



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES HIDROFÓBICAS

QUE CONFORMAN EL BRAZO PERIFÉRICO DE LA

ATP SINTASA DEL ALGA INCOLORA *Polytomella* sp.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)

PRESENTA

LORENZO SÁNCHEZ VÁSQUEZ

TUTOR

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. DANIEL A. FERNÁNDEZ VELASCO

FACULTAD DE MEDICINA

DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA

Agosto, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Fisiología Celular por la oportunidad de realizar estudios de posgrado.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Diego González Halphen en el laboratorio 324-Norte del Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco el apoyo técnico de la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo durante la realización del presente trabajo.

Asimismo, estoy agradecido por la ayuda del Sr. Alfredo Octaviano García.

Agradezco el apoyo técnico del Dr. Francisco Javier De la Mora Bravo, así como la colaboración y asesoría del Dr. Georges Dreyfus Cortés del laboratorio 222-Norte, Departamento de Genética Molecular, IFC, UNAM.

Se reconoce el apoyo de: la Dra. Laura Ongay Larios, M. en C. Dolores Minerva Mora Cabrera y la Biól. María Guadalupe Códiz Huerta de la Unidad de Biología Molecular; al MVZ Héctor Alfonso Malagón Rivero del Bioterio; a los Ingenieros Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega de la Unidad de Cómputo; y a Sara Méndez Ibáñez de la Coordinación de Enseñanza del IFC UNAM.

Se agradece a las fuentes de financiamiento: donativo no. 239219 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México); donativo no. 245486 de la Cooperación Bilateral México-Bélgica (CONACyT-FNRS); y al donativo no. IN203311 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, México). El sustentante recibió la beca 128110 del CONACyT.

El comité de cambio de tutor y proyecto estuvo integrado por:

Dra. Marietta Tuena Sangri (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Dr. Alejandro Sosa Peinado (Facultad de Medicina, UNAM).

Dr. Antonio Peña Díaz (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

El jurado del examen de candidatura estuvo constituido por:

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid (FES Iztacala, UNAM).

Dra. Adela Rodríguez Romero (Instituto de Química, UNAM).

Dr. José de Jesús García Trejo (Facultad de Química, UNAM).

Dr. Óscar Flores Herrera (Facultad de Medicina, UNAM).

Dr. Salvador Uribe Carvajal (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco (Facultad de Medicina, UNAM).

Dr. Salvador Uribe Carvajal (IFC, UNAM).

Dr. Diego González Halphen (IFC, UNAM).

El jurado de examen doctoral estuvo constituido por:

Dra. Irma Romero Álvarez (Facultad de Medicina, UNAM).

Dra. Sobeida Sánchez Nieto (Facultad de Química, UNAM).

Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig (Instituto de Química, UNAM).

Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

Dr. Edgar Morales Ríos (CINVESTAV, Unidad Zacatenco).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcia Hiriart por autorizar mi estadía en el IFC-UNAM durante la realización de mis estudios de doctorado.

A mis ex-compañeros de laboratorio Ale, Sara Luz, Félix, Jean-Baptiste, Aaron y Giovani por su paciencia, consejos y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Diego por recibirme en su laboratorio, por todas sus sugerencias, discusiones, consejos, paciencia y apoyo. Sería difícil expresar mi gratitud con palabras. Simplemente ... ¡Muchas gracias!

A mis compañeros que me apoyaron en un principio Luis Pablo, Paola, Mónica y Ana.

A mis compañeros de laboratorio: el Sr. Alfredo, Ale, Héctor, Lili, Alexa, Félix (El hijo pródigo), Diana (por su ayuda alimentaria), Emma (El pequeño), Miriam & Ricardo (☺), al Dr. Patrice Hamel (Don Patricio) y el Dr. Diego (El Doc) por su apoyo, paciencia, consejos y convivencia en el laboratorio.

Le agradezco también a Rosario (Chayo) y Gaby por los buenos momentos.

A mis amigos Abi, Iveth, Monse, Dany (Negrito), Eder, Emmanuel (Nene), Ernesto, Fabio, Omar (Yisus), Pablo, Misa, y Nef que me acompañaron a lo largo mis estudios de doctorado por su apoyo, consejos, ayuda, y muchas, muchas chelas ... ¡Gracias por su amistad!

Quiero agradecer especialmente a:

Al Dr. Jesús Samuel Cruz Sánchez.

(Requiescat in pace).

Al Dr. Diego González Halphen.

Quando le parole e gli insegnamenti restano impressi dentro, vuol dire che hanno funzionato!

Nel mio cuore e nella mia mente rimbombano ancora le nostre chiacchierate...

A mis padres (Guadalupe & Lorenzo) y familiares.

En particular a mi mamá y hermano (Francisco ☺).

Por estar siempre presentes, ya que sin su apoyo, consejos y confianza no lo hubiera logrado.

A Nadia.

Te agradezco infinitamente por darme tu amor, apoyo y confianza.

Por regalarme y compartir inolvidables y valiosos momentos en mi vida.

“Lo más auténtico que tenemos es nuestra capacidad de crear, de superar cosas y de resistir, de transformar, de amar y de ser más grandes que nuestro sufrimiento”.

Ben Okri

"Alea iacta est".

Menandro, frecuentemente atribuida a Julio César

Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática de las ATPasas rotatorias

Figura 2. Organización polipeptídica de las F₁F₀-ATP sintasas

Figura 3. Mecanismo de la síntesis de ATP

Figura 4. Comparación estructural de la ATP sintasa de diferentes organismos

Figura 5. Modelo del proceso de translocación de los protones

Figura 6. Modelos estructurales de la F₁F₀-ATP sintasa de *Pichia angusta* y *Yarrowia lipolytica*

Figura 7. Estructuras oligoméricas de la ATP sintasa de diferentes organismos

Figura 8. Modelo de la organización de las estructuras oligoméricas de la ATP sintasa

Figura 9. Algas clorofíceas

Figura 10. Análisis en geles azules nativos de los complejos mitocondriales de diferentes organismos

Figura 11. Composición polipeptídica de la ATP sintasa de las algas clorofíceas

Figura 12. La ATP sintasa dimérica del alga *Polytomella*

Figura 13. Modelo de crío-microscopía electrónica de la F₁F₀-ATP sintasa de *Polytomella*

Figura 14. Comparación del modelo experimental y teórico de la subunidad *a* de la ATPasa del alga

Figura 15. Modelo de topología de las subunidades Asa en la F₁F₀-ATP sintasa de *Polytomella* sp.

Figura 16. Modelo topológico de membrana de las subunidades hidrofóbicas Asa

Figura 17. Modelos teóricos tridimensionales de Asa6, Asa8 y Asa9

Figura 18. Perfiles de hidropatía de la subunidad *a* del complejo enzimático del alga *Polytomella* y la bacteria *E. coli*

Figura 19. Gráfica de hidrofobicidad para las regiones N- y C- terminal de la subunidad *a* de diferentes organismos

- Figura 20. Modelo tridimensional de la subunidad *a* de la ATP sintasa de *E. coli* y *Polytomella*
- Figura 21. Productos de amplificación de las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella*
- Figura 22. Expresión de las subunidades Asa marcadas con una etiqueta de histidina
- Figura 23. Cuerpos de inclusión de las subunidades Asa marcadas con una etiqueta de histidina
- Figura 24. Complejo V de *Polytomella* sp. y las subunidades recombinantes Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His} purificadas
- Figura 25. Anticuerpos empleados en el presente trabajo
- Figura 26. Interacción de la subunidad Asa8 con Asa9 y Asa6 ensayadas por inmunorréplica tipo Far-Western
- Figura 27. Las subunidades recombinantes Asa6 y Asa8 se asocian formando homo-dímeros mediante Copu-CAf
- Figura 28. Asociación hetero-dimérica de las subunidades recombinantes Asa6, Asa8 y Asa9 mediante Copu-CAf
- Figura 29. Interacción de las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 a través del Y2H
- Figura 30. Productos de entrecruzamiento de la ATP sintasa de *Polytomella*
- Figura 31. Arquitectura membranal de la ATP sintasa de distintos organismos.
- Figura 32. Modelo de la organización estructural de las subunidades del dominio membranal de la ATP sintasa de *Polytomella*
- Figura 33. Inmunorréplica tipo Far-Western (F-WB)
- Figura 34. Co-purificación por cromatografía de afinidad (Copu-CAf)
- Figura 35. Sistema del doble híbrido en levadura (Y2H)

Lista de tablas

Tabla I. Proteínas y subunidades asociadas a la F₁F₀-ATP sintasa de diferentes organismos

Tabla II. Construcciones empleadas en el presente trabajo

Tabla III. Pares de interacción ensayados mediante la inmunorréplica tipo Far-Western

Tabla IV. Pares de interacción de las subunidades Asa recombinantes con el complejo nativo de *Polytomella* mediante la inmunorréplica tipo Far-Western

Tabla V. Ejemplo de pares de interacción ensayados para Asa6 mediante Y2H

Tabla VI. Productos de entrecruzamiento obtenidos

Lista de cuadros

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la amplificación de las subunidades

Cuadro 2. Condiciones de reacción para la amplificación de las subunidades

Cuadro 3. Mezcla para la reacción de poli-adenilación de los amplicones

Cuadro 4. Reacción de ligación en el vector comercial

Cuadro 5. Reacción de doble digestión con enzimas de restricción

Cuadro 6. Reacción de desfosforilación del vector de expresión

Cuadro 7. Reacción de ligación inserto-vector (relación 3:1)

ANEXOS

Lista de figuras

Figura 1. Resultados de predicción de estructura secundaria para Asa6

Figura 2. Resultados de predicción de estructura secundaria para Asa8

Figura 3. Resultados de predicción de estructura secundaria para Asa9

Figura 4. Análisis de las secuencias Asa1, Asa3 y Asa5

Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencia de las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 con varios miembros de las algas clorofíceas

Figura 6. Interacción de las subunidades recombinantes con el complejo nativo de *Polytomella* por inmunorréplica tipo Far-Western

Figura 7. Ensayo de interacción de la subunidad Asa8 con Asa9 y Asa6 por inmunorréplica tipo Far-Western

Figura 8. Ensayo de interacción de Asa9 por co-purificación mediante cromatografía de afinidad

Figura 9. Interacción de las subunidades *a*, *c* y Asa6 a través del Y2H

Figura 10. Productos de entrecruzamiento de la ATP sintasa de *Polytomella*

Lista de tablas

Tabla I. Cebadores empleados para la amplificación de las subunidades de *Polytomella*

Tabla II. Soluciones porcentuales empleadas para el gradiente de glicerol

Tabla III. Mezclas para geles de tricina SDS-PAGE

Tabla IV. Características de los agentes entrecruzantes empleados

Tabla V. Características de las cepas de *E. coli* empleadas

Tabla VI. Asa6: segmentos helicoidales y su topología membranal

Tabla VII. Asa8: segmentos helicoidales y su topología membranal

Tabla VIII. Asa9: segmentos helicoidales y su topología membranal

Contenido

RESUMEN	15
ABSTRACT.....	16
LISTA DE ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	19
Las ATPasas rotatorias.....	19
La F ₁ F ₀ -ATP sintasa	21
Composición polipeptídica de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa	24
Mecanismo de la translocación de protones.....	28
Organización del dominio membranal de la ATP sintasa mitocondrial.....	30
Algas clorofíceas	35
La F ₁ F ₀ -ATP sintasa de las algas clorofíceas	36
HIPÓTESIS.....	44
JUSTIFICACIÓN	45
OBJETIVOS	46
Objetivo general	46
Objetivos específicos.....	46
RESULTADOS.....	47
Análisis bioinformático de las subunidades asociadas al dominio membranal de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp.	47
Análisis de estructura secundaria y topología de membrana de las subunidades Asa	47
Análisis de hidropatía del amino terminal de la subunidad <i>a</i>	50
Producción heteróloga de las subunidades hidrofóbicas de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i>	55
Clonación de las subunidades recombinantes	55
Sub-clonación en vectores de expresión y producción recombinante	56
Purificación de las subunidades Asa recombinantes	58
Generación de anticuerpos de las subunidades Asa6, 8 y 9 recombinantes.....	59
Ensayos de interacción de las subunidades del dominio membranal de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i>	61
Interacciones in vitro de las subunidades Asa del dominio membranal.....	61
Inmunorréplica tipo Far-Western	62
Co-purificación mediante cromatografía de afinidad.....	65

Interacciones in vivo de las subunidades Asa del dominio membranal mediante el sistema del doble híbrido en levadura	70
Ensayos de entre-cruzamiento con la ATP sintasa de <i>Polytomella</i>	72
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS	83
MATERIALES Y MÉTODOS	84
Cultivo del alga incolora <i>Polytomella</i> sp.	84
Obtención de las mitocondrias del alga.....	84
Purificación de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp.....	85
Análisis de proteínas	86
Determinación de la concentración de proteína por el método de Markwell	86
Electroforesis en gel de poliacrilamida	86
Inmunorréplica tipo Western	87
Ensayos de entrecruzamiento con el complejo enzimático nativo del alga <i>Polytomella</i>	88
Obtención de las subunidades recombinantes	89
Clonación de los genes de las subunidades de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp.	89
Preparación de células competentes y transformación por choque térmico por el método de KCM	91
Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	92
Clonación en vectores de expresión y producción recombinante de las subunidades.....	94
Purificación de las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión	95
Generación de anticuerpos a partir de las subunidades recombinantes	96
Ensayos de interacción proteína-proteína mediante la inmunorréplica tipo Far-Western	97
Ensayos de interacción proteína-proteína a través de la co-purificación por cromatografía de afinidad	98
Ensayos de interacción proteína-proteína mediante el sistema del doble híbrido en levadura	100
Análisis bioinformático de las subunidades Asa de <i>Polytomella</i> sp.	102
REFERENCIAS.....	104
ANEXOS	114
ANEXO I: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SUBUNIDADES ASOCIADAS AL DOMINIO MEMBRANAL DE LA ATP SINTASA DE <i>Polytomella</i>	114
ANEXO II: CEBADORES	123

ANEXO III: ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL DOMINIO MEMBRANAL DE LA ATP SINTASA DE <i>Polytomella</i>	124
ANEXO IV: REACTIVOS, AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES.....	130
APÉNDICE.....	155
Artículos publicados.....	155
(i) Near-neighbor interactions of the membrane-embedded subunits of the mitochondrial ATP synthase of a chlorophycean alga	155
(ii) Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae ...	155
(iii) Topología y función de las subunidades intrínsecas de la membrana de las F ₁ F ₀ -ATP sintasa mitocondriales	155

RESUMEN

La F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial del alga clorofícea *Polytomella* sp. puede aislarse como un complejo dimérico altamente estable de 1,600 kDa. Éste se compone de ocho subunidades ortodoxas conservadas (α , β , γ , δ , ϵ , OSCP, *a* y *c*) y de nueve subunidades (Asa1-9) exclusivas de las algas clorofíceas. Las subunidades Asa sustituyen a las que componen el tallo periférico y los dominios de dimerización de la ATP sintasa en otros organismos. Poco se sabe sobre la disposición de las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9, para las cuáles se predicen segmentos transmembranales, que junto con la subunidad *a* y el anillo de subunidades *c*₁₀ parecen constituir el dominio membranal F₀ de la ATP sintasa del alga. En el presente trabajo, las tres subunidades hidrofóbicas Asa se obtuvieron de manera recombinante empleando un sistema de expresión bacteriano y se purificaron por cromatografía de afinidad. Lo anterior, con la finalidad de explorar sus vecindades empleando diversas técnicas de interacción proteína-proteína *in vitro* en combinación con técnicas inmunoquímicas, así como el sistema *in vivo* del doble híbrido en levadura. Los resultados obtenidos sugieren las siguientes interacciones Asa6-Asa6, Asa6-Asa9, Asa8-Asa8 y Asa8-Asa9. Asimismo, experimentos de entrecruzamiento con el complejo enzimático del alga corroboraron algunas de estas interacciones. Con base en estos resultados, proponemos un modelo de la disposición de estas subunidades hidrofóbicas en el sector membranal de la ATP sintasa del alga. También proponemos, a partir del análisis de secuencias y de los diagramas de hidrofobicidad, que la subunidad *a* de algas es atípica en el sentido que carece del primer segmento transmembranal, presentando sólo cuatro alfa hélices hidrofóbicas inclinadas.

