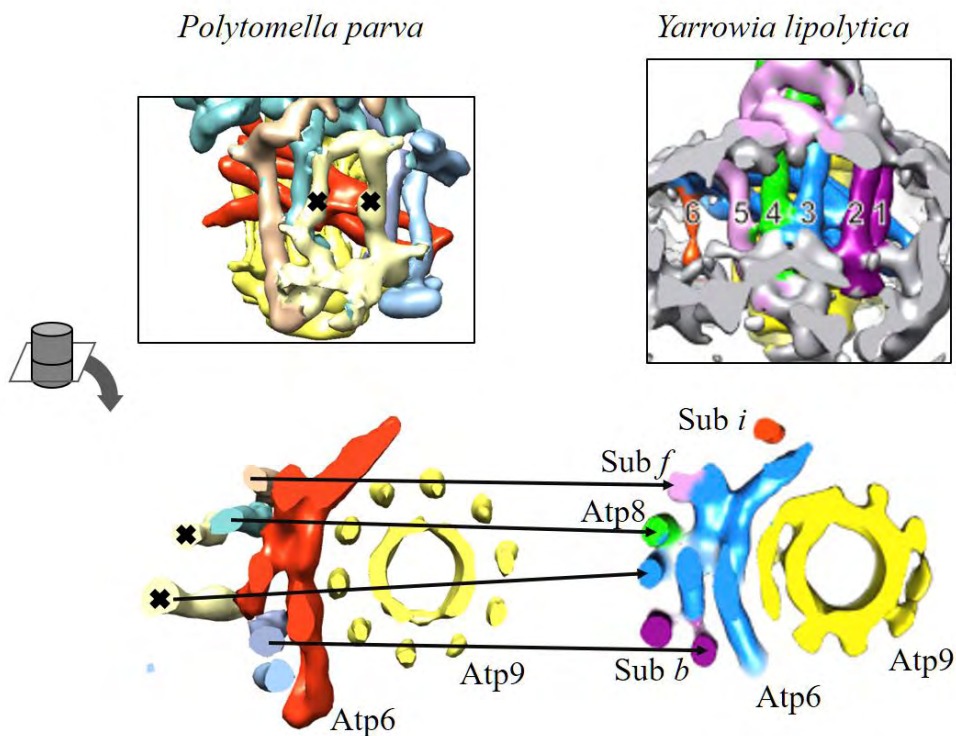


Figura 26. Posible equivalencia de los cruces transmembranales observados en la ATP sintasa de *Polytomella* sp. (izquierda, EMD 2852) con respecto a la de *Yarrowia lipolytica* (derecha,

EMD 8151; Hahn et al., 2016). La subunidad Atp6 en *P. parva* se muestra en rojo y el resto de cruces transmembranales en colores diferentes. La posible localización de Asa6 se indica con una x.

En la Figura 27 damos una propuesta de la ruta de importación de la subunidad Asa6 a las mitocondrias de *P. parva*, la cual es dependiente de la presencia de gradiente electroquímico ($\Delta\Psi$). Su topología se acomoda a la propuesta en el modelo de la Figura 26 o bien para la predicción de una hélice reentrante. Los sitios de corte para MPP y Oct1 deberían facilitar la incorporación del primer segmento hidrofóbico a la membrana interna mitocondrial. El segundo cruce transmembranal podría entregarse de manera lateral mediante el sistema TIM23.

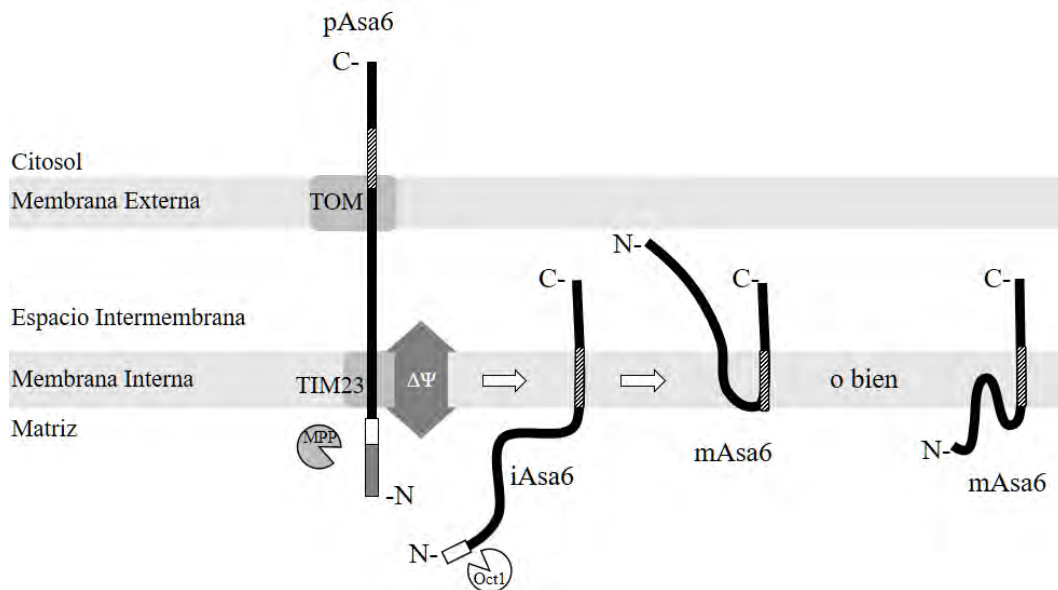


Figura 28. Modelo propuesto de importación de la subunidad Asa6. El modelo muestra a la subunidad en forma de precursor (pAsa6), una forma intermedia (iAsa6) por la actividad de la proteasa de procesamiento mitocondrial (MPP) y las dos posibles formas maduras de la subunidad (mAsa6) después de ser procesadas por la Octapeptidil aminopeptidasa (Oct1).

La ruta de biogénesis de la subunidad Atp6 se ha estudiado en la levadura *S. cerevisiae*. En este organismo esta subunidad es codificada en el genoma mitocondrial, de manera que la proteína se sintetiza en la matriz mitocondrial y es insertada en la membrana interna, probablemente de manera

cotraduccional. Posterior a ello, una presecuencia de diez residuos de aminoácidos es escindida mediante una proteasa del espacio intermembrana llamada Atp23 (Osman et al., 2007).

En el caso de *Polytomella*, la subunidad Atp6 se sintetiza en el citosol, por lo que esta proteína debe cruzar a través de al menos dos sistemas de translocación. Gracias a la disminución de hidrofobicidad en el extremo amino, probablemente esta región de la proteína sea llevada hasta la matriz mitocondrial mediante el sistema TIM23. Una vez que el resto de la proteína haya alcanzado este compartimento, probablemente tenga que seguir una vía conservada, de la misma forma que las proteínas codificadas en mitocondria, para alcanzar su topología final (Figura 28). También es probable, debido a la hipótesis que planteamos sobre la ausencia de su primer cruce transmembranal, que sólo sean reconocidos los segmentos hidrofóbicos horizontales, para formar los hemicanales, quedando con los extremos N y C expuestos hacia el mismo compartimento, es decir, la matriz mitocondrial.

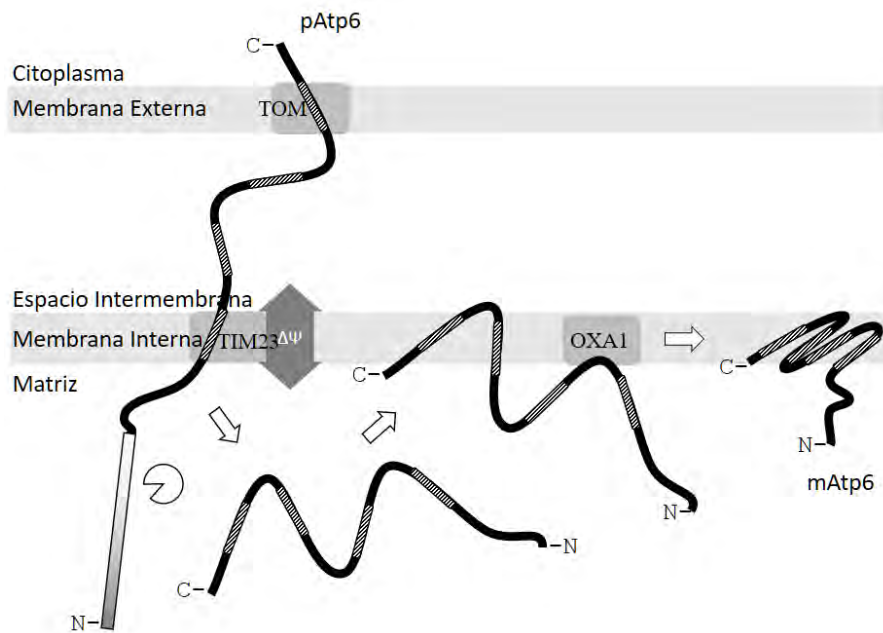


Figura 28. Modelo propuesto de importación de la subunidad Atp6. El modelo muestra a la subunidad en su forma de precursor (pAtp6) y a la forma madura de la subunidad (mAtp6).

No fue posible predecir bioinformáticamente a la proteasa que lleva a cabo la edición.

Se ha estudiado la secuencia de ensamblaje de la ATP sintasa en humanos y en levaduras, y se ha determinado que es un proceso en el que participan diversos factores proteicos que facilitan la formación

de módulos intermedios que finalmente se ensamblan para dar lugar a la enzima madura (Hejzlarová et al., 2014).