ABSTRACT

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase from the chlorophycean algae *Polytomella* sp. can be isolated as a highly stable dimeric complex of 1,600 kDa. It is composed of eight orthodox highly conserved subunits (α , β , γ , δ , ϵ , OSCP, *a*, and *c*) and nine subunits (Asa1-9) that are exclusive of the chlorophycean algae. The Asa subunits replace those that build up the peripheral stalk and the dimerization domains of the ATP synthase in other organisms. Little is known about the disposition of subunits Asa6, Asa8 and Asa9, that are predicted to have transmembrane stretches and that along with subunit *a* and a ring of *c*-subunits, seem to constitute the membrane-embedded F₀ domain of the algal ATP synthase. In this work, the three Asa hydrophobic subunits were over-expressed employing a bacterial system and purified by affinity chromatography. We explored their interactions *in vitro* using a combination of immunochemical techniques, and *in vivo* yeast-two hybrid assays. The results suggest the interactions between Asa6-Asa6, Asa6-Asa9, Asa8-Asa8 and Asa8-Asa9. Cross-linking experiments carried out with the intact enzyme corroborated some of these interactions. Based on these results, we propose a model of the disposition of these hydrophobic subunits in the membrane-embedded sector of the algal ATP synthase. We also propose, based on sequence analysis and hydrophobicity plots, that the algal *a* subunit is atypical, it lacks the first transmembrane stretch, exhibiting only four hydrophobic, tilted alpha helices.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	Proteína asociada a la ATP sintasa
ATP	Adenosín trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato de <i>p</i> -toluidina
BN-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas con azul de Coomassie
BSA	Albúmina sérica bovina
BS³	Bis(sulfosuccinimidil)suberato
Copu-CAf	Co-purificación por cromatografía de afinidad
Cryo-EM	Crío-microscopía electrónica
Cryo-ET	Crío-tomografía electrónica
DEAE	Dietilaminoetil
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DSP	Ditiobis(succinimidil)propionato
DSS	Disuccinimidilsuberato
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
DTSSP	3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidil)propionato
EDTA	Ácido etildiamiltetracético
EIM	Espacio Inter Membranal
EMD	Base de datos de microscopía electrónica

FPLC	Cromatografía rápida líquida de proteínas
F-WB	Inmunorréplica tipo Far-Western
HR-E	Hélice re-entrante
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IPP	Interacción proteína-proteína
LB	Luria Bertani
MM	Matriz Mitocondrial
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MTS	Secuencia de direccionamiento mitocondrial
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
NBT	Azul de cloruro de nitro-tetrazolio
pb	Pares de base
PDB	Base de datos de proteínas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SS DNA	ADN de hebra sencilla de esperma de salmón
STM	Segmento TransMembranal
TEMED	Tetrametiletildiamina
TLCK	N- α -tosil-L-fenilalanina clorometilcetona
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Y2H	Sistema del doble híbrido en levadura
6His	Etiqueta de seis histidinas

INTRODUCCIÓN

Las ATPasas rotatorias

Las adenosín trifosfatasa de tipo A-, F- y V- (Figura 1) son una familia de complejos proteicos de membrana considerados, por su mecanismo de acción enzimático, como motores moleculares implicados en la conversión de energía en los sistemas biológicos (Stewart *et al.*, 2013), ya que pueden aprovechar un gradiente electroquímico de iones para la síntesis o hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) (Rawson *et al.*, 2016). Los miembros de esta familia provienen de un ancestro común, una bomba de protones impulsada por ATP que evolucionó en una ATP sintasa, es decir, un complejo enzimático capaz de sintetizar ATP ya sea aprovechando la energía derivada de la luz solar o de la oxidación de los sustratos no fermentables. De igual forma, se ha propuesto que la ATP sintasa de las arqueas tuvo modificaciones posteriores que dieron lugar a una bomba de protones dentro de las vacuolas de las células eucariotas (Cross & Taiz, 1990; Cross & Müller, 2004).

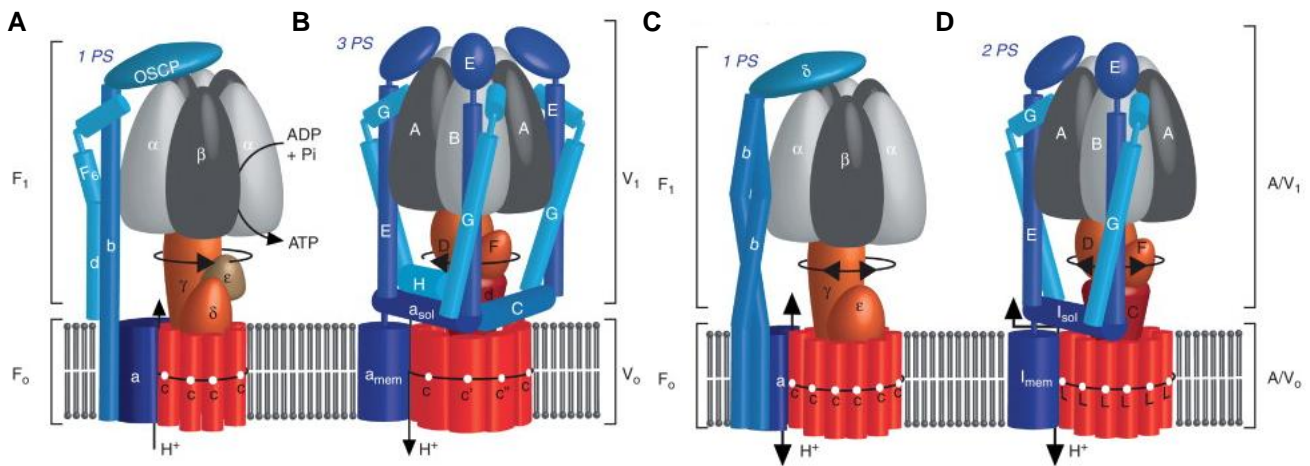


Figura 1. Representación esquemática de las ATPasas rotatorias. La figura muestra las principales subunidades que componen a la F-ATP sintasa mitocondrial eucariote (A), la V-ATPasa eucariote (B), la F-ATPasa/ATP sintasa bacteriana (C), así como la V-ATPasa bacteriana y la A-ATPasa de arqueas (D), estas últimas comparten la misma estructura. Las flechas indican el sentido del movimiento de iones H⁺ a través de la membrana. PS significa brazo periférico, siendo uno para las ATPasas de tipo F, dos para las de tipo A/V en procariontes y tres para las de tipo V en eucariotes. Modificado de (Stewart *et al.*, 2014).

In vivo, las ATPasas de tipo A- y F- se encuentran en la membrana plasmática de arqueas y bacterias, respectivamente. En cambio, los eucariontes poseen tanto las F-ATPasas, en la membrana interna mitocondrial y en la membrana tilacoidal del cloroplasto, como las V-ATPasas, en el sistema endomembranal y en las vesículas de secreción (Wilkins, 2013).

Las ATPasas de tipo F- son las más caracterizadas y se hablará de ellas con mayor detalle más adelante. Brevemente, éstas aprovechan el potencial electroquímico de iones para la síntesis de ATP. Por su parte, las ATPasas de tipo V- utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para el transporte de iones a través de la membrana, produciendo un gradiente electroquímico utilizado como fuente de energía para el transporte secundario celular. Por último, la ATPasa de tipo A- puede funcionar como una ATP sintasa o como una bomba de iones (Muench *et al.*, 2011). En este sentido, en algunas bacterias extremófilas, como *Thermus thermophilus*, se ha descrito una A-/V-ATPasa bifuncional (Wilkins, 2013). Asimismo, basados en su composición polipeptídica y en la secuencia primaria de sus subunidades, las ATPasas de tipo A- y V- se encuentran más relacionadas filogenéticamente, aunque funcionalmente la primera se asemeja más a las de tipo F (Figura 1) (Muench *et al.*, 2011).

A pesar de la diversidad de función de las ATPasas rotatorias, todos los miembros de esta familia se pueden dividir estructuralmente en dos regiones (Figura 1): (i) un dominio hidrofílico llamado $A_1/F_1/V_1$, acoplado por un brazo periférico y un tallo rotor central, y (ii) otro hidrofóbico llamado $A_0/F_0/V_0$, por lo que a estos complejos enzimáticos se les conoce también como A_1A_0 -ATPasa, F_1F_0 -ATPasa y V_1V_0 -ATPasa (Wilkins, 2013). A su vez, la región extrínseca de membrana se encuentra formando un hexámero globular compuesto por las subunidades catalíticas A_3/B_3 para las ATPasas de tipo A- y V-, y α_3/β_3 para las de tipo F- (con la estequiometría indicada en subíndices). En el tallo rotor central se encuentran las subunidades $C_1/D_1/F_1$ para la A-, $d_1/D_1/F_1$ para la V- y $\gamma_1/\delta_1/\epsilon_1$ (en eucariontes) para la F-ATPasa. En lo que respecta al brazo periférico, las ATPasas de tipo A- presentan un doble brazo compuesto por las subunidades E_2/G_2 , las de tipo V- tienen un triple brazo formado por las subunidades $E_3/G_3/H_1/C_1$, mientras que las de tipo F- tienen un sólo brazo constituido por las subunidades $b_1/b'_1/\delta_1$ en procariontes y $b_1, d_1, F_{6(1)}, OSCP_1$ en eucariontes. Por otra parte, en el dominio membranal, se encuentran la subunidad *I* en las V-ATPasas, y la subunidad *a* en las A- y F-ATPasas; así como un oligómero en forma de anillo compuesto por el multiméromo de subunidades *K* en las A-; subunidades *c, c', c''* en las V- y *c* en las F-ATPasas. En este último caso, el número de subunidades de *c* que componen a cada oligómero varía de acuerdo a la especie, encontrando tamaños de anillos desde

ocho (*Bos taurus*, c_8) hasta catorce subunidades (*Spinacea oleracea*, c_{14}). En este aspecto, la subunidad *c* de las ATPasas de tipo F- está compuesta por dos alfa hélices membranales unidas por una horquilla, en tanto que en las ATPasas de tipo A- y V- presentan dos o más de estos cruces de membrana. Aunado a lo anterior, a diferencia de las ATP sintasas bacterianas y del cloroplasto, o las ATPasas de tipo V- y A-, todas las F-ATPasas mitocondriales conocidas forman dímeros en la membrana *in vivo* (Kühlbrandt & Davies, 2016).

La F₁F₀-ATP sintasa

La F₁F₀-ATP sintasa, F₁F₀-ATPasa o complejo V (EC 3.6.3.14) produce la mayoría del ATP celular en los eucariontes y en las bacterias. Este complejo enzimático se encuentra en las membranas transductoras de energía, como la membrana interna mitocondrial, la membrana tilacoidal del cloroplasto y la membrana plasmática bacteriana (Domínguez-Ramírez & Tuena de Gómez-Poyou, 2003) (Figura 2). En eucariontes, la ATP sintasa utiliza el potencial electroquímico generado por los complejos de la cadena respiratoria o fotosintética para sintetizar ATP (Leyva *et al.*, 2003). En bacterias, esta enzima puede aprovechar como fuerza impulsora tanto el gradiente de protones como el de iones sodio, como en *Propionigenium modestum* y *Acetobacterium woodii* (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996).

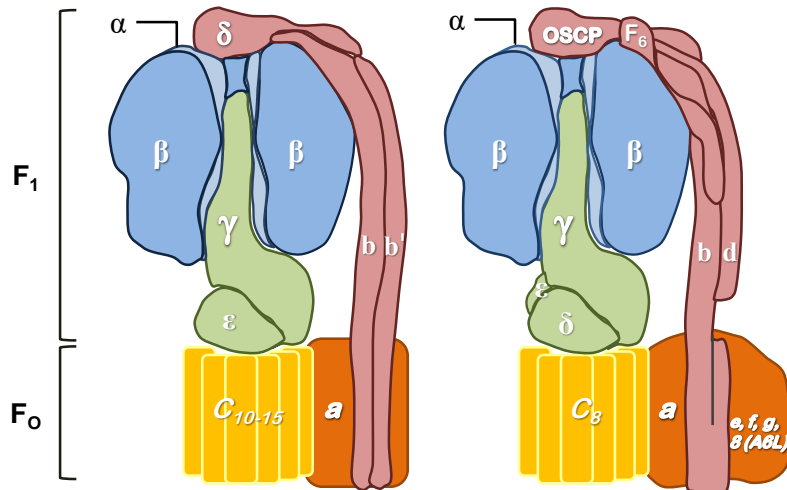


Figura 2. Organización polipeptídica de las F₁F₀-ATP sintasas. Las F-ATPasas bacterianas y cloroplastídicas se muestran a la izquierda, mientras que la mitocondrial se encuentra a la derecha. La parte superior de cada modelo contiene a las subunidades catalíticas ($\alpha_3\beta_3$ en azul) del dominio F₁. Una de las tres subunidades α ha sido removida para exponer a la subunidad γ (verde), cabe resaltar que ésta abarca desde el eje central del dominio catalítico hasta el anillo de subunidades de c (amarillo) y la subunidad a (naranja). De igual forma, el brazo periférico (rojo) de cada modelo se muestra a la derecha. En algunas bacterias está compuesto por la subunidad δ y el dímero de subunidad b . Mientras que en otras especies bacterianas, así como en la enzima cloroplastídica, las dos subunidades b son copias homólogas, pero no idénticas (subunidad b y b'). En la enzima mitocondrial, el brazo periférico (rojo) lo componen una copia de las subunidades b , d y F_6 . El dominio membranaral de la enzima mitocondrial contiene subunidades con una hélice transmembranaral ($e, f, g, 8$ ó A6L en naranja), las cuales no se encuentran en las ATPasas bacterianas y cloroplastídicas. Modificado de (Walker, 2013).

Por otra parte, la F₁F₀ puede funcionar como una ATP sintasa (síntesis de ATP) o una ATPasa (hidrólisis de ATP). Dicha regulación está determinada por la disponibilidad de los sustratos ADP y Pi, así como por el potencial electroquímico. Cuando este potencial se colapsa parcial o totalmente, la actividad de ATPasa se favorece, puesto que el bombeo de los protones en el sentido reverso restablece al mismo. En la naturaleza han surgido otros mecanismos para controlar la rotación intrínseca de la enzima favoreciendo la actividad de síntesis y previniendo la hidrólisis excesiva de ATP (García-Trejo & Morales-Ríos, 2008). En la ATP sintasa mitocondrial, el regulador natural es la proteína inhibidora (*IF₁*) (Pullman & Monroy, 1963). En bovino, se ha propuesto que la *IF₁* a través de su dominio N-terminal es capaz de bloquear los cambios conformacionales de la subunidad catalítica β , además de interferir con la rotación de las subunidades γ y ε (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002). La ATP sintasa bacteriana posee un mecanismo similar, en el cual las dos hélices alfa de la subunidad ε impiden la rotación de la subunidad γ del complejo enzimático y de esta forma auto inhibe la rotación de la enzima

en el sentido de la hidrólisis de ATP (Sternweis & Smith, 1980). Asimismo, en las rodobacteráceas la subunidad δ actúa como el inhibidor natural del complejo enzimático. Pese a que su mecanismo de inhibición no se conoce a detalle, estudios estructurales sugieren que el amino terminal de esta proteína (residuos 1-14) se une al dominio F_1 en una interfaz formada por la región carboxilo de las subunidades catalíticas α/β (Zarco-Zavala *et al.*, 2014; Morales-Ríos *et al.*, 2015; García-Trejo *et al.*, 2016).

Las F_1F_0 -ATPasas, incluidas las mitocondriales, las cloroplastídicas y las bacterianas, se organizan en dos regiones estructural y funcionalmente distintas: (i) un dominio membranal (F_0), que participa en la translocación de iones (protones o sodio), compuesto básicamente por dos subunidades (a y c); y (ii) un dominio extrínseco de membrana (F_1), que contiene los sitios catalíticos (subunidades α y β), (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1992), unido a la región de membrana a través de un tallo rotor central (subunidades γ y ϵ) y un brazo periférico (subunidad b en la ATPasa de *Escherichia coli*, subunidad b y b' en las bacterias fotosintéticas, así como en la del cloroplasto; subunidad b , d , y F_6 en la enzima mitocondrial; subunidad δ en la ATP sintasa bacteriana y cloroplastídica; subunidad OSCP en la ATPasa mitocondrial, mientras que el resto de las subunidades varía de acuerdo a la especie) (Figura 2) (Soubannier *et al.*, 1999; Walker, 2013; Claggett *et al.*, 2007).

En cuanto a la síntesis de ATP, estudios funcionales y estructurales han mostrado que el canal de protones F_0 y la parte catalítica F_1 se acoplan estructural y funcionalmente, en donde los protones atraviesan la membrana por una interfaz compuesta por los residuos de la subunidad a y el anillo de subunidades c , dando lugar a la formación de una cavidad acuosa. Los residuos funcionalmente importantes para la translocación de iones son la arginina o glutamina de la subunidad a y el aspártico o glutámico de la subunidad c . El paso de los H^+ a lo largo de este hemicanal provoca el giro del anillo de subunidades de c (Figura 3). Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades γ y ϵ) en movimientos sucesivos de 120° , provocando cambios conformacionales alternados consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades α y β) e induciendo la unión de los sustratos (ADP y Pi) (Noji *et al.*, 1997), así como la síntesis y la liberación del ATP de acuerdo al mecanismo de cambio de unión propuesto por Boyer (Figura 3) (Itoh *et al.*, 2004).