En levaduras y humanos se ha propuesto que las subunidades se asocian a través de dos líneas de ensamblado que convergen en la formación final del complejo ATP sintasa (Rak et al., 2011; Fujikawa et al., 2015), una que involucra a las subunidades que forman el dominio catalítico, el tallo rotatorio y el anillo oligomérico membranal, y otra en la que participan las subunidades del brazo periférico y las subunidades membranales del estator (Figura 29a). Uno de los últimos pasos en la unión de estos subcomplejos, es la asociación de la subunidad Atp6 (subunidad *a*) con el anillo oligomérico de la subunidad Atp9 (subunidad *c*; Wittig et al., 2010). Después de la formación de monómeros, la enzima se asocia en complejos díméricos al integrar subunidades pequeñas membranales, permitiendo que los dímeros de ATP sintasa sean estabilizados en la región membranal (Wagner et al., 2010). Es importante hacer notar aquí que las subunidades Atp6 y Asa6 participarían en la segunda línea de ensamblaje y probablemente en el último paso de formación de dímeros, siempre y cuando la biogénesis sea semejante a lo que ocurre en levadura.

Esta forma modular de ensamblado de la ATP sintasa parece conservarse en las F₁F₀-ATP sintasas, tanto de bacterias como de mitocondrias y cloroplastos (Rühle y Leister, 2015). Por ello lo más probable es que este mismo mecanismo se conserve aún en este grupo de algas clorofíceas que cambiaron completamente la composición del brazo periférico de su ATP sintasa (Figura 29b).

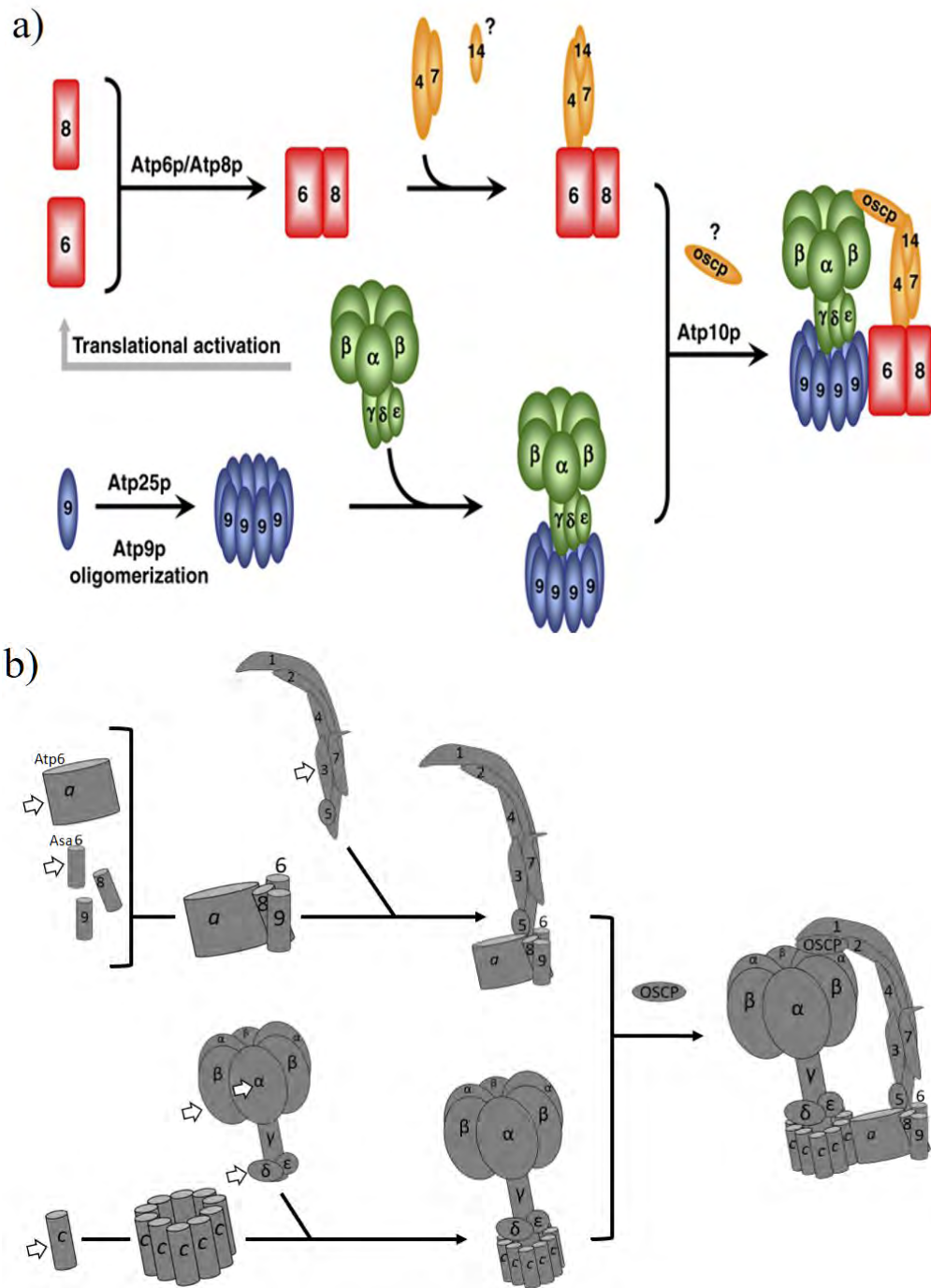


Figura 29. Modelo de ensamble modular de la ATP sintasa en a) humanos (Rak et al., 2010), y su posible equivalencia en la ATP sintasa de b) *P. parva* (Vázquez-Acevedo et al, 2016). Las flechas blancas en b) indican las subunidades inducidas en respuesta a la activación de la respiración en *C. reinhardtii* (Matsuo et al., 2011). Para *P. parva* los números corresponden al número de la subunidad Asa, y las letras a las subunidades conservadas (modificado de Vázquez-Acevedo et al., 2016)