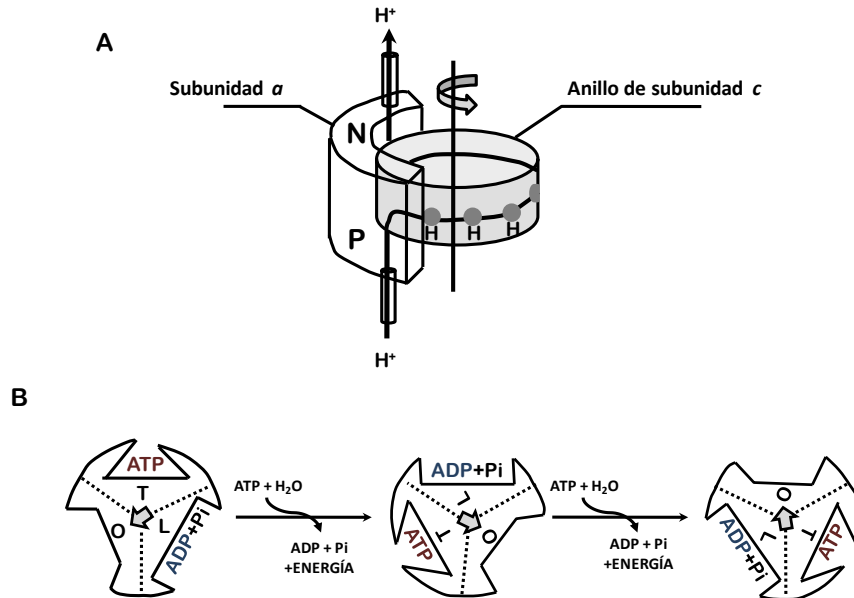


Figura 3. Mecanismo de la síntesis de ATP. (A) Los protones atraviesan la membrana del lado positivo (P) hacia el lado negativo (N) abatiendo el gradiente electroquímico a través de un hemicanal formado entre las subunidades α y el anillo de subunidades de c generando una rotación en la dirección indicada (flecha). Cada subunidad c contiene un residuo de aspártico o glutámico (círculo gris), el cual es importante para la translocación de iones. (B) Las tres subunidades catalíticas beta adquieren diferentes estados conformacionales durante la síntesis de ATP: abierta (O), semiabierta (L) y cerrada (T). Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP y a continuación se capta ADP y fosfato. Con la unión de los sustratos, la subunidad cambia a una conformación semiabierta, posteriormente en este sitio se lleva a cabo la reacción de formación del ATP y uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite alternadamente en cada una de las subunidades beta que componen el dominio catalítico de la enzima. Modificado de (Walker, 2013; Stewart *et al.*, 2013).

Composición polipeptídica de la F₁F₀-ATP sintasa

Entre las F-ATPasas, aquellas de origen bacteriano son las que presentan una composición polipeptídica más simple. Por ejemplo, la enzima de *E. coli*, la ATP sintasa estructuralmente más sencilla que se conoce, está compuesta por las subunidades: α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 y ϵ_1 que constituyen el dominio F₁, mientras que las subunidades a_1 , b_2 y c_{10} conforman el dominio F₀ (con la estequiometría indicada en subíndices) (Foster & Fillingame, 1982). Por otro lado, en las cianobacterias y en las α -proteobacterias, como *P. denitrificans*, las dos subunidades b idénticas son reemplazadas por las subunidades, homólogas pero no idénticas entre sí, b y b' (Morales-Ríos *et al.*, 2015). En cambio, las ATPasas mitocondriales del

bovino y la levadura son más complejas en términos del número de polipéptidos que las componen (Walker, 2013). La mayoría de las subunidades del complejo enzimático de la levadura son proteínas homólogas a la enzima de bovino, mientras que algunas otras son especie específicas (Tabla I) (Lee *et al.*, 2015).

Con respecto a lo anterior, la ATP sintasa monomérica de levadura presenta 14 subunidades: α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 , ϵ_1 , la subunidad 6 ó a_1 , b_1 , subunidad 9 ó c_{10} , d_1 , f_1 , h_1 , i ó k_1 , subunidad 8₁, y OSCP₁ con la estequiometría asignada (Tabla I). El peso molecular estimado de este complejo enzimático es de entre 572.759 kDa a 573.067 kDa considerando la formilación del amino terminal de las subunidades 8 y 9. En la ATPasa dimérica se encuentran tres proteínas adicionales, subunidades i (también llamada k), e y g , conocidas también como subunidades específicas de dimerización, puesto que sólo se han observado en el dímero de la ATP sintasa. El peso molecular aproximado de la forma dimérica es de 1,207.916 kDa, asumiendo una estequiometría 1:1 para las subunidades de dimerización, ó de 1,208.616 kDa tomando en cuenta nuevamente, la formilación de las subunidades 8 y 9, así como la acetilación de la subunidad e (Tabla I) (Wittig & Schägger, 2008). Por el contrario, en la enzima de bovino las subunidades e y g se encuentran asociadas fuertemente a la ATPasa y se han podido aislar del monómero de la enzima. La forma monomérica está compuesta por 15 proteínas, subunidad α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 , ϵ_1 , subunidad 6 ó a_1 , b_1 , subunidad 9 ó c_{10} , d_1 , e_1 , f_1 , g_1 , $F_{6(1)}$, subunidad 8 ó A6L₁, y OSCP₁. Considerando la estequiometría asignada, la masa molecular de este complejo es de 583.422 kDa ó 583.573 kDa incluyendo las modificaciones postraduccionales del amino terminal. Adicionalmente, se han encontrado dos proteínas asociadas a la F-ATPasa mitocondrial de bovino y rata, la subunidad MLQ y la proteína AGP (Tabla I) (Wittig & Schägger, 2008).

Tabla I. Proteínas y subunidades asociadas a la F₁F₀-ATP sintasa de diferentes organismos.

En la tabla se describe la composición polipeptídica y la distribución de las subunidades de la ATP sintasa de diferentes organismos, en donde se indica su nomenclatura y el gen que la codifica, así como su masa molecular estimada (kDa). En gris se destacan las subunidades comunes a todos los organismos. ¹Foster & Fillingame, 1982; ²Godinot & Di Pietro, 1986; ³Morales-Ríos *et al.*, 2015; ⁴Wittig & Schägger, 2008; ⁵van Lis *et al.*, 2007; ⁶Cano-Estrada *et al.*, 2010.

Tabla I. Proteínas y subunidades asociadas a la F₁F₀-ATP sintasa de diferentes organismos.

Subunidad	<i>Escherichia coli</i> ^(1, 2)	<i>Paracoccus denitrificans</i> ⁽³⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁽⁴⁾	<i>Bos taurus</i> ⁽⁵⁾	<i>Polytomella</i> sp. ^(5, 6)	Sector	
α	<i>atpA</i> (55.4)	<i>atpA</i> (55)	<i>ATP1</i> (54.9)	<i>ATP5A1</i> (55.2)	<i>ATP1</i> (56.8)	F ₁	
β	<i>atpD</i> (50.4)	<i>atpD</i> (50.3)	<i>ATP2</i> (51.1)	<i>ATP5B</i> (51.7)	<i>ATP2</i> (59.1)		
γ	<i>atpG</i> (31.5)	<i>atpG</i> (31.6)	<i>ATP3</i> (30.6)	<i>ATP5C1</i> (30.2)	<i>ATP3</i> (30.8)		
δ	<i>atpH</i> (19.3)	<i>atpH</i> (20)	<i>ATP16</i> (14.5)	<i>ATP5D</i> (15)	<i>ATP16</i> (8.3)		
ϵ	<i>atpC</i> (14.3)	<i>atpC</i> (15.8)	<i>ATP15</i> (6.6)	<i>ATP5E</i> (5.6)	<i>ATP15</i> (6.6)		
OSCP			<i>ATP5</i> (20.8)	<i>ATP5O</i> (20.9)	<i>ATP5</i> (22.6)		
IF ₁			<i>INH1</i> (7.3)	<i>ATPIF₁</i> (9.5)			
δ		<i>Pden_2862</i> (11.7)					
<i>a</i>	<i>atpB</i> (30.1)	<i>atpB</i> (26.7)	<i>ATP6</i> (27.8)	<i>MT-ATP6</i> (24.7)	<i>ATP6</i> (24.6)		F ₀
<i>b</i>	<i>atpF</i> (17.2)	<i>b (atpF ó Pden_2876)</i> (20.2) <i>b' (Pden_2877)</i> (22.4)	<i>ATP4</i> (23.2)	<i>ATP5F1</i> (24.6)			
<i>c</i>	<i>atpE</i> (8.2)	<i>atpE</i> (7.6)	<i>ATP9</i> (7.7)	<i>ATP5G1-3</i> (7.6)	<i>ATP9</i> (7.3)		
<i>d</i>			<i>ATP7</i> (19.6)	<i>ATP5H</i> (18.5)			
<i>e</i>			<i>ATP21</i> (10.7)	<i>ATP5I</i> (8.1)			
<i>f</i>			<i>ATP17</i> (10.5)	<i>ATP5J2</i> (10.1)			
<i>g</i>			<i>ATP20</i> (12.9)	<i>ATP5L</i> (11.2)			
<i>h</i>			<i>ATP14</i> (10.4)				
<i>i (j)</i>			<i>ATP18</i> (6.6)				
<i>k</i>			<i>ATP19</i> (7.5)				
F ₆				<i>ATP5J</i> (8.9)			
8 (A6L)			<i>ATP8</i> (5.8)	<i>MT-ATP8</i> (7.9)			
AGP o DAPIT				<i>USMG5</i> (6.3)			
Proteína MLQ				<i>MP68</i> (6.8)			

Factor B	<i>ATP5S</i> (20.3)
Stf1	<i>STF1</i> (7.2)
Stf2	<i>STF2</i> (9.4)
Sfl2	<i>TMA10</i> (9.7)

Por último, estudios sobre la resolución de la estructura cristalina de la F-ATPasa intacta, se han dificultado probablemente por la tendencia del complejo enzimático a disociarse cuando se extrae de la membrana y porque se dificulta la formación de cristales adecuados para el análisis de rayos X, debido a la flexibilidad y movilidad de las F-ATPasas que dan lugar a diferentes isómeros estructurales (Morales-Ríos *et al.*, 2015). Sin embargo, un número de modelos atómicos se han obtenido para diversas regiones de la enzima de bovino y levadura (Jiko *et al.*, 2015), incluyendo el dominio F₁ (Abrahams *et al.*, 1994), el subcomplejo F₁-anillo de subunidades de *c* (Stock *et al.*, 1999), y la región del brazo periférico (Dickson *et al.*, 2006; Rees *et al.*, 2009). También hay información estructural de las enzimas de *E. coli* (Cingolani & Duncan, 2011; Roy *et al.*, 2012), *Caldalkalibacillus thermarum* (Stocker *et al.*, 2007), *Geobacillus stearothermophilus* (anteriormente *Bacillus PS3*) (Shirakihara *et al.*, 2015) y de la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans* (Figura 4) (Morales-Ríos *et al.*, 2015).

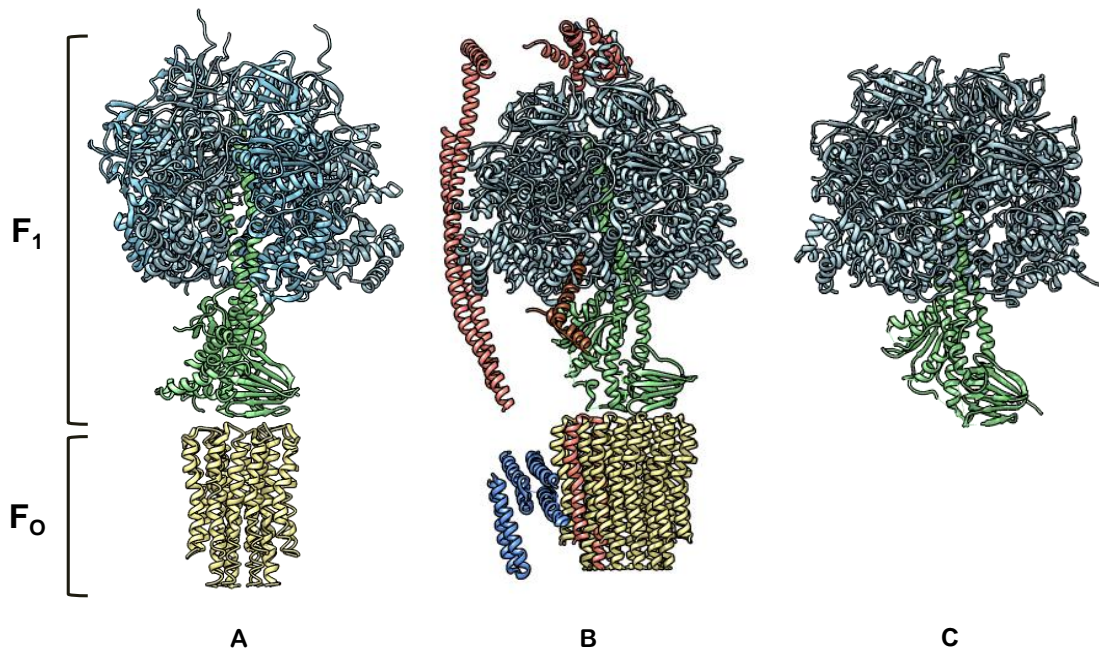


Figura 4. Comparación estructural de la ATP sintasa de diferentes organismos. A la izquierda de la figura se indica la región correspondiente al dominio F_1 y F_0 para cada modelo presentado como una estructura de tipo listón. (A) Estructura cristalográfica del subcomplejo F_1 -subunidad c_8 de la ATPasa de bovino (3.5 Å de resolución, No. PDB 2XND). Modificado de (Rees *et al.*, 2009). (B) Estructura de la ATP sintasa de *P. denitrificans* obtenida por difracción de rayos X (3.98 Å de resolución, No. PDB 5DN6) (Morales-Ríos *et al.*, 2015). (C) Estructura cristalográfica de la F_1 -ATPasa de *Bacillus PS3* (TF_1) (3.9 Å de resolución, No. PDB 4XD7). Modificada de (Shirakihara *et al.*, 2015). Cada uno de los modelos comprende a las subunidades del dominio catalítico (α_3 , β_3 en azul) y el rotor central (γ , ϵ en verde). Adicionalmente, en el modelo estructural de (A) se representa a la subunidad δ (verde) y el anillo de subunidades de c (amarillo). En (B), la estructura cristalográfica comprende el brazo periférico (δ , b , b' en rojo), el inhibidor (δ en café) y el anillo de subunidades de c (amarillo).

Mecanismo de la translocación de protones

Las dos funciones opuestas de la F_1F_0 -ATP sintasa, síntesis (ATP sintasa) e hidrólisis de ATP (ATPasa), se basan en la capacidad del rotor, embebido en la membrana, de girar en direcciones contrarias. En condiciones aeróbicas, el mecanismo enzimático del complejo es la síntesis de ATP, este proceso se da a través de un acoplamiento quimio-mecánico que implica un movimiento de rotación del motor (F_0) impulsado por la fuerza protón motriz (Δp), dando lugar a la translocación de protones del lado positivo (P) de la membrana hacia el lado negativo (N) de la misma. Por el contrario, bajo

condiciones anaerobias, bajo Δp , la enzima hidroliza el ATP para mover los protones en el sentido opuesto, sentido anti horario visto desde el dominio F_1 , restableciendo así el gradiente electroquímico de protones. El equilibrio termodinámico entre el potencial de fosforilación (ΔG_p) del ADP y el Δp determina cuál de estas dos actividades enzimáticas, síntesis o hidrólisis de ATP, se lleva a cabo por la ATP sintasa/ATPasa (Nesci *et al.*, 2015).

Los constituyentes fundamentales en la generación de la fuerza de torque son la subunidad a y el anillo de subunidades de c . Estas subunidades cuentan con elementos (residuos altamente conservados) que permiten la translocación de iones: la carga positiva de un grupo guanidinio de la Arg en la subunidad a y la carga negativa de los grupos carboxilo de los residuos de Asp o Glu (dependiendo de la especie) del anillo de c . Estos grupos cargados negativamente, accesibles tanto del lado N como del P de la bicapa lipídica, permiten la unión de los protones. En la dinámica de rotación del motor F_0 , cuando el Δp es lo suficientemente alto, el hemicanal que se encuentra expuesto en el lado P de la membrana constituye la vía de entrada de los protones a los grupos carboxilo del oligómero de c . Una vez protonados, la polaridad de la subunidad c disminuye y es capaz de entrar a la bicapa lipídica, manteniendo el residuo orientado hacia el centro del anillo del rotor, es decir, pasa de una conformación abierta a una cerrada, lo cual es favorecido energéticamente. Al mismo tiempo, una subunidad c con un grupo carboxilo neutralizado está expuesta en la cara del hemicanal que mira hacia el lado negativo de la membrana. Este entorno más hidrofílico favorece que el grupo carboxilo cambie a una conformación abierta que apunta hacia la subunidad a . En estas condiciones, el pH básico en el lado N de la membrana y la carga positiva de la Arg, dan lugar a reordenamientos estructurales que disminuyen el pKa de este grupo permitiendo el desprendimiento de protones. En consecuencia, el carboxilato desprotonado se estabiliza en la conformación abierta a través de puentes salinos con el aminoácido Arg, cuyo pKa mantiene al grupo guanidinio protonado con carga positiva. De esta forma, cuando un nuevo protón se enfrenta al hemicanal en el lado P, el sitio de unión carboxilato nuevamente cambia a la forma protonada, acompañado de un cambio en la conformación para iniciar un nuevo ciclo de rotación (Figura 5) (Nesci *et al.*, 2015).