En un análisis del transcriptoma de *Chlamydomonas reinhardtii* en el que se estudió la regulación retrógrada en respuesta a la respiración, se encontraron genes que son inducidos cuando el alga crece en un medio con acetato como fuente de carbono. En ese conjunto se encuentran genes que codifican enzimas del ciclo de Krebs y subunidades de los complejos de la fosforilación oxidativa. Los genes activados de la ATP sintasa fueron Atp1, Atp2, Atp4, Atp6, Atp9, Asa3 y Asa6 (Matsuo et al., 2011). Aunque no se ha descrito el mecanismo de la biogénesis de este complejo en algas verdes, estas subunidades encontradas podrían formar parte de cada uno de los subcomplejos de ensamblado que se describieron antes. El subcomplejo en el que Atp9 oligomeriza y se asocia con el dominio catalítico formado por las subunidades Atp1 y Atp2 asociadas con Atp4. Por otra parte, la subunidad Asa3 que forma parte del brazo periférico, debe asociarse con la subunidad membranal Asa6 y Atp6 formando el estator, que finalmente se conectaría con el subcomplejo anterior permitiendo la interacción Atp6 con el anillo de Atp9. Estas subunidades podrían ser importantes para el comienzo del ensamble del complejo, ya que son las subunidades que se expresan más en respuesta a una activación de la respiración.

CONCLUSIONES

Las subunidades Asa6 y Atp6 se importan a las mitocondrias de *P. parva* en el sistema *in vitro* utilizado, su internalización requiere de un gradiente electroquímico. Sin embargo, las proteínas internalizadas no se ensamblaron con el resto de las subunidades para formar un complejo dimérico de ATP sintasa *in vitro*.

La proteína Asa6 se distribuye sólo en el grupo de Chlamydomonadales, mismo en el que la subunidad Atp6 está codificada en el genoma nuclear. Atp6 es una proteína altamente hidrofóbica, pero presenta una disminución muy importante en la hidrofobicidad del extremo amino en su secuencia madura. Esta característica permite a la proteína ser importada hasta la matriz mitocondrial, desde donde debe incorporar sus segmentos hidrofóbicos horizontales a la membrana interna. Es muy probablemente que durante el ensamblado del complejo de la ATP sintasa mitocondrial exista una interacción importante entre las subunidades embebidas en la membrana interna Asa6 y Atp6.

PERSPECTIVAS

La posible topología atípica de la subunidad Atp6, una subunidad altamente conservada debido a la función primordial que desempeña, permite suponer que la estabilidad de la estructura tridimensional de la ATP sintasa del alga incolora está regulada por la interacción con las subunidades Asa, entre ellas Asa6, una proteína que se encarga de la dimerización del complejo. Resultaría muy interesante analizar el tipo de interacción que mantienen Asa6 y Atp6 en la región membranal, ya que podría arrojar información acerca de cómo se estabilizan estructuralmente estas dos subunidades. Es conveniente analizar a fondo y con otras herramientas la importación y ensamblaje de estas dos subunidades en el complejo ATP sintasa. El hecho de que todas las subunidades de este complejo mitocondrial estén codificadas en el genoma nuclear vuelve interesante a este grupo de organismos para estudiar cómo se coordina la biogénesis de esta enzima.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams KL, y Palmer JD. 2003. Evolution of mitochondria gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29:380-395.
- Allegretti M, Klusch N, Mills DJ, Vonck J, Kühlbrandt W, Davies KM. 2015. Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator *a*-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*, 1:1-4
- Atteia A, van Lis R y Beale SI. 2005. Enzymes of the Heme Biosynthetic Pathway in the Nonphotosynthetic Alga *Polytomella* sp. *Eukaryotic Cell*. 4(12): 2087-2097.
- Atteia A, Adrait A, Brugière S, Tardif M, van Lis R, Deusch O, Dagan T, Kuhn L, Gontero B, Martin W, Garin J, Joyard J, Rolland N. 2009. A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor. *Molecular Biology and Evolution*. 26(7): 1533-1548.
- Barbrook AC, Howe CJ, Kurniawan DP, y Tarr SJ. 2010. Organization and expression of organellar genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365: 785-797.
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, y Pfanner N. 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Reports*. 9: 42-49.
- Böttinger L, Ellenrieder L, y Becker T. 2015. How lipids modulate mitochondrial protein import. *Journal of Bioenergetic and Biomembranes*. 47:1-11.
- Burger G, Gray MW, y Lang BF. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics*. 19(2): 709-716.
- Cano-Estrada A, Vázquez-Acevedo M, Villavicencio-Queijeiro A, Figueroa-Martínez F, Miranda-Astudillo H, Cordeiro Y, Mignaco JA, Freire MM, 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797:1439-1448.
- Cardol P, González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, y Remacle C. 2005. The Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* Deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology*. 137(2): 447-459.
- Carrie C, Murcha MW, Whelan J. 2010. An *in silico* analysis of the mitochondrial protein import apparatus of plants. *BMC Plant Biology*. 10:249. 1-15.
- Dabbeni-Sala F, Rai AK, y Lippe G. 2012. F0F1 ATP Synthase: A fascinating challenge for proteomics. En: *Proteomics – Human diseases and protein Function*. Man TK, y Flores RJ. (Eds). InTech Open. Pp 161-188.
- Daley DO, Clifton R, Whelan J. 2002. Intracellular gene transfer: Reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome *c* oxidase. *PNAS*. 99(16): 10510-10515.
- Dimmer KS, Papić D, Schumann B, Sperl D, Krumpke K, Walther DM, Rapaport D. 2012. A crucial role for Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Journal of Cell Science*. 125: 3464–3473.