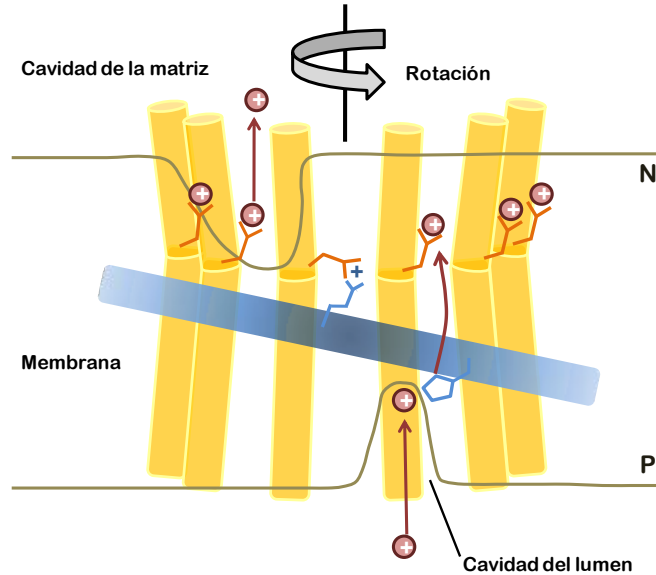
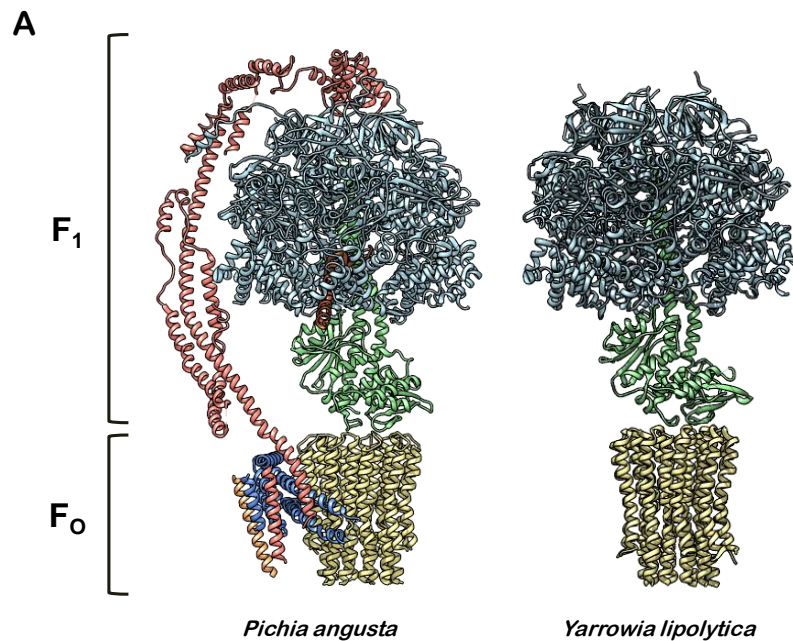


Figura 5. Modelo del proceso de translocación de los protones. Los protones, representados como un círculo con carga positiva (rojo), acceden al hemicanal al interactuar con el residuo de histidina (residuo ubicado en la parte inferior derecha del rectángulo azul) de la hélice horizontal membranal de la subunidad *a* (rectángulo horizontal en azul) expuesta al lado de la cavidad luminal. Las flechas indican el canal propuesto mediante el cual los protones se abren paso a través de la bicapa lipídica. Los iones H^+ se unen a la conformación abierta del aspartato o glutamato cargado negativamente (naranja) de la subunidad *c* (cilindros en amarillo). El mecanismo de protonación (cavidad del lumen), y desprotonación (cavidad de la matriz) dan lugar a la rotación del anillo de subunidades de *c* (la flecha superior gris indica el sentido del giro). Este movimiento en sentido opuesto se evita por la presencia de arginina cargada positivamente (residuo ubicado en la parte superior izquierda del rectángulo azul), que se encuentra a 2.5 vueltas de hélice (13.5 Å) por debajo del aminoácido aspártico o glutámico (naranja). Esta distancia coincide con el espacio entre los sitios de protonación adyacentes en el oligómero de *c* de cualquier estequiometría conocida. De este modo, los residuos de arginina e histidina pueden interactuar al mismo tiempo con dos hélices adyacentes de subunidad *c* como se requiere para la translocación de protones. P: lado positivo y N: lado negativo. Modificado de (Kühlbrandt & Davies, 2016).

Organización del dominio membranal de la ATP sintasa mitocondrial

En la actualidad, se sabe muy poco acerca de la organización estructural de las subunidades de la región F_0 debido a que la alta hidrofobicidad de las subunidades del dominio membranal ha dificultado su caracterización. Se han realizado esfuerzos experimentales para determinar la estructura de las subunidades del sector F_0 de la ATPasa mitocondrial de los hongos *Pichia angusta* (Vinothkumar *et al.*, 2016) y *Yarrowia lipolytica* (Hahn *et al.*, 2016). En el primer caso, se determinó por crío-microscopía

electrónica (crío-ME) la estructura de la forma monomérica en presencia de la proteína *IF₁* de bovino (residuos 1-60), con una resolución general de ~ 7 Å. La composición polipeptídica de este complejo enzimático inhibido es equivalente al de la enzima nativa, con excepción del dominio membranal, puesto que conserva las subunidades *a*, el anillo de *c*₁₀, *f* y el dominio membranal de la subunidad *b*, mas no se encuentran presentes las subunidades supernumerarias *e*, *g*, *k*, y *l* (Figura 6A) (Vinothkumar *et al.*, 2016). Mientras que en el segundo, empleando una combinación de técnicas de alta resolución estructural, como la crío-ME y la cristalografía de rayos X, se ha determinado la estructura completa del complejo dimérico de *Y. lipolytica* con una resolución general de 7.8 Å, y en particular de 6.2 Å para el dominio F_O del dímero de la enzima y de 6.9 Å para el sector F₁ del monómero del complejo enzimático. El mapa de densidad electrónica obtenido experimentalmente permitió identificar a las subunidades del sector F_O: *a*, *c*₁₀, *e*, *f*, *g*, *i*, *8* y el dominio membranal de *b*. La estructura revela la organización estructural, previamente desconocida, de la interfaz de los dímeros en la membrana, proporcionando así nuevas e importantes perspectivas sobre la arquitectura de la membrana interna mitocondrial (Figura 6B) (Hahn *et al.*, 2016).



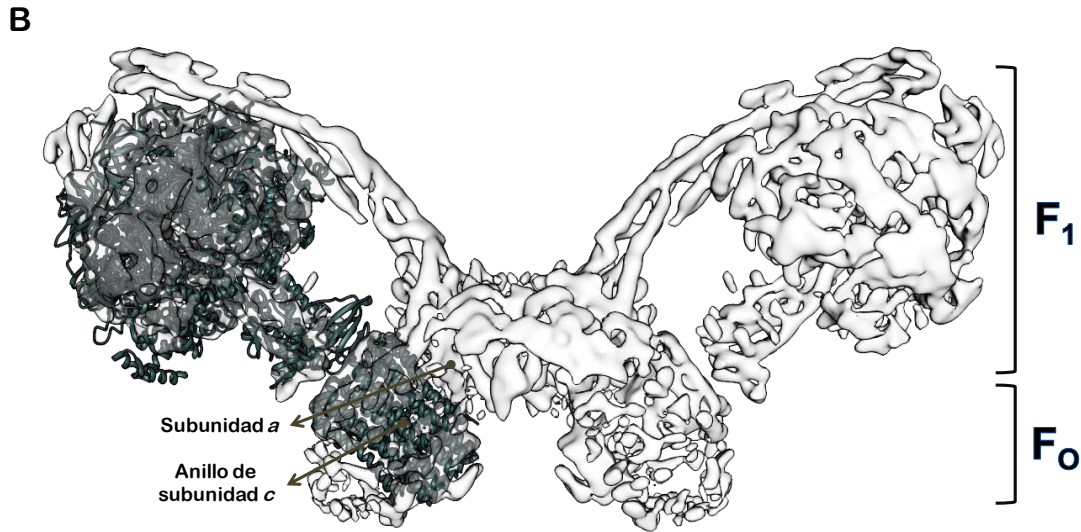


Figura 6. Modelos estructurales de la F₁F₀-ATP sintasa de *Pichia angusta* y *Yarrowia lipolytica*. (A) Se indica la región correspondiente al dominio F₁ y F₀ para cada modelo presentado como una estructura de tipo listón. Izquierda: estructura obtenida por microscopía electrónica de la forma monomérica de la F-ATPasa de *P. angusta* (7.0 Å de resolución, No. PDB 5LQZ). Modificada de (Vinothkumar *et al.*, 2016). Derecha: Estructura cristalográfica del sub-complejo F₁-subunidad *c*₁₀ de la ATP sintasa de *Y. lipolytica* (3.5 Å de resolución, No. PDB 5FL7). Modificada de (Hahn *et al.*, 2016). Cada uno de los modelos comprende a las subunidades del dominio catalítico (α_3 , β_3 en azul), el rotor central (γ , δ , ϵ en verde) y el anillo de subunidades de *c* (amarillo). Adicionalmente, el modelo estructural de *P. angusta* comprende el brazo periférico (OSCP, *b*, *d*, *h* en rojo), las subunidades del dominio membranal *a* (azul) y *f* (naranja), así como el inhibidor IF₁ (café). (B) Vista lateral del mapa de densidad electrónica obtenido por crío-microscopía electrónica del dímero de la ATPasa de *Y. lipolytica* representado como un diagrama de superficie (7.8 Å de resolución, no. de acceso EMD 8151). Adicionalmente, a manera de comparación sobre la densidad electrónica del mismo se muestra la estructura cristalográfica del sub-complejo F₁-*c*₁₀ de *Y. lipolytica* (3.5 Å de resolución, no. de acceso PDB 5FL7). Asimismo, se indica la región correspondiente a los dominios extrínseco (F₁) e intrínseco de membrana (F₀) del complejo dímérico de la enzima de la levadura, así como las subunidades *a* y el anillo de subunidades de *c*. Modificado de (Hahn *et al.*, 2016).

Con respecto a lo anterior, la organización supramolecular de la ATP sintasa, a lo largo del borde de las crestas mitocondriales, se observó por primera vez en el protozoo ciliado *Paramecium multinucleatum*, el análisis de las imágenes de microscopía de crío-fractura permitieron establecer una relación entre los dímeros de la enzima con la formación de crestas mitocondriales (Paumard *et al.*, 2002). Posteriormente, imágenes de microscopía electrónica del dímero de la ATPasa mitocondrial de bovino mostraron que los monómeros se asocian entre sí formando una interfaz, sugiriendo que el ángulo de asociación entre los monómeros del complejo enzimático podría ser importante para la formación de las crestas mitocondriales (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). Recientemente, estas

formaciones diméricas se han descrito por microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica en las ATPasas de rata, bovino, levadura, hongos, papa y algas clorofíceas (Figura 7).

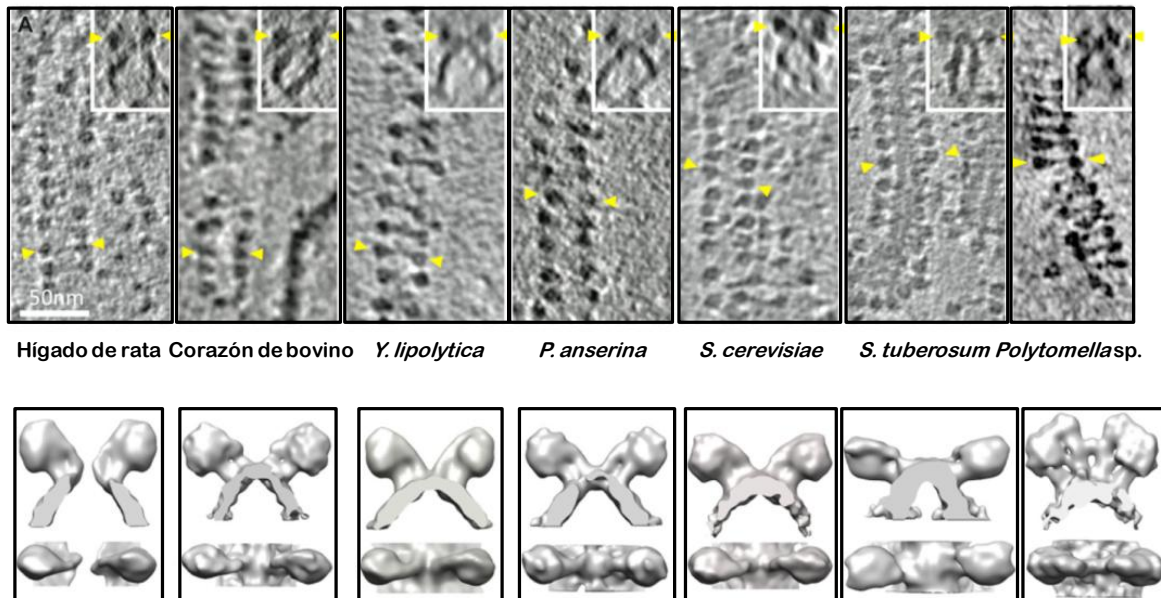


Figura 7. Estructuras oligoméricas de la ATP sintasa de diferentes organismos. Panel superior: Imágenes de crío-tomografía electrónica de las hileras de dímeros de la ATPasa de las especies indicadas en la imagen. Los insertos muestran una vista lateral de los complejos diméricos. Las flechas amarillas señalan la región F_1 de la enzima. Barra de escala = 50 nm. Panel inferior: Representación de superficie construida a partir del promedio de los subtomogramas obtenidos. Modificado de (Kühlbrandt, 2015).

A la fecha, la existencia de hileras de dímeros de la ATP sintasa mitocondrial es aceptada. Estudios realizados con agentes entrecruzadores han caracterizado una interfaz de dimerización (subunidades 6, 4, i , e) y otra de oligomerización (subunidades i , e , g), a través de las cuales se dan los contactos entre los dímeros de la enzima (Figura 8) (Habersetzer *et al.*, 2013). En este sentido, se encontró que los monómeros del bovino, la levadura y las algas clorofíceas formaban dos ángulos distintos de asociación lo que sugería la existencia de dos tipos de estructuras, una llamada “dímero verdadero” con un ángulo de 70-90° y otra conocida como “pseudo-dímero” cuyo ángulo es menor a 40°. En consecuencia, se ha propuesto que estos dímeros podrían ser el resultado de la ruptura de los oligómeros de la ATPasa de las crestas mitocondriales (Figura 8) (Dudkina *et al.*, 2006).

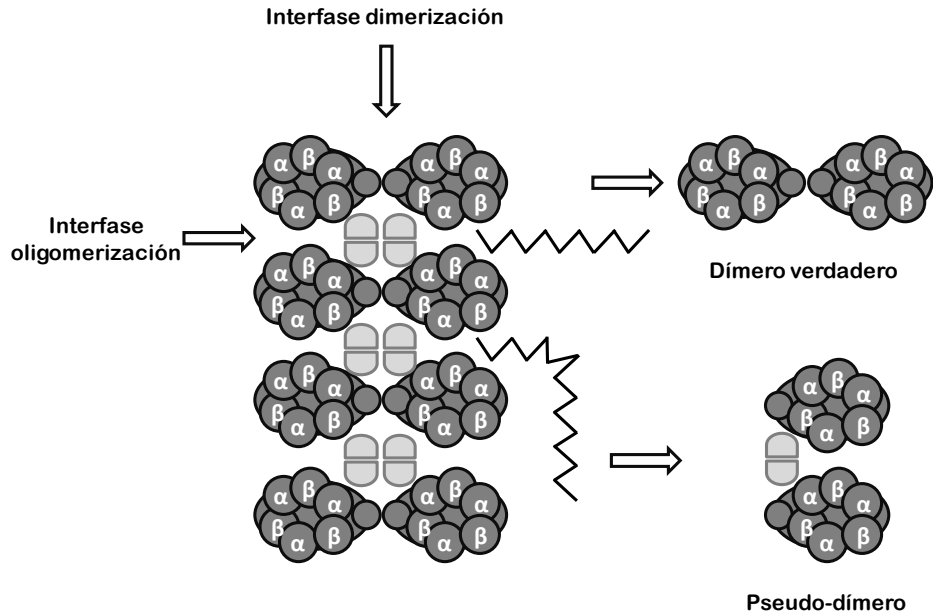


Figura 8. Modelo de la organización de las estructuras oligoméricas de la ATP sintasa. En este modelo se representa de manera esquemática la disposición de los multímeros de la ATPasa (vista superior). Se muestran los dos tipos de formas diméricas que existen (dímero verdadero y pseudo-dímero). Así como las superficies de contacto que forman los monómeros de la enzima (representados como elipses horizontales), y dentro de éstos las subunidades α/β . También, se indica la interfaz de dimerización y oligomerización (señalado con una flecha), respectivamente. Modificado de (Dudkina *et al.*, 2006).

En suma, en comparación con la estructura de la ATP sintasa de los mamíferos o de la levadura, que han sido muy estudiadas, poco se sabe de la composición estructural de la ATP sintasa de las plantas (Cano-Estrada & González-Halphen, 2011). En éstas, aún menos subunidades del sector F_0 han sido caracterizadas, y solamente se han reportado genes que codifican para las subunidades *a* y *c*. No obstante, en el genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* se han encontrado los genes *orfB* y *orf25* que codifican para proteínas asociadas al dominio membranal de la ATP sintasa. El gen *orf25* codifica para una proteína denominada F_{Ad} . Sin embargo, los productos proteicos de estos genes no tienen homólogos claros en bovino o levadura y su función es aún desconocida (Heazlewood *et al.*, 2003). Asimismo, en las algas clorofíceas, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp., se han encontrado subunidades novedosas sin homólogos en otros organismos, con una composición estructural única.

Algas clorofíceas

El linaje de las algas clorofitas (División Chlorophyta) comprende a organismos eucariontes en su mayoría fotosintéticos, el cual a su vez se divide en cuatro clases: clorofíceas, prasinofíceas, trebuxofíceas y ulvofíceas (Lewis & McCourt, 2004). Dentro de la primera clase se encuentran algas verdes unicelulares con estilos de vida libre diversos, es decir, pueden habitar tanto en ambientes acuáticos (agua dulce o salada), como terrestres (Figueroa-Martínez *et al.*, 2015; Rockwell *et al.*, 2014).