- Dunn DA, Pinkert CA. 2011. Nuclear expression of a mitochondrial DNA gene: Mitochondrial targeting of allotopically expressed mutant ATP6 in transgenic mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 541245:1-7.
- Endo T, Yamano K, Kawano S. 2011. Structural insight into the mitochondrial protein import system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 955-970.
- Ernster L, y Schatz G. 1981. Mitochondria: A Historical Review. *The Journal Of Cell Biology*. 91(3):227–255.
- Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, y Braun HP. 2004. Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 937-942.
- Figuroa-Martínez F, Funes S, Franzén LG y González-Halphen D. 2008. Reconstructing the Mitochondrial Protein Import Machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 179: 149–155.
- Figuroa-Martínez F, Vázquez-Acevedo M, Cortés-Hernández P, García-Trejo JJ, Davidson E, King MP, González-Halphen D. 2011. What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric *Cox3* and *Atp6* genes.
- Fujikawa M, Sugawara K, Tanabe T, Yoshida M. 2015. Assembly of human mitochondrial ATP synthase through two separate intermediates, F₁-c-ring and b–e–g complex. *FEBS Letters*. 589:2707-2712.
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1592: 63-77.
- Ge C, Spänning E, Glaser E, Wieslander Å. 2014. Import determinants of organelle-specific and dual targeting peptides of mitochondria and chloroplast in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. 7: 121-136.
- Geissler A, Krimmer T, Bömer U, Guiard B, Rassow J, Pfanner N. 2000. Membrane Potential-Driven Protein Import into Mitochondria. The Sorting Sequence of Cytochrome b2 Modulates the $\Delta\Psi$ -Dependence of Translocation of the Matrix-targeting Sequence. *Molecular Biology of the Cell*. 11:3977-3991.
- González-Halphen D, Pérez-Martínez X, Funes S, Reyes-Prieto A, y Santillán-Torres JL. 2003. La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. En: Mensaje Bioquímico. Flores OH, Riveros HR, Sosa AP, y Vázquez EC (Eds.), 27:201-220.
- Gornall AG, Bardawill CJ, y David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 177: 751-766.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- Hejzlarová K, Mráček T, Vrbacký M, Kaplanová V, Karbanová V, Nůsková H, Pecina P, Houštek J. 2014. Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase. *Physiological Research*. 63(Suppl.1): S57-S71.
- Huynen MA, Duarte I, y Szklarczyk R. 2013. Loss, replacement and gain of proteins at the origin of the mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1827:224-231.

- Jensen RE, Dunn CD. 2002. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1592: 25-34.
- Jiménez A. 2011. Importación de las subunidades COX2a y COX2b de la citocromo c oxidasa en las mitocondrias del alga incolora *Polytomella* sp. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México, DF.
- Jiménez-Suárez A, Vázquez-Acevedo M, Rojas-Hernández A, Funes S, Uribe-Carvajal S, González-Halphen D. 2012. In *Polytomella* sp. mitochondria, biogénesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1817(5): 819-827.
- Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. 2012. Mitochondrial ATP synthase:architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 35(2): 211-225.
- Kadenbach B. 2012. Introduction to Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. En: *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. Nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and pathophysiology*. Kadenbach B. (Ed). Springer New York Heidelberg Dordrecht London. p 6.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12): 1647-1649.
- Külbrandt W, Davies KM. 2016. Rotary ATPases:A new twist to an ancient machine. *Trends in Biochemical Sciences*. 41:106-116.
- Kulawiak B, Höpker J, Gebert M, Guiard B, Wiedemann N, y Gebert N. 2013. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1827: 612-626.
- Kutik S, Stroud DA, Wiedemann N, Pfanner N. 2009. Evolution of mitochondrial protein biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790:409-415.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 157:105-132.
- Lang BF. 2014. Mitochondria and the Origin of Eukaryotes. En: *Endosymbiosis*. Löfflerhardt W. Ed. Springer-Verlag Wien. 3-18.
- Lapaille M, Escobar-Ramírez A, Degan H, Baurain D, Rodríguez-Salinas E, Coosemans N, Boutry N, González-Halphen D, Remacle C, Cardol P. 2010. Atypical subunit composition of the Chlorophycean mitochondrial F1F0-ATP synthase and role of the ASA7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Molecular Biology and Evolution*. 27(7):1630-1644.
- Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, Sadlock J, Kwong JQ, Guy J, Schon EA. 2002. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nature Genetics*. 30:394-399.
- Margulis L. 1971. The Origin of Plant and Animal Cells. *American Scientist*. 59(2):230-235.