Una de las algas clorofíceas más caracterizadas a la fecha es *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 9A). Las células de esta especie son biflageladas, tienen pared celular, mitocondrias y cloroplastos (Merchant *et al.*, 2007). *Chlamydomonas* puede vivir en suelos y cuerpos de agua dulce. En el laboratorio puede crecer en medios simples de sales orgánicas, utilizando la fotosíntesis como principal fuente de energía, al igual que en oscuridad total si se proporciona acetato como una fuente de carbono alternativa (<http://www.chlamycollection.org/info.html>). Además, se considera un organismo modelo, debido a que se conoce la secuencia completa de su genoma nuclear, mitocondrial y cloroplastídico (Merchant *et al.*, 2007). Asimismo, ha servido como referencia en el estudio de diversos fenómenos como la fotosíntesis, la biogénesis del cloroplasto, el ensamble y la función flagelar, así como el reconocimiento célula-célula, entre otros (Merchant *et al.*, 2007; Herron *et al.*, 2009; Kalanon & McFadden, 2008).

Por otra parte, el presente trabajo se realizó con *Polytomella parva* (Figura 9B), la cual se obtuvo de la colección de algas de la Universidad de Gotinga, Alemania, registrada como *Polytomella* sp. 198.80 (aislada por E.G. Pringsheim) (<https://www.uni-goettingen.de/en/184982.html>). El género *Polytomella* comprende un grupo de algas que habita en estanques de agua dulce, sus células presentan una forma ovoide, con cuatro flagelos; pero carecen tanto de pared celular como de genoma plastídico y capacidad fotosintética (Aragaos, 1910; Smith & Lee, 2014). Presenta dos estadios a lo largo de su vida, un estado trófico caracterizado por una alta tasa de reproducción sexual y asexual dependiente de la densidad del cultivo. En cambio, cuando las condiciones del medio son desfavorables dan lugar al inicio del estado quístico, en el cual las células entran en una fase de inactividad, trayendo como consecuencia la inmovilización celular y tras varios cambios morfológicos el desarrollo de quistes. Pese a que se desconoce la señal que desencadena la formación de éstos, se sabe que en esta etapa es fundamental la presencia de amiloplastos, puesto que las reservas de almidón son la principal fuente de energía para que

las células regresen al estado trófico (Pringsheim, 1955; Vidal & Gittleson, 1981; Lewis *et al.*, 1974). *Polytomella* sp., al carecer de cloroplastos y pared celular, ha facilitado el aislamiento, la purificación y la caracterización de sus complejos mitocondriales. Ambas algas clorofíceas presentan una ATP sintasa atípica (Funes *et al.*, 2002; van Lis *et al.*, 2003; Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006).

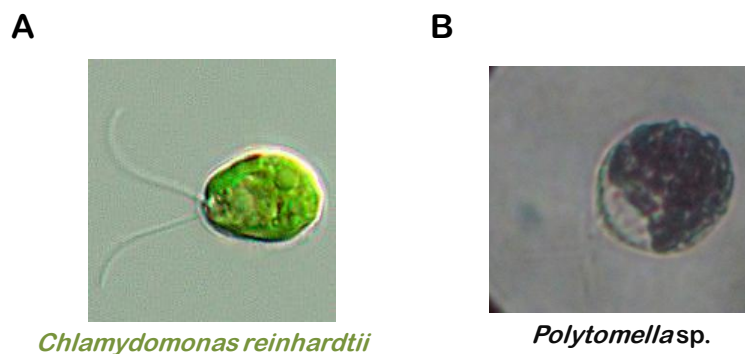


Figura 9. Algas clorofíceas. Se muestran a las algas (A) verde *Chlamydomonas reinhardtii* y (B) incolora *Polytomella* sp.

La F₁F₀-ATP sintasa de las algas clorofíceas

Estudios bioquímicos previos, con los complejos mitocondriales de las algas clorofíceas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. mostraron que al solubilizar una preparación de mitocondrias con el detergente lauril maltósido al 1% es posible observar en geles azules nativos (BN-PAGE) al complejo V como una banda con una masa molecular aproximada de 1,600 kDa (Figura 10) (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; van Lis *et al.*, 2007). Este comportamiento contrasta con lo observado en otros complejos enzimáticos de diferentes organismos, incluyendo mamíferos, hongos y plantas superiores, los cuales bajo las mismas condiciones migran como un monómero con una masa molecular estimada de 550 a 600 kDa (Figura 10) (van Lis *et al.*, 2003; van Lis *et al.*, 2007).

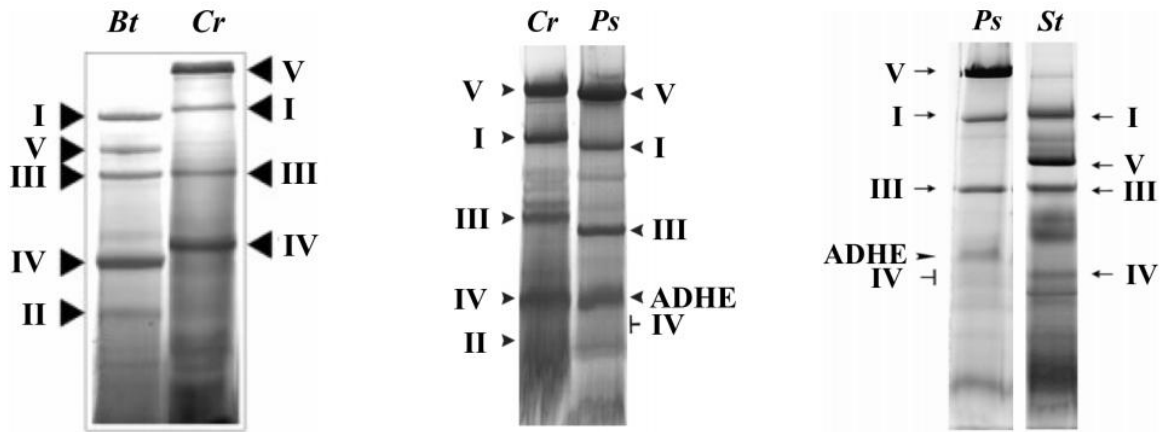


Figura 10. Análisis en geles azules nativos de los complejos mitocondriales de diferentes organismos. Geles de BN-PAGE de los complejos mitocondriales de *Bos taurus* (*Bt*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cr*), *Polytomella* sp. (*Ps*) y *Solanum tuberosum* (*St*). Los números romanos indican los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial: NADH/ubiquinona oxido reductasa (I), succinato deshidrogenasa (II), citocromo *c* reductasa (III), citocromo *c* oxidasa (IV), ATP sintasa (V), y la aldehído/alcohol deshidrogenasa bifuncional (ADHE). Nótese que el complejo V de las algas clorofíceas presenta una migración con una masa molecular superior en comparación a otros organismos. Modificado de (van Lis *et al.*, 2003; van Lis *et al.*, 2005; van Lis *et al.*, 2007).

La composición polipeptídica de la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas se determinó comparando la secuencia amino terminal de cada una de los subunidades que la forman con la información obtenida del genoma completo de *C. reinhardtii* (Cardol *et al.*, 2005). De este análisis, se identificaron a las subunidades del dominio catalítico (α y β), así como aquellas que forman parte del tallo rotor central (γ , δ , ϵ y *c*). Sin embargo, sólo se encontraron a las subunidades *a* y OSCP del brazo periférico como únicos constituyentes clásicos descritos en otras ATPasas clásicas, como la de mamífero y la levadura (Tabla I). En cambio, se identificaron nueve polipéptidos con una masa molecular de 7 a 60 kDa, de origen evolutivo desconocido y que no presentan homólogos claros en las bases de datos de secuencias peptídicas (Funes *et al.*, 2002; van Lis *et al.*, 2003). Inicialmente, a estas subunidades se les denominó MASAP (Mitochondrial ATP Synthase Associated Protein, por sus siglas en inglés), modificándolo posteriormente y numerándolas sucesivamente (de acuerdo a su migración en geles desnaturizantes) como subunidades Asa1-9 (Figura 11) (Funes *et al.*, 2002; van Lis *et al.*, 2003; Cardol *et al.*, 2005; Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006).

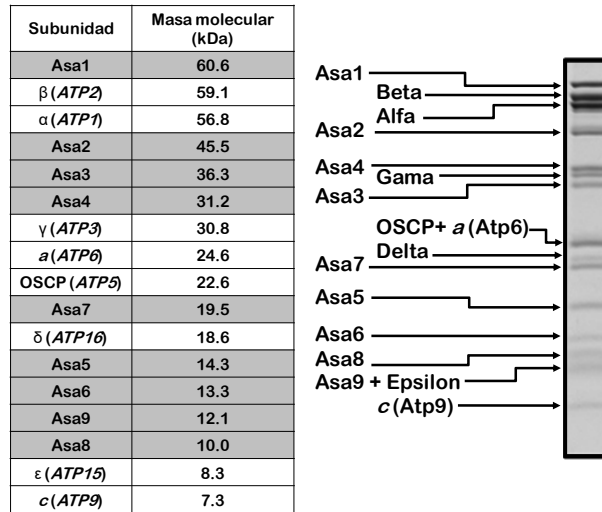


Figura 11. Composición polipeptídica de la ATP sintasa de las algas clorofíceas. Izquierda: Las subunidades de la tabla se encuentran ordenadas de acuerdo a su masa molecular estimada. En gris se resalta a las subunidades Asa, mientras que en blanco a las conservadas en otras F-ATPasas y en paréntesis se muestra el gen que las codifica. Con respecto a la secuencia proteica de la enzima bacteriana o de bovino, la subunidad α presenta una extensión de 20 residuos en el N-terminal, mientras que la subunidad β contiene 64 aminoácidos en el C-terminal. Derecha: Gel de tricina-SDS-PAGE al 14.0 % del complejo V mitocondrial teñido con azul de Coomassie.

Los resultados anteriores sugieren que la enzima del alga tiene varias proteínas asociadas (subunidades Asa1-9) que constituyen un brazo periférico sumamente estable. Estudios de microscopía electrónica realizados con la ATP sintasa de *Polytomella*, revelaron una alta densidad electrónica en la región que corresponde al brazo periférico del complejo dimérico del alga reforzando dicha hipótesis (Figura 12A). Asimismo, se determinó que los monómeros de la enzima forman un ángulo de 50° , en comparación con el ángulo de asociación de 90° observado en la levadura (Figura 12B) (Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2006; Cano-Estrada *et al.*, 2010). Con relación a lo anterior, imágenes de criotomografía electrónica (cryo-ET) evidenciaron las crestas tubulares mitocondriales, debido al arreglo de hileras de los dímeros del complejo V a lo largo de la membrana interna (Figura 12C y D) (Dudkina *et al.*, 2006; Dudkina *et al.*, 2010).

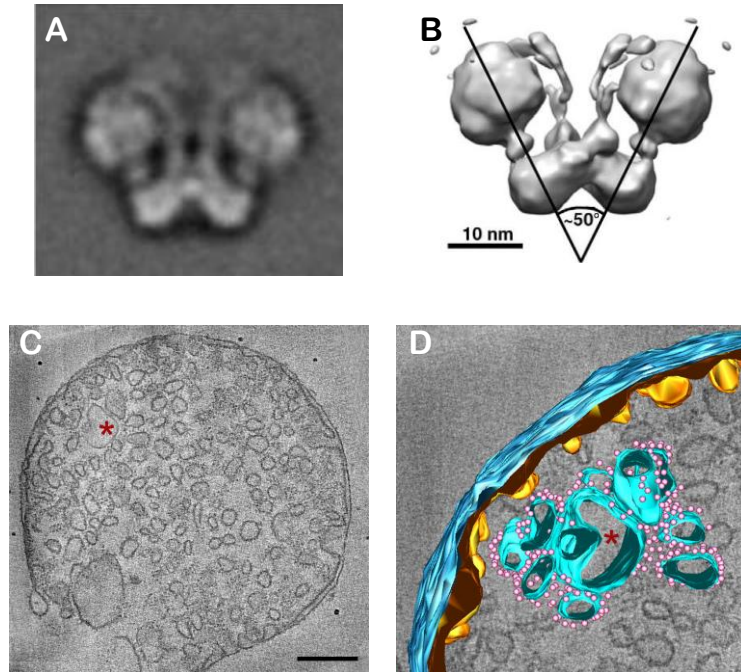


Figura 12. La ATP sintasa dimérica del alga *Polytomella*. Panel A. Imagen de partícula única obtenida por microscopía electrónica (ME) del complejo enzimático del alga obtenida del promedio de 100-150 imágenes de ME. Panel B. Modelo de estructura tridimensional generado a partir del estudio de ME. Se indica el ángulo de asociación de los monómeros que componen la enzima dimérica. Modificado de (Cano-Estrada *et al.*, 2010). Panel C. Imagen de una mitocondria de *Polytomella* (corte transversal) obtenida por crío-tomografía electrónica. En esta muestra particular, se puede observar el abundante número de crestas mitocondriales. El astérigo rojo marca las posiciones equivalentes de los paneles C y D. Barra de escala = 200 nm. Panel D. Modelo de superficie de la región indicada con asterisco rojo en el panel C. En esta representación se pueden observar la membrana mitocondrial externa (azul oscuro) en contacto, a través de invaginaciones (amarillo-café), con la membrana mitocondrial interna (azul claro). En esta última, es posible apreciar la región F₁ (rosa) de las hileras de dímeros de ATPasa. Tomado de (Dudkina *et al.*, 2010).

Recientemente, se obtuvo un modelo estructural del complejo dimérico de la ATP sintasa de *Polytomella* de mayor resolución. La estructura obtenida muestra que el brazo periférico está constituido por una compleja red de alfa hélices entrecruzadas las cuáles corresponderían a las subunidades Asa (Figura 13A) (Allegretti *et al.*, 2015). Además, las imágenes de microscopía sugieren que la subunidad *a* presenta cuatro segmentos helicoidales horizontales, formando dos hemicanales a través de los cuáles se translocan los iones (Figura 13B) (Allegretti *et al.*, 2015). Este último hallazgo, la disposición casi horizontal con respecto a la membrana (ángulo de inclinación: 20-30°) de los segmentos alfa helicoidales hidrofóbicos de la subunidad *a*, fue una sorpresa, ya que la evidencia experimental obtenida

en las últimas dos décadas sugería que estas hélices se encontrarían dispuestas de manera perpendicular a la membrana, de manera similar a las hélices membranales que componen el anillo de subunidades de *c*. En la figura 13 se puede apreciar el hemicanal formado por una interface entre la subunidad *a* y el oligómero de *c*, compuesto en su mayor parte por los residuos polares conservados, dando lugar a un canal a través del cual se translocan los protones (Allegretti *et al.*, 2015).

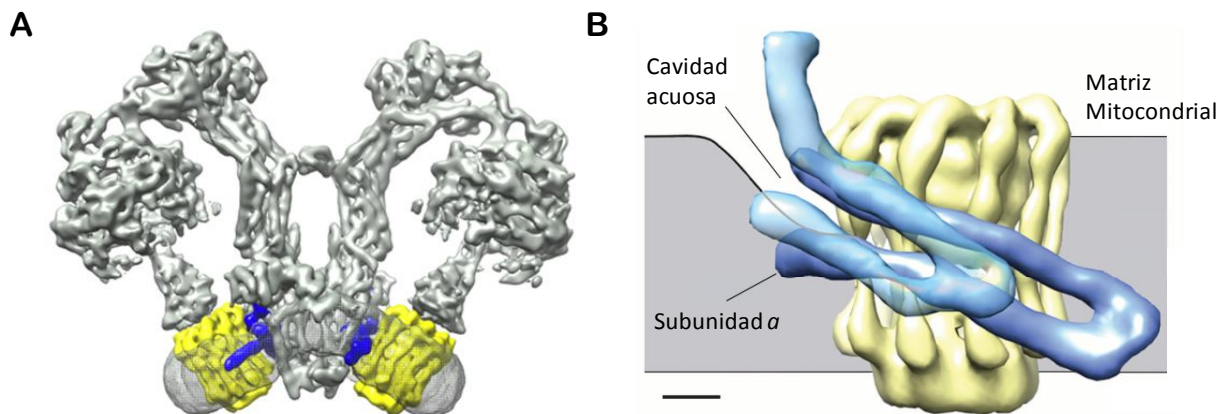


Figura 13. Modelo de crío-microscopía electrónica de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Polytomella*. Panel A. Vista lateral del complejo dimérico del alga (7.0 Å de resolución, No. EMD-2852). Se resaltan la subunidad *a* (azul) y el anillo de subunidades de *c* (amarillo) (Allegretti *et al.*, 2015). Panel B. Vista lateral de la región F_0 de *Polytomella*, en donde se muestra el mapa de densidad electrónica correspondiente a los últimos dos segmentos helicoidales membranales del carboxilo terminal de la subunidad *a* (azul) y el anillo de subunidades c_{10} (amarillo). En este modelo se representa solamente la cavidad acuosa formada en el lado de la matriz mitocondrial (indicado en la figura). Barra de escala = 10 Å. Modificado de (Kühlbrandt & Davies, 2016).

A pesar del resultado obtenido, la resolución experimental de la estructura no es la suficiente para asignar con claridad cada uno de los segmentos helicoidales que componen el brazo periférico de la enzima del alga, tanto de las subunidades de la región F_1 , como de aquellas que forman parte del dominio membranal. No obstante, a través de una estrategia de modelado computacional se han descrito con mayor precisión los cuatro segmentos membranales del carboxilo terminal de la subunidad *a* (Figura 14B) (Leone & Faraldo-Gómez, 2016).

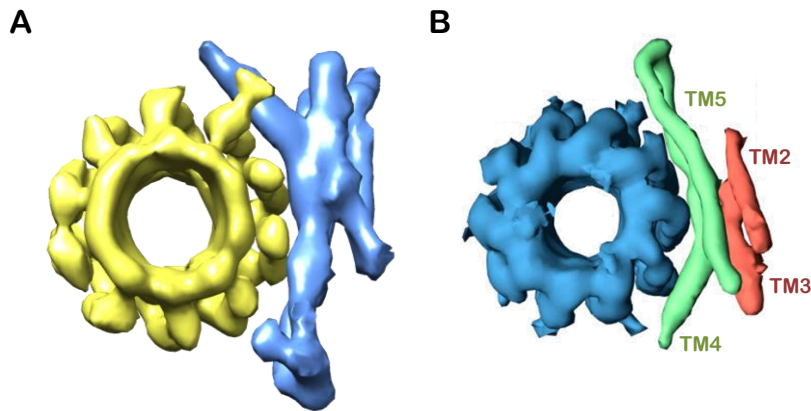


Figura 14. Comparación del modelo experimental y teórico de la subunidad *a* de la ATPasa del alga. Panel A. Modelo obtenido por crío-ME de la subunidad *a*. Vista desde la matriz mitocondrial de un corte transversal a nivel de membrana del anillo de subunidades de *c* (amarillo) y los últimos dos segmentos helicoidales membranales del carboxilo terminal de la subunidad *a* (azul) (Allegretti *et al.*, 2015, No. EMD-2852). Panel B. Modelo teórico inferido por modelado molecular de la subunidad *a*. Misma perspectiva que en el panel A. A la izquierda del modelo se muestra el anillo de subunidades de *c* (azul), mientras que a la derecha se muestran los cuatro segmentos membranales (TM) de la subunidad *a*, en verde los segmentos helicoidales cuarto (TM4) y quinto (TM5), y en rojo el segundo (TM2) y el tercero (TM3). Hay que resaltar que los TM2 y 5 se encuentran orientados hacia el espacio intermembranal, mientras que los TM1 y 3 hacia la matriz mitocondrial. Modificado de (Leone & Faraldo-Gómez, 2016).

Es de nuestro interés general conocer como las subunidades Asa1 a 9 se asocian entre sí para formar el brazo periférico robusto de la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas. Trabajos recientes en el laboratorio han abordado el estudio de las interacciones de las subunidades extrínsecas de membrana que constituyen a este complejo mitocondrial empleando diversas metodologías, tales como la disociación de la enzima en subcomplejos inducida por altas temperaturas o empleando tensoactivos a diferentes concentraciones, el tratamiento del complejo nativo con agentes entrecruzadores y estudios de asociación de las proteínas Asa recombinantes.

Estudios de disociación de la enzima con calor demostraron que el dímero se disocia en sus respectivos monómeros e inmediatamente después se libera el sector F₁ y las subunidades Asa2, Asa4, Asa7 y OSCP (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). De igual forma, la enzima dimérica es más resistente al tratamiento térmico, altas presiones hidrostáticas y digestión con proteasa que la forma monomérica, ya que esta última se disocia muy fácilmente en sus componentes individuales (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009). Además, se obtuvo el subcomplejo Asa1/3/5/8/*a*/*c*₁₀ al incubar el complejo dimérico con altas

concentraciones de lauril sulfato de sodio (Colina-Tenorio *et al.*, 2016). Adicionalmente, al tratar el complejo enzimático con taurodesoxicolato se observó que Asa6 y Asa9 podrían promover la dimerización de la enzima, ya que su estequiometría disminuye respecto a las otras subunidades en la forma monomérica de la enzima (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009). De igual forma, al emplear un detergente de la familia de los anfipolos (A8-35), se generaron las formas monomérica y dimérica del subcomplejo (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016).

El uso de agentes entrecruzadores ha permitido describir interacciones de las subunidades clásicas como α - β y α -OSCP, así como también uniones entre las subunidades Asa1-Asa4, Asa1-Asa7, Asa2-Asa4, Asa2-Asa7, Asa3-Asa8, Asa6-Asa6, al igual que un subcomplejo formado por Asa2/Asa4/Asa7 (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009; Cano-Estrada *et al.*, 2010). Asimismo, empleando subunidades Asa recombinantes se definió que las subunidades Asa4 y Asa7 interactúan fuertemente por medio de sus dominios C-terminales. Además, se estableció que tanto la subunidad Asa7 como el extremo carboxilo terminal de Asa4 parecen ser fundamentales para asociarse con Asa2. De igual forma, se ha encontrado que la interacción de Asa2 es importante para el reconocimiento de las subunidades Asa7 y Asa4 con la subunidad alfa, y que probablemente la subunidad Asa2 interactúa con OSCP (Cano-Estrada *et al.*, 2010; Miranda-Astudillo *et al.*, 2014). De la misma manera, se determinó que Asa1 abarca todo el brazo periférico de la enzima, desde una región cercana al lado expuesto a la matriz de la membrana interna mitocondrial hasta la región F₁, debido a que interactúa fuertemente con la mitad carboxilo terminal de OSCP, así como con la subunidad Asa8 (Colina-Tenorio *et al.*, 2016). Considerando lo descrito anteriormente, se ha propuesto un modelo estructural del complejo enzimático de *Polytomella* (Figura 15).

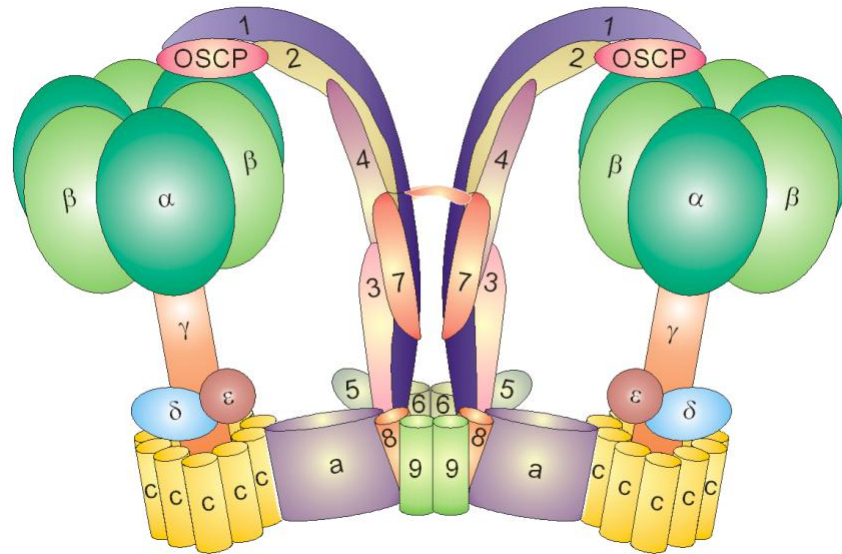


Figura 15. Modelo de topología de las subunidades Asa en la F₁F₀-ATP sintasa de *Polytomella* sp. Los números representan a las subunidades Asa1-9. Modificado de (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016).

Los estudios anteriores apoyan la idea de que las subunidades Asa sustituyen a aquellas involucradas en la formación del brazo periférico (*b*, *d*, *e*, *f*, *g*, A6L y F₆), en la dimerización del complejo enzimático (*e* y *g*) y en la regulación de la actividad enzimática (IF₁). Por lo tanto, se piensa que algunas de éstas podrían constituir los componentes básicos de un tallo periférico (Asa1, Asa2, Asa3, Asa4, Asa5 y Asa7), otras podrían participar en la dimerización y/o oligomerización de la enzima (Asa6, Asa8 y Asa9), y/o desempeñar una función regulatoria. En el presente trabajo, se propone abordar el estudio de las interacciones de las subunidades hidrofóbicas del brazo periférico de la ATP sintasa con el fin de obtener más información sobre el dominio membranal de este complejo enzimático.

HIPÓTESIS

Las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 se encuentran embebidas en la región membranal de la ATP sintasa del alga incolora *Polytomella* e interaccionan estrechamente entre sí y posiblemente con la subunidad *a*.

JUSTIFICACIÓN

La F_1F_0 -ATP sintasa se encuentra ampliamente distribuida en las membranas transductoras de energía de los seres vivos produciendo la mayoría del ATP celular. Todas las F-ATPasas, incluidas las mitocondriales, cloroplastídicas y bacterianas, comparten similitudes estructurales y funcionales. Sin embargo, hay diferencias en su composición que dependen de la especie. Tal es el caso de la enzima de las algas clorofíceas, la cual está compuesta por nueve subunidades atípicas (Asa1-9). Actualmente, se sabe muy poco acerca de la organización estructural del dominio membranal de este complejo enzimático. Considerando lo anterior, el interés del presente trabajo es profundizar en las interacciones de las subunidades embebidas en la bicapa lipídica de esta enzima, debido a que una mejor comprensión de su estructura contribuirá a un mayor conocimiento tanto de su función como de su regulación enzimática.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las interacciones de las subunidades hidrofóbicas que conforman el brazo periférico de la ATP sintasa del alga *Polytomella* sp.

Objetivos específicos

- Realizar un análisis *in silico* de las subunidades Asa hidrofóbicas y proponer un modelo de topología de membrana.
- Amplificar los genes que codifican las versiones maduras de las subunidades *a* (Atp6), *c* (Atp9), Asa6, Asa8 y Asa9 a partir de una genoteca de ADNc del alga *Polytomella* sp.
- Clonar los productos de amplificación de las proteínas del alga para producir las subunidades recombinantes empleando un sistema de expresión bacteriano.
- Purificar las proteínas recombinantes con la finalidad de realizar estudios de interacción.
- Proponer un modelo de la organización de las subunidades Asa en el dominio membranal.

RESULTADOS

Análisis bioinformático de las subunidades asociadas al dominio membranal de la ATP sintasa de *Polytomella* sp.

Análisis de estructura secundaria y topología de membrana de las subunidades Asa

Con la finalidad de obtener mayor información estructural de las subunidades Asa altamente hidrofóbicas, se realizó un análisis *in silico* empleando algoritmos diseñados para la predicción de estructura secundaria, segmentos membranales y su disposición en la bicapa lipídica. A partir de este análisis (Anexo I, pág. 114), se propuso un modelo consenso de la topología de membrana para Asa6, 8 y 9, el cual sugiere que dichas subunidades presentan al menos un cruce membranal (Figura 16). Asimismo, se predice que el amino terminal de las subunidades Asa6 y Asa9 se encuentra dispuesto hacia la matriz mitocondrial, mientras que su extremo carboxilo está orientado hacia el espacio intermembranal (Figura 16). Por el contrario, en el caso de Asa8 el análisis no indica una clara orientación tal como en los casos anteriores (Anexo I, pág. 115), es decir, podría estar dispuesto en la membrana al igual que Asa6 y Asa9 ó presentar una topología N-fuera C-dentro. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de motivos de secuencia asociados a la formación de homo- ó hetero- dímeros de segmentos membranales, encontrando sólo para Asa8 el motivo GxxxG, en donde x representa cualquier residuo (Figura 16). Estudios estructurales sugieren que este motivo maximiza las interacciones de Van der Waals y/o puentes de hidrógeno, al permitir que las cadenas de aminoácidos se encuentren lo suficientemente cercanos entre si, facilitando la interacción de los segmentos transmembranales (Teese & Langosch, 2015). En las ATP sintasas, se ha reportado la participación de este motivo en la formación de hetero-dímeros en las subunidades *e* y *g* de la enzima de levadura (Arselin *et al.*, 2003; Bustos & Velours, 2005).

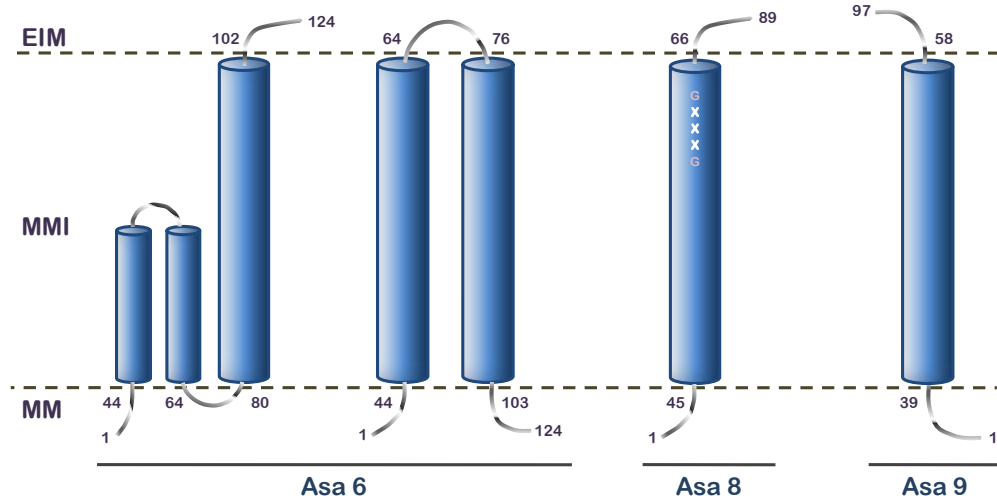


Figura 16. Modelo topológico de membrana de las subunidades hidrofóbicas Asa. Varios algoritmos bioinformáticos predicen las subunidades Asa8 y Asa9 con un Segmento TransMembranar (STM, representado como un cilindro). Se resalta el motivo GxxxG de la subunidad Asa8, debido a que podría dar lugar a la formación de homo- o hetero- dímeros. Los modelos predichos para Asa6 varían con los diferentes programas que se utilizaron: un STM, dos STM o un modelo con un STM y una hélice re-entrante (HR-E). Los números indican la posición del residuo para cada una de las secuencias de las subunidades Asa. Se representan solamente dos posibles topologías de membrana para Asa6 (2 STM y 1 STM con 1HR-E), y en el caso de Asa8 una Orientación In→out (N- y C- terminal, respectivamente). EIM: Espacio Inter Membranar, MMI: Membrana Mitocondrial Interna, MM: Matriz Mitocondrial.

En conjunto, modelos teóricos en tres dimensiones de las subunidades Asa6, 8 y 9 se obtuvieron empleando diversos servidores para la predicción de estructura terciaria de proteínas (Figura 17). Posteriormente, se seleccionaron aquellos con un menor valor p y una puntuación más alta del conjunto total de modelos generados, además de ser acordes con el análisis de estructura secundaria y topología de membrana anteriormente descrito (Anexo I, pág. 114-118). Los modelos por homología de las subunidades Asa6 y Asa9 se obtuvieron a través del servidor en línea Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>) (Källberg *et al.*, 2012) usando como templatado a las estructuras con código de acceso 4MT1 (Inner Membrane Multidrug Efflux Pump) y 4YLR (Tubulin Glutamylase) de la PDB (Base de datos de proteínas, por sus siglas en inglés) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Por su parte, el modelo de Asa8 se generó usando el sitio web Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/) (Kelley *et al.*, 2015). Los modelos seleccionados se optimizaron empleando el programa Chimera de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen *et al.*, 2015).

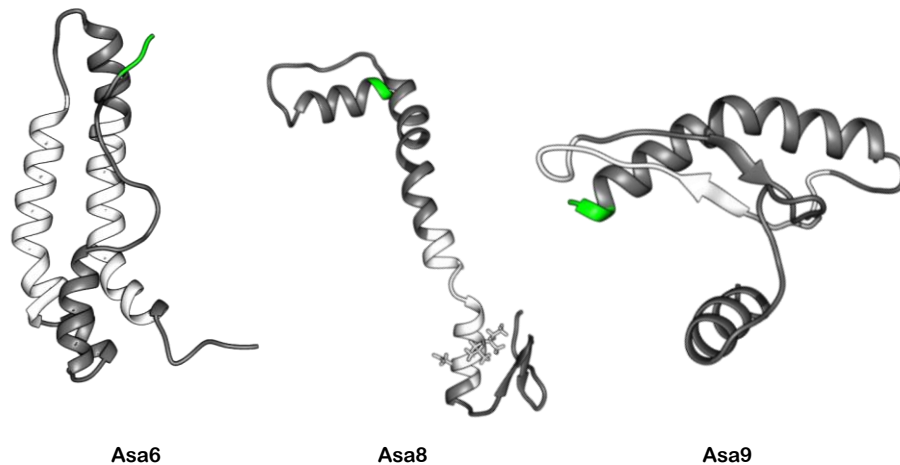


Figura 17. Modelos tridimensionales por homología de Asa6, Asa8 y Asa9. La figura muestra los modelos estructurales obtenidos de las subunidades Asa asociadas al dominio F_0 de la ATP sintasa de *Polytomella*. En verde se representa a los primeros tres aminoácidos del N-terminal, asimismo en blanco al segmento membranal (de acuerdo con la información obtenida del análisis *in silico*). Además, en Asa8 se resaltan los residuos que componen el motivo GxxxG (Gly59-Gly63).

A pesar de la estrategia anteriormente empleada, no es sencillo obtener un modelo teórico consistente con el análisis de estructura secundaria y de topología de membrana. Esta tarea se dificulta aún más considerando que estas subunidades Asa carecen de homólogos cercanos en la base de datos de proteínas ($\leq 20.0\%$ de homología con respecto a otras subunidades de las ATP sintasas ortodoxas). Sin embargo, la subunidad Asa8 es la que presenta la mejor correlación entre ambos modelos propuestos. En el caso de Asa6, el modelo teórico obtenido muestra un segmento transmembranal y una región helicoidal con un alto valor de hidrofobicidad, similar a uno de los posibles arreglos de topología de membrana. Para la subunidad Asa9, los resultados de predicción de estructura terciaria guardan grandes diferencias entre sí, ya que en la mayoría de los casos se obtenían solamente modelos con regiones helicoidales cortas y un gran porcentaje de la estructura sin una conformación definida.