- Marom M, Azem A, Mokranjac D. 2011. Understanding the molecular mechanism of protein translocation across the mitochondrial inner membrane: Still a long way to go. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 990-1001.
- Matsuo M, Hachisu R, Tabata S, Fukuzawa H, Obokata J. 2011. Transcriptome analysis of respiration-responsive genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: Mitochondrial retrograde signaling coordinates the genes for cell proliferation with energy-producing metabolism. *Plant and Cell Physiology*. 52(2): 333-343.
- Meisinger C, Sickmann A, y Pfanner N. 2008. The Mitochondrial Proteome: From Inventory to Function. *Cell*. 134: 22-24.
- Melin J, Schulz C, Wrobel L, Bernhard O, Chacinska A, Jahn O, Schmidt B, Rehlinga P. 2014. Presequence recognition by the Tom40 channel contributes to precursor translocation into the mitochondrial matrix. *Molecular and Cell Biology*. 34(18): 3473-3485.
- Miranda-Astudillo H, Cano-Estrada A, Vázquez-Acevedo M, Colina-Tenorio L, Downie-Velazco A, Cardol P, Remacle C, Domínguez-Ramírez L, y González-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. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1837:1-13.
- Nicholls DG, y Ferguson SJ. 2013. The Cell Biology of the Mitochondrion. En: *Bioenergetics*. Nicholls DG, y Ferguson SJ (Eds). 4th Ed. Elsevier Ltd. USA. 303-325.
- Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA. 2002. An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit. *Molecular Biology of the Cell*. 13:3836-3844.
- Opalinska M, y Meisinger C. 2015. Metabolic control via the mitochondrial protein import machinery. *Current Opinion in Cell Biology*. 33:42-48.
- Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T. 2007. Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1F0 ATP synthase. *Molecular Biology of the Cell*. 18:627-635.
- Park K, Botelho SC, Hong J, Österberg M, Kim H. 2013. Dissecting stop transfer versus conservative sorting pathway for mitochondrial inner membrane protein *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(3): 1521-1532.
- Pérez-Martínez X, Antaramian A, Vázquez-Acevedo M, Funes S, Tolkunova E, d'Alayer J, Claros MG, Davidson E, King MP, González-Halphen D. 2001. Subunit II of Cytochrome c Oxidase in Chlamydomonad Algae Is a Heterodimer Encoded by Two Independent Nuclear Genes. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(14):11302-11309.
- Pérez-Martínez X, Funes S, Tolkunova E, Davidson E, King MP, González-Halphen D. 2002. Structure of nuclear-localized cox3 genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Current Genetics*. 40(6):399-404.
- Rak M, Gokova S, Tzagoloff A. 2011. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. *The EMBO Journal*. 30: 920-930.

- Rath A, Glibowickaa M, Nadeau VG, Chena G, Deber CM. 2007. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS*. 106(6): 1760-1765.
- Rodríguez-Salinas E, Riveros-Rosas H, Li Z, Fučíková K, Brand JJ, Lewis LA, González-Halphen D. 2012. Lineage-specific fragmentation and nuclear relocation of the mitochondrial *cox2* gene in chlorophycean green algae (Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 64: 166-176.
- Rühle T, Leister D. 2015. Assembly of F1-F0 ATP synthases. *Biochimica et Biophysica acta*. 1847 (9):849-860.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Extraction and purification of Plasmid DNA. En: *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1.25p.
- Schägger H, y Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chain of yeas and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*. 19(8): 1777-1783.
- Schulz C, Schendzielorz A, Rehling P. 2015. Unlocking the presequence import pathway. *Trends in Cell Biology*. 25(5): 265-275.
- Smith DR, Lee RW. 2014. A plastid without a genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *Plant Physiology*. 164(4): 1812-1819.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*. 286 (5445): 1700-1705.
- Stojanovski D, Bragoszewski P, Chacinska A. 2012. The MIA pathway: A tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1823: 1142-1150.
- Stuart RA. 2002. Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxal complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1592: 79-87.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Thornton N, Stroud DA, Milenkovic D, Guiard B, Pfanner N, Becker T. 2010. Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of α -helical outer membrane proteins. *Journal of Molecular Biology*. 396: 540-549.
- Tielens AGM, Rotte C, van Hellemond JJ, y Martin W. 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences*. 27(11): 564-572.
- Ting SY, Schilke BA, Hayashi M, Craig EA. 2014. Architecture of the TIM23 inner mitochondrial translocon and interactions with the matrix import motor. *The Journal of Biological Chemistry*. 289(41): 28689-28696.
- van Lis R, González-Halphen D, Atteia A. 2005. Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1708: 23-34.
- Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, González Halphen D. 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin

involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 38: 271-282.

Vázquez-Acevedo M, Rubalcava-Gracia D, González-Halphen D. 2014. *In vitro* import and assembly of the nucleus-encoded mitochondrial subunit III of cytochrome c oxidase (Cox3). *Mitochondrion*. 19 (B): 314-322.

Vázquez-Acevedo M, Vega-deLuna F, Sánchez-Vázquez L, Colina-Tenorio L, Remacle C, Cardol P, Miranda-Astudillo H, González Halphen D. 2016. Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1857(8):1183-1190.

Villavicencio-Queijeiro A, Vázquez-Acevedo M, Cano-Estrada A, Zarco-Zavala M, Tuena M, Mignaco JA, Freire MM, Scofano HM, Foguel D, Cardol P, Remacle C, González-Halphen D. 2009. The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 41:1-13.

Wagner K, Perschil I, Fichter CD, van der Laan M. 2010. Stepwise Assembly of Dimeric F₁F₀-ATP Synthase in Mitochondria Involves the Small F₀-Subunits k and i. *Molecular Biology of the Cell*. 21:1494-1504.

Wiedemann N, Frazier AE, y Pfanner N. 2004. The Protein Import Machinery of Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(15): 14473-14476.

Wittig I, Meyer B, Heide H, Steger M, Bleier L, Wumaier Z, Karas M, Schägger H. 2010. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits *a* and A6L. *1797:1004-1011*.

Woese CR, Kandler O, y Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organism: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87:4576-4579.

Zeng X, Neupert W, Tzagoloff A. 2007. The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. *Molecular Biology of the Cell*. 18:617-626.

Zhou A, Rohou A, Schep D, Bason J, Montgomery M, Walker J, Griogorieff N, Rubinstein J. 2015. Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM. *eLife*. 4(e10180):1-15.

APÉNDICE

Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad Atp6 de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Pichia angusta* (Pa), *Yarrowia lipolytica* (Yl), *Bos taurus* (Bt), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr) y *Polytomella parva* (Pp). El inicio de la proteína madura determinado experimentalmente en las secuencias de Sc, Cr y Pp se indica con las letras resaltadas en amarillo, mientras que el inicio de la primer alfa hélice horizontal en Pa, Yl y Bt se indica con letras resaltadas en azul, y en gris el cruce transmembranal ortodoxo. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW (Thompson et al, 1994)

	10	20	30	40	50	60
Sc	-----	-----	MFNLLNTYIT	S P	-----	LDQFEI
Pa	-----	-----	MTNYYINSP	-----	-----	LDQFII
Yl	-----	-----	MNFIINSP	-----	-----	LEQFTT
Bt	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cr	MALQQAAPR	--VFG--	LLGRAPVALGQSGIL	TGSSGFKNQGFNGSLQSVENHVYAQAFST		
Pp	MSVLSSVSMGSRIGSSLLGRSSAYLAQCGFSTRSN	-----	LNGSIDTSS	--SVFQALSS		
P.cons.	M2222222GS22GSSLLGR2223L3Q5NFYINSPGFKNQG2NGS22222NH22L2QFS2					
			Cruce transmembranal ortodoxo			
	70	80	90	100	110	120
Sc	RTLFLGLQSS	-FIDLSCNL	TTFS	SLYTIIVLLV	-----	ITSLYTLTN
Pa	NNLLEINSP	PFLNLSTLNF	STFS	SLYTLFVVLV	-----	ISLTFILSIGGE
Yl	RVYFGLSSG	-LINLDTITL	TSFS	SIYIAVVAL	-----	ILGFSILND
Bt	-----	MNENLFTSF	ITPVILGL	PLVTLIVLFP	-----	SLLFP
Cr	SSQEEQAAPS	IQGASGMKLP	MAG-	SMLL	GKSRSGLR	TGSMVFFAAQAMNMS
Pp	DNENKPAASPLN	-----	VKLPGMSCSS	ILLPKT	-----	SRIAVPFG-NQTMAMSSVRD
		:	:	:
P.cons.	RNFL2L2S2PFINLSTL2L2GFSLY2I2V22VRSGLR2222VPF2A2QI2L2STLNDGGE					
			Inicio de la proteína madura*			
	130	140	150	160	170	180
Sc	-NNNKIIGSR	WLISQEA	IYDTIMNMT	KGQ	-----	IGGKNWGLYFPMIF
Pa	SNNSLVKGS	NWLIAIEA	IFDTILNMV	KGQ	-----	IGGSVYGRYVPLVY
Yl	-NNTNILP	TRWSLAFES	LYFTVEK	MVSEQ	-----	IGGLEGRLLFPF
Bt	-----	LVSNRFVTL	QQWMLQLV	SKQMMS	-----	IHN
Cr	-VQSGATV	NSLLGLIYR	FWRSQAPMDKPHAPVDDRMLPAIVDAS	DNRAALGTWATALFCT		
Pp	-VKTGSLP	TNFLTGVYR	FWRSQNP	AEKPHDPVNDRLLP	AVDAS	DKRASIGTWAT
	.	:
P.cons.	SNN2GIL23RWL322E2222T363MVK2Q2PV2DR2LPA2VIGG2222L22P2A2TLF2F					
		Inicio de la primer hélice horizontal*				
	190	200	210	220	230	240
Sc	IFIANLIS	MIPYSFALS	AHLVFIISLS	IWIWLGNTIL	GLYKHGWVFFS	LFVPAGT
Pa	ILVANLIG	MVYPNFALS	ASLIYIIGIS	VSLWIGLTI	LGLFLNKAVFFS	LFVPSGT
Yl	ILIANVVS	SLVPYSYA	INAQLIWTI	GLSVAIWIG	CTLTGLANHGAK	FFGLFLPSGT
Bt	IGSTNLL	GLLPHSFT	PTTQLSMNL	GMAIPLWAGAVIT	GFRNKTKASL	AHF
Cr	ILASNLL	GLVPTNEAPT	SGLGFATGL	GVSVWATAT	TILGLYKLGFS	FPGHFI
Pp	IISCNLL	GMLPFNEAPT	SGLGFATGL	GVSVWATAT	IILGLSKTGFK	FPGHFI
	*	*:..:*	:.:.*	..:*	.*	.** ** *