Análisis de hidropatía del amino terminal de la subunidad a

Por otra parte, la subunidad *a* y el anillo de subunidades de *c* son las proteínas con mejor resolución estructural gracias a la evidencia experimental obtenida a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica (Allegretti *et al.*, 2015) del dominio membranal de la ATP sintasa de *Polytomella*. Recientemente, un enfoque bioinformático ha predicho la disposición de la subunidad *a* con respecto al oligómero de *c* con una mayor precisión (Leone & Faraldo-Gómez, 2016). No obstante, aún no se puede asignar de manera concluyente la disposición del segmento N-terminal de la primera. Por ello, se realizó un análisis comparativo del perfil de hidropatía de los residuos que componen esta región, es decir, del primer aminoácido hasta el primer cruce membranal, de la subunidad *a* del complejo enzimático de la bacteria *E. coli* (Figura 18B) y del alga *Polytomella* (Figura 18A), encontrando que en el caso del alga éste no parece ser lo suficientemente hidrofóbico para que pueda insertarse en la membrana.

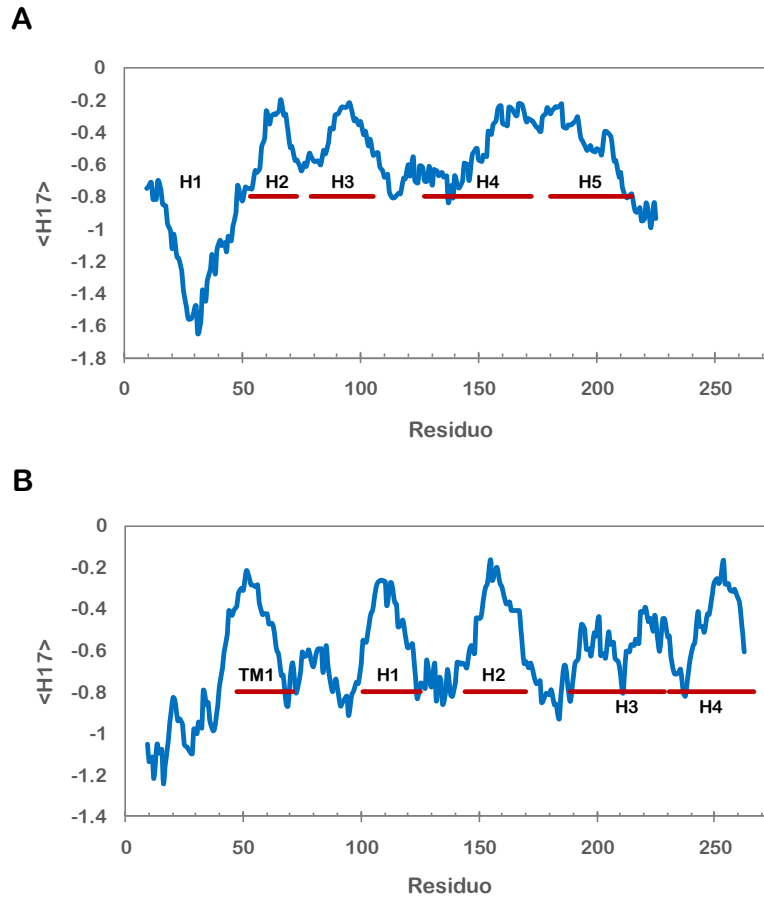


Figura 18. Perfiles de hidropatía de la subunidad α del complejo enzimático del alga *Polytomella* y la bacteria *E. coli*. Panel A (*Polytomella* sp.) Las regiones alfa helicoidales se designaron como H1 a H5. El no. de aminoácidos que comprende cada región es: para H1 2-47, para H2 53-73, para H3 79-105, para H4 127-172 y para H5 180-215. Se indica con una línea roja las regiones putativas embebidas en la membrana. Panel B (*E. coli*) El segmento de membrana vertical (TM1) y las cuatro alfa hélices horizontales membranales (H1 a H4) se detallan como en el panel anterior (línea roja). Los aminoácidos que componen cada región son: para TM1 47-71, para H1 101-125, para H2 144-170, para H3 189-229 y para H4 231-267. Los residuos descritos anteriormente son semejantes a los reportados por (Leone & Faraldo-Gómez, 2016). <H17> significa que la ventana de aminoácidos del perfil de hidropatía es de 17 residuos.

Para reforzar esta idea, la secuencia de la subunidad α se dividió en dos regiones, la primera correspondiente a la región amino terminal (H1) y la segunda que comprende los cuatro segmentos horizontales de membrana (H2-5), y para cada una se graficaron los valores de hidrofobicidad media contra la hidrofobicidad local máxima para la subunidad α de diferentes organismos. Se observó que la región N-terminal de las subunidades α de las algas codificadas en el núcleo forman claramente un grupo que presenta un valor menor de hidrofobicidad (círculo verde, figura 19A), en cambio el resto de

las secuencias codificadas en la mitocondria (círculo gris, figura 19A) conforman otro grupo separado por un mayor valor de hidrofobicidad. En contraste, en la región C-terminal sólo es posible observar la formación de un grupo heterogéneo que presenta un alto valor de hidrofobicidad (Figura 19B).

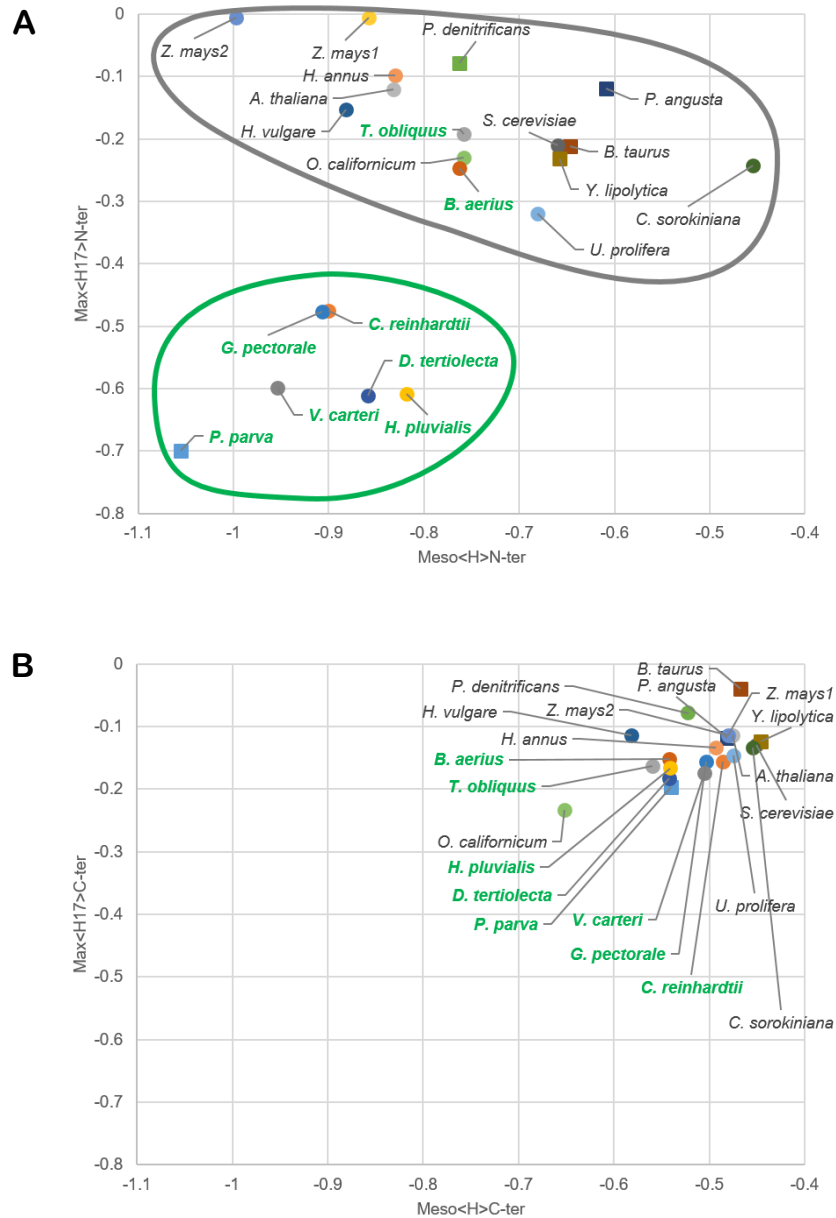


Figura 19. Gráfica de hidrofobicidad para las regiones N- y C- terminal de la subunidad *a* de diferentes organismos. Panel A. Gráfico de la hidrofobicidad media (Meso<H17>) contra la hidrofobicidad local máxima (Max<H17>) para el amino terminal de la subunidad *a* de diferentes organismos. En el caso de las algas (círculo verde) los aminoácidos de la región amino terminal son equivalentes a la H1 de *Polytomella* (Figura 19, panel A), mientras que para el resto de organismos (círculo gris) es equivalente al TM1 de *E. coli* (Figura 19, panel B). Los cuadros de color de la gráfica indican aquellas subunidades *a* cuya estructura tridimensional ha sido parcialmente resuelta por cristalografía de rayos X o crío-microscopía electrónica, mientras que los círculos de color indican aquellas subunidades *a* de las cuáles aún no se cuenta con información estructural detallada. Las secuencias empleadas en la gráfica pertenecen a la bacteria *Paracoccus denitrificans*; el mamífero *Bos taurus*; las levaduras *Yarrowia lipolytica* y *Pichia angusta*; las plantas *Hordeum vulgare*, *Ulva prolifera*, *Helianthus annuus*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays1* y *Zea mays2*; el alga trebuxofícea *Chlorella sorokiniana*, las clorofíceas (Sphaeropleales) *Tetrademus obliquus* y *Bracteacoccus aerius*, y las clorofíceas (Chlamydomonadales) *Polytomella parva*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gonium pectorale*, *Volvox carteri*, *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella tertiolecta*. Panel B. Gráfico de la hidrofobicidad media (Meso<H17>) contra la hidrofobicidad local máxima (Max<H17>) para el carboxilo terminal de la subunidad *a* de diferentes organismos. Tanto la simbología como los organismos empleados es la misma que en el Panel A.

Tomando en cuenta lo anterior, se propone un modelo teórico de la subunidad *a* del alga *Polytomella* empleando el servidor Phyre2 y el programa Chimera como se describió anteriormente. Este modelo considera que dicha subunidad presenta cuatro hélices dispuestas de manera casi horizontal a lo largo de la membrana (H2-5, figura 20A), pero carece de una región amino terminal insertada en la membrana de manera vertical (H1, figura 20B), a diferencia de lo descrito en enzimas canónicas de otros organismos como *E. coli* (Ishmukhametov *et al.*, 2017).

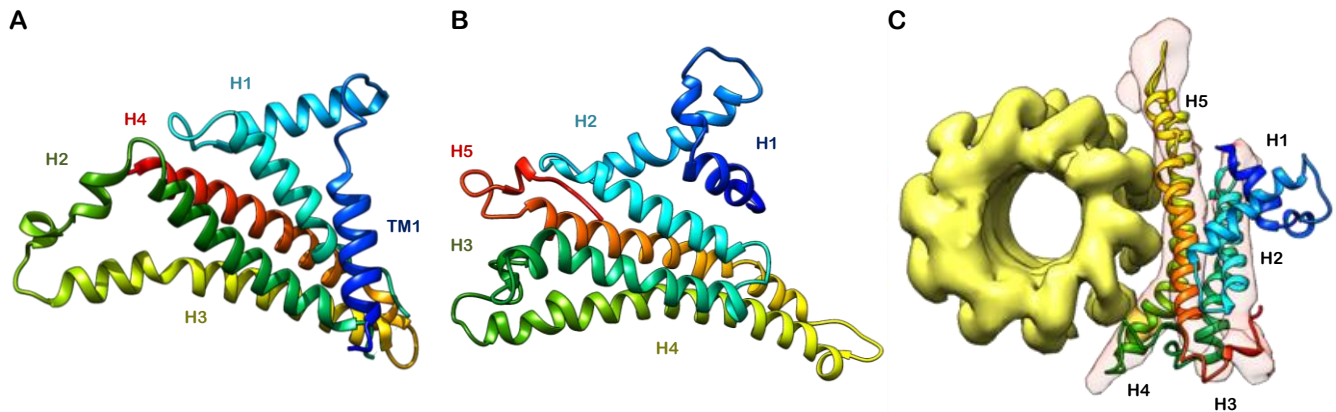


Figura 20. Modelo tridimensional de la subunidad *a* de la ATP sintasa de *E. coli* y *Polytomella*. Panel A (*E. coli*). El código de color de la estructura cristalográfica va del N- (azul) al C- (rojo) terminal de la subunidad *a* bacteriana. Los segmentos helicoidales de la secuencia se designaron como TM1 y H1 a H4. Los aminoácidos que comprenden cada región son: para TM1 47-71, H1 101-125, para H2 144-170, para H3 189-229 y para H4 231-267 (8.53 Å de resolución, No. PDB 5T4Q) (Sobti *et al.*, 2016). Panel B (*Polytomella*). Mismo código de color que en panel A para la subunidad *a* del alga. Los segmentos helicoidales de la secuencia se designaron como H1 a H5. El no. de aminoácidos que comprende cada región es: para H1 2-47, para H2 53-73, para H3 79-105, para H4 127-172 y para H5 180-215. La región H1 es la más hidrofílica y se encuentra expuesta hacia la matriz mitocondrial, por el contrario los segmentos señalados como H2 a H5 corresponderían a las alfa hélices horizontales putativas embebidas en la membrana interna mitocondrial. Panel C. Perspectiva desde la matriz mitocondrial del dominio membranal de la ATPasa de *Polytomella*. A la izquierda se encuentra el anillo de subunidades de *c* (amarillo) y a la derecha la disposición del modelo teórico de la subunidad *a* (en color). La posición de esta última se realizó sobreponiendo el modelo teórico de la subunidad *a* sobre la densidad electrónica de las cuatro hélices horizontales (rosa) obtenidas a partir del imágenes de crío-microscopía electrónica del complejo dimérico de *Polytomella* (No. de acceso EMD-2852, Allegretti *et al.*, 2015).

Producción heteróloga de las subunidades hidrofóbicas de la ATP sintasa de *Polytomella*

Clonación de las subunidades recombinantes

El objetivo principal del presente trabajo es conocer la organización de las subunidades Asa en el dominio membranal de la ATP sintasa de *Polytomella*. Utilizando proteínas recombinantes mediante técnicas de interacción *in vitro*, se caracterizaron las interacciones de estas subunidades. A partir de una genoteca de ADNc del alga se amplificaron los genes que codifican para las versiones maduras de las subunidades (Anexo II, pág. 123): *a* (Atp6) (702 pb), *c* (Atp9) (384 pb), Asa6 (375 pb), Asa8 (270 pb) y Asa9 (294 pb) (Figura 21).

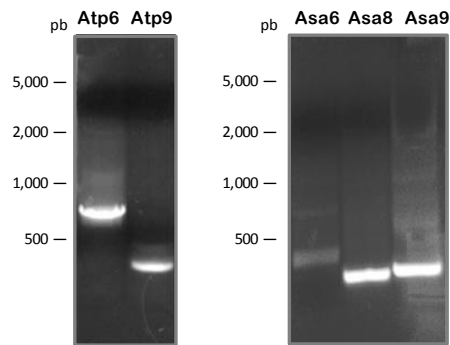


Figura 21. Productos de amplificación de las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. En la figura se muestran los amplicones analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %. En la parte superior se indica la subunidad correspondiente para cada producto de PCR. A la izquierda de cada gel se indica el número de pares de bases (pb) de acuerdo con el marcador de peso molecular (ver materiales y métodos, pág. 90).

Sub-clonación en vectores de expresión y producción recombinante

La estrategia de sub-clonación se realizó con la finalidad de obtener mayor información sobre la organización estructural de las subunidades Asa hidrofóbicas. Debido a que las subunidades *a* y *c* son las más caracterizadas del dominio membranal, los productos de amplificación previamente obtenidos se clonaron en el vector pGEM®-T Easy y se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , empleando como marcadores de selección la resistencia antibiótica a ampicilina y el sistema de alfa complementación (actividad de la enzima β -galactosidasa). Posteriormente, estos insertos se ligaron en los vectores del sistema del doble híbrido y solamente los productos de amplificación que corresponden a las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 se sub-clonaron en los vectores de expresión pET3a y pET28a (Tabla II), además este último confiere una etiqueta de seis histidinas (6His) en el amino terminal facilitando su purificación.

Tabla II. Construcciones empleadas en el presente trabajo.

Subunidad	Vector	Tipo de vector
Atp6	pGEM	Clonación
Atp9		
Asa6		
Asa8		
Asa9		
Atp6	pGADT7	Y2H (Dominio de activación, DA)
Atp9		
Asa6		
Asa8		
Asa9		
Atp6	pGBKT7	Y2H (Dominio de unión, DU)
Atp9		
Asa6		
Asa8		
Asa9		
Asa6	pET3a	Expresión
Asa8		
Asa9		
Asa6	pET28a	Expresión (Etiqueta de 6His)
Asa8		
Asa9		

Posteriormente, se realizaron ensayos de expresión empleando diferentes cepas de *E. coli* DE3 (BL21 CodonPlus-RIL, BL21 pLyss, Origami, Rosetta y Tuner) y se determinaron las mejores condiciones de producción recombinante. Sin embargo, en virtud de su carácter altamente hidrofóbico su producción fue limitada, posiblemente debido a problemas asociados con la agregación y la toxicidad (Rajesh *et al.*, 2011). A pesar de ello, las subunidades Asa recombinantes se obtuvieron utilizando la cepa *E. coli* C41 (DE3) (Figura 22), la cual ha demostrado facilitar la expresión de proteínas de membranas superando los efectos tóxicos asociados a su producción (Miroux & Walker, 1996). Las condiciones de expresión para Asa6 (sin etiqueta) fueron 6 h de inducción a 30 °C. Mientras que, para Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His} fueron 6 h de inducción a 37 °C, así como para la versión Asa8 y Asa9 (sin etiqueta) empleando 0.1 mM de IPTG.