P.cons. IL2ANLLGLVPY2FAPTA2L2F2IGLSVS3WAGATILGLYKHG22FFG2F3P2GTPLPLV

```

                250      260      270      280      290      300
                |        |        |        |        |        |
Sc      PLLVIEETLSYFARAISLGLRLGNSNILAGHLLMVILAGLTFNFMLINLFTLVF--GFVPL
Pa      PVLVLIIELLSYTARAISLGLRLAANTLSGHLLMSILGNLVKNLMSINYFTFIF--GLIPL
Yl      PVLVIEELLSYIARALSGLRLGNSNILAGHLLLVILAGLILNFISISIFTFAL--GILPL
Bt      PMLVIEETISLFIQPMALAVRLTANITAGHLLIHLIGGATLALMSIS-TTT----ALITF
Cr      FIFVPLETISYTFRAVSLGVRLWVNMLAGHTLLHILTCMALALPFSLSFFAMVPATFAVA
Pp      FIFVPLETISYTFRAVSLGVRLWVNMLAGHTLLHILTCMALALPFSLGFFSMVPATFGVC
          :::* :* :*  :::*:*:* *  :** * : : : .  :  :

```

P.cons. P2LVIIET2SYTARA2SLG2RL23NILAGHLLLHIL3GL2L2LMSI35FTFM2PAGFIPL

```

                310      320      330      340
                |        |        |        |
Sc      AMILAIMMLEFAIGIIQGYVWAILTASYLKDAVYLH-----
Pa      AGIFAIIVILEFAIACIQAYVFAILTSSYLKDSIYLH-----
Yl      SILLGIVALESAIAFIQAVFTILTCSYIKDAIHLH-----
Bt      TILILLTILEFAVAMIQAYVFLLVSLYLDHNT-----
Cr      CLLSALVGLEYLVAVLQSGVFSILSTVYVGEFNNSVKLAGPLAKVVKKAL
Pp      CLLSALVGLEYLVAVLQSGVFSILSTVYVGEFNHDKFIGPAAKIVKKIH
          : : ** .. :* . *:::* * : :

```

P.cons. 22L2A2V2LEFA2AVIQAYVF3ILT2SYLKD222LH22GP2AK2VKK22

Alignment data :

```

Alignment length : 349
Identity (*) : 27 is 7.74 %
Strongly similar (:): 45 is 12.89 %
Weakly similar (.) : 15 is 4.30 %
Different : 262 is 75.07 %
Sequence 0001 : Sc ( 259 residues).
Sequence 0002 : Pa ( 261 residues).
Sequence 0003 : Yl ( 255 residues).
Sequence 0004 : Bt ( 226 residues).
Sequence 0005 : Cr ( 340 residues).
Sequence 0006 : Pp ( 327 residues).

```

CLUSTALW options used :

```

endgaps=1
gapdist=8
gapext=0.2
gapopen=10.0
hgapresidues=GPSNDQERK
matrix=gonnet
maxdiv=30
outorder=aligned
pwgapext=0.1
pwgapopen=10.0
pwmatrix=gonnet
type=PROTEIN

```