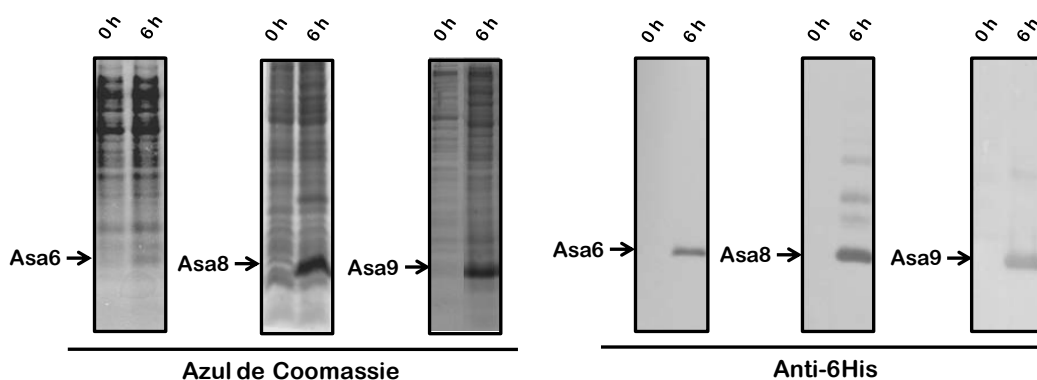


Figura 22. Expresión de las subunidades Asa marcadas con una etiqueta de histidina. Ensayos de expresión de las subunidades Asa6, 8 y 9 empleando el vector pET28a en *E. coli* C41(DE3). A la izquierda geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 % de las fracciones correspondientes al tiempo cero y seis horas de inducción (10 μ L de fracción) teñidos con azul de Coomassie. A la derecha inmunorrélicas tipo Western de las mismas fracciones empleando el anticuerpo que reconoce a la etiqueta de histidina.

Purificación de las subunidades Asa recombinantes

Las subunidades recombinantes, con o sin etiqueta de histidina, se purificaron a partir de cuerpos de inclusión (Figura 23), previamente lavados y solubilizados con detergente, a través de una columna de afinidad (columna de Ni-NTA) por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés) de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. En la figura 24B se muestran las fracciones purificadas Asa6_{6His}, Asa8_{6His}, y Asa9_{6His}. En la misma figura, se puede apreciar que éstas presentan algunas bandas discretas que podrían representar formas oligoméricas o pequeñas cantidades de impurezas, no obstante exhiben claramente un polipéptido principal.

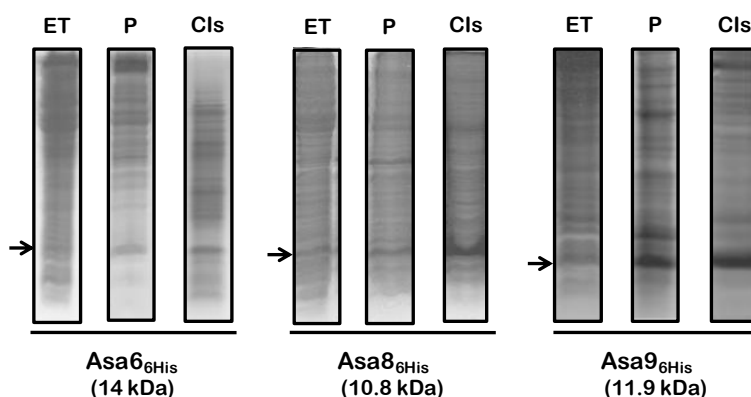


Figura 23. Cuerpos de inclusión de las subunidades Asa marcadas con una etiqueta de histidina. Geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 % de las fracciones correspondientes al extracto total (10 μ L de fracción), pastilla celular (30 μ L de fracción) y al producto final del lavado de los cuerpos de inclusión (30 μ L de fracción) de las subunidades Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His} teñidos con azul de Coomassie. En la parte inferior y con una flecha se indica la subunidad recombinante correspondiente, así como su peso molecular estimado entre paréntesis. ET: extracto total, P: pastilla y Cls: cuerpos de inclusión lavados.

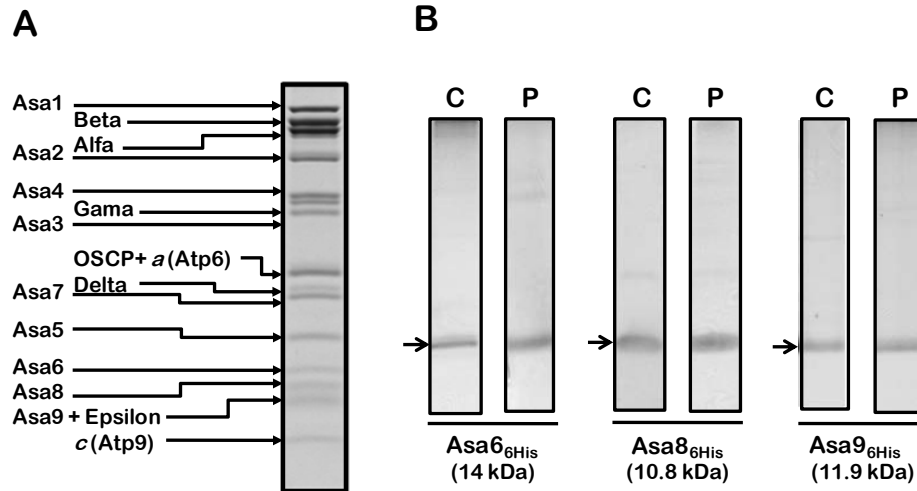


Figura 24. Complejo V de *Polytomella* sp. y las subunidades recombinantes Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His} purificadas. Panel A. Gel de tricina SDS-PAGE al 14.0 % teñido con azul de Coomassie de la ATP sintasa del alga (100 µg de proteína). A la izquierda se describe la identidad de cada banda del complejo enzimático. Panel B. Gel de tricina SDS-PAGE al 14.0 % de las fracciones purificadas (50 µg de proteína) correspondiente a las subunidades Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His} teñidas con azul de Coomassie (izquierda) y plata (derecha). En la parte inferior y con una flecha se indica la subunidad recombinante correspondiente, así como su peso molecular estimado entre paréntesis. C: tinción de azul de Coomassie y P: tinción de plata.

Generación de anticuerpos de las subunidades Asa6, 8 y 9 recombinantes

En el presente trabajo además de hacer uso del anticuerpo anti-histidinas (Figura 25A), se obtuvieron los anticuerpos policlonales que reconocen a las subunidades Asa6, 8 y 9 inmunizando a conejos con las versiones recombinantes previamente purificadas mediante cromatografía de afinidad. En la figura 25B se observa que los anticuerpos generados en conejo son capaces de reconocer de manera específica tanto a las proteínas recombinantes etiquetadas con histidina, así como las versiones no marcadas y las subunidades nativas de la ATP sintasa de *Polytomella*. El título de anticuerpo empleado tanto para las inmunorréplicas, como para los ensayos de interacción fueron 1:25,000 para Asa 6 y 8; y 1:10,000 para Asa9.

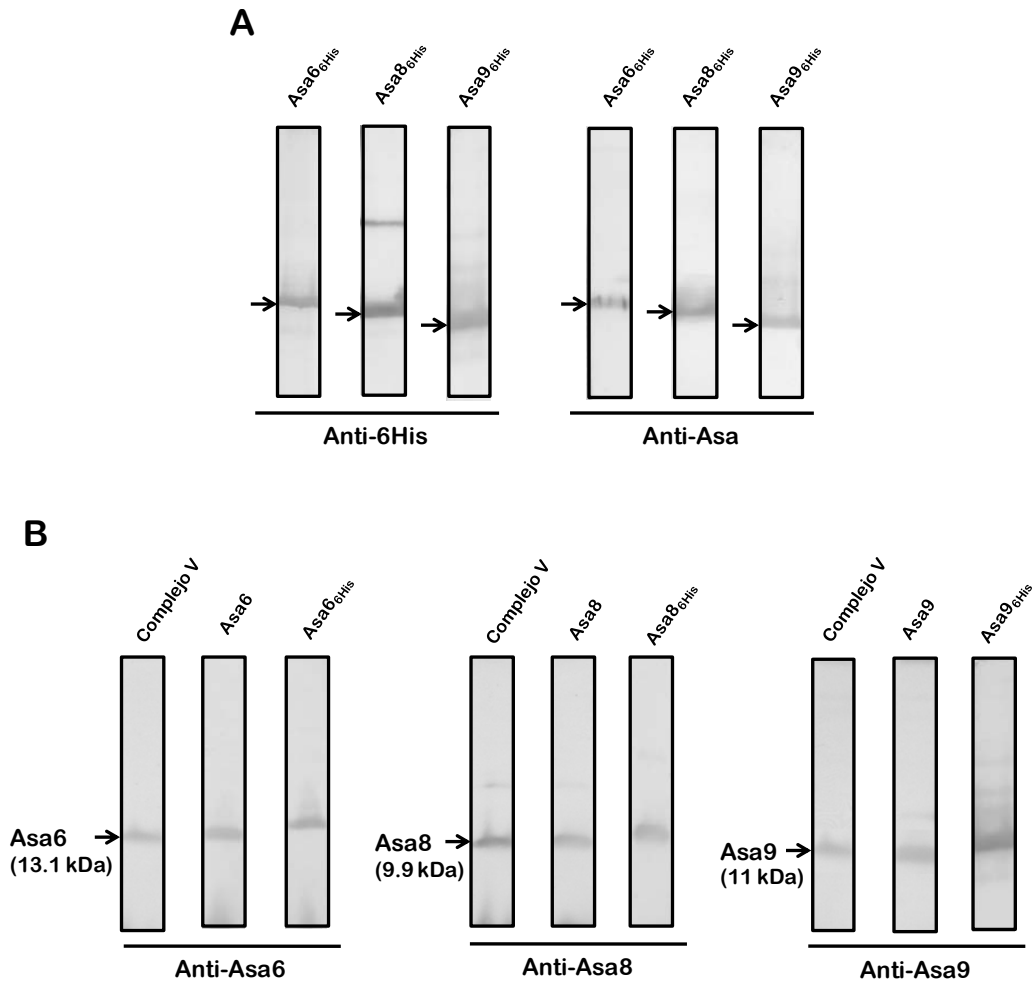


Figura 25. Anticuerpos empleados en el presente trabajo. Panel A. Inmunorreplica tipo Western de Asa6_{6His} (carril izquierdo), Asa8_{6His} (carril central), y Asa9_{6His} (carril derecho) usando los anticuerpos anti-6His (izquierda) y el anti-Asa correspondiente (derecha). Panel B. Reconocimiento específico de las subunidades Asa6, 8 y 9 tanto en el complejo enzimático nativo (Complejo V, carril izquierdo), como de las proteínas recombinantes sin marcar (carril central) o etiquetadas con histidina (carril derecho). Se cargaron 30 μ g de proteína en cada carril.

Ensayos de interacción de las subunidades del dominio membranal de la ATP sintasa de *Polytomella*

Interacciones in vitro de las subunidades Asa del dominio membranal

El estudio de las interacciones proteína-proteína (IPP) es un paso importante hacia la comprensión de la función de los complejos polipeptídicos en los sistemas biológicos (Chang *et al.*, 2016). Los métodos de IPP se clasifican en tres tipos: *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. El análisis *in silico* incluye enfoques basados en el análisis de secuencias, la predicción de estructura secundaria y terciaria, el modelado dinámico de proteínas, los árboles filogenéticos y la ontología de genes, entre otros métodos basados en la expresión génica. Mientras que, las técnicas *in vitro* más comúnmente empleadas son: la purificación por afinidad, la co-immuno precipitación (Co-IP), la complementación de fragmentos de proteínas (PCA), la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), la cristalografía de rayos X y la espectroscopía de RMN. Finalmente, los métodos *in vivo* son el sistema del doble híbrido en levadura y la letalidad sintética (Rao *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se abordaron tres estrategias para caracterizar las interacciones de las subunidades recombinantes Asa6, Asa8 y Asa9: *i)* la inmunorréplica tipo Far-Western, *ii)* la co-purificación por cromatografía de afinidad, y *iii)* el sistema del doble híbrido en levadura. Adicionalmente, se realizaron ensayos de entrecruzamiento con el complejo nativo del alga.

Inmunorréplica tipo Far-Western

Mientras que en la inmunorréplica convencional (tipo Western), las proteínas previamente separadas en un gel de poliacrilamida son transferidas a una membrana de nitrocelulosa e identificadas empleando anticuerpos específicos, en la tipo Far-Western (F-WB) las proteínas son utilizadas como "carnada" para identificar pares de interacción proteína-proteína (Hall, 2004). En consecuencia, esta metodología se ha empleado para determinar la interacción de la(s) proteína(s) de interés ("presa") usando como carnada no solo complejos polipeptídicos, sino también una gran variedad de versiones de proteínas recombinantes e incluso moléculas de ADN (Walsh *et al.*, 2012).

Inicialmente, se realizaron ensayos de IPP mediante la inmunorréplica tipo F-WB utilizando como presa a las subunidades purificadas marcadas con histidina y el complejo de la ATP sintasa de *Polytmella* como carnada (Tabla III). De modo que, el complejo enzimático del alga una vez separado en sus subunidades e inmovilizado sobre la membrana de nitrocelulosa se incubó de manera independiente en presencia de Asa6_{6His}, 8_{6His} y 9_{6His} y en seguida, con el anticuerpo anti-6His, el cual reconoce a la proteína recombinante en caso de haber interacción (Anexo III, figura 6, pág. 124).

Tabla III. Pares de interacción de las subunidades Asa recombinantes con el complejo nativo de *Polytomella* mediante la inmunorréplica tipo Far-Western.

Membrana de nitrocelulosa	Medio de incubación	Resultado de interacción
Complejo V	Asa6	Asa1/Asa3/Asa5 Asa6/Asa9
Complejo V	Asa8	Asa1/Asa3/Asa5
Complejo V	Asa9	Asa1/Asa3/Asa5 Asa8/Asa9

En la tabla anterior se puede apreciar que Asa6 es la subunidad que presenta un mayor número de pares de interacción putativos, seguida de Asa9 y Asa8. No obstante, hay bandas que podrían ser productos inespecíficos de interacción, indicados con signos de interrogación, mientras que en Asa6 corresponderían a la subunidad beta o alfa (Anexo III, figura 6A, pág. 124), adicionalmente se encuentran Asa7 en Asa9 (Anexo III, figura 6C, pág. 125). Estos resultados sugieren que Asa6, 8 y 9

podrían estar interaccionando con algunas subunidades extrínsecas de membrana como Asa1, 3 y 5, al igual que éstas podrían estar formando homodímeros (Asa6-Asa6). Asimismo, siguiendo esta metodología se ha reportado la interacción Asa1/OSCP/Asa8 (Colina-Tenorio *et al.*, 2016). En este sentido, se ha descrito la formación de dos sub-complejos estables, el primero de ellos compuesto por las subunidades Asa1/Asa3/Asa5/Asa8/a/c (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006) y el segundo equivalente al monómero de la enzima del alga (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016).

A pesar de que estos resultados concuerdan con lo obtenido anteriormente, es necesario confirmar la interacción de las subunidades individuales para que éstos sean concluyentes. Por consiguiente, se realizaron los ensayos de interacción con las proteínas recombinantes Asa6, 8 y 9 (Tabla IV).

Tabla IV. Pares de interacción de las subunidades Asa recombinantes mediante la inmunorréplica tipo Far-Western.

Membrana de nitrocelulosa	Medio de incubación	Resultado de interacción
Asa6	Asa6	Negativo
Asa6	Asa8	Parcial
Asa6	Asa9	Negativo
Asa8	Asa8	Negativo
Asa8	Asa6	Negativo
Asa8	Asa9	Positivo
Asa9	Asa9	Negativo
Asa9	Asa6	Negativo
Asa9	Asa8	Positivo

Sin embargo, a pesar de haber ensayado diferentes condiciones de interacción, solamente se observó de manera clara la interacción Asa8-Asa9, ya que dicho reconocimiento se detectó en ambos pares de interacción Asa8-Asa9 (Figura 26A) y Asa9-Asa8 (Anexo III, figura 7A, pág. 126). En este ensayo, varios carriles de membrana de nitrocelulosa, que contenían la misma concentración de Asa9_{6His} (1 nmol), se incubaron con concentraciones crecientes de Asa8_{6His} (0-5 nmol) y después con el anticuerpo anti-Asa8. Finalmente, se observó un incremento en la intensidad de la señal conforme el aumento en la concentración de Asa8_{6His}, sugiriendo una interacción Asa8-Asa9 (Figura 26A). De la

misma manera, se observó de manera parcial la interacción Asa6-Asa8 (Figura 26B), puesto que no se validó con la contra parte del par de interacción Asa8-Asa6 (Anexo III, figura 7B, pág. 126).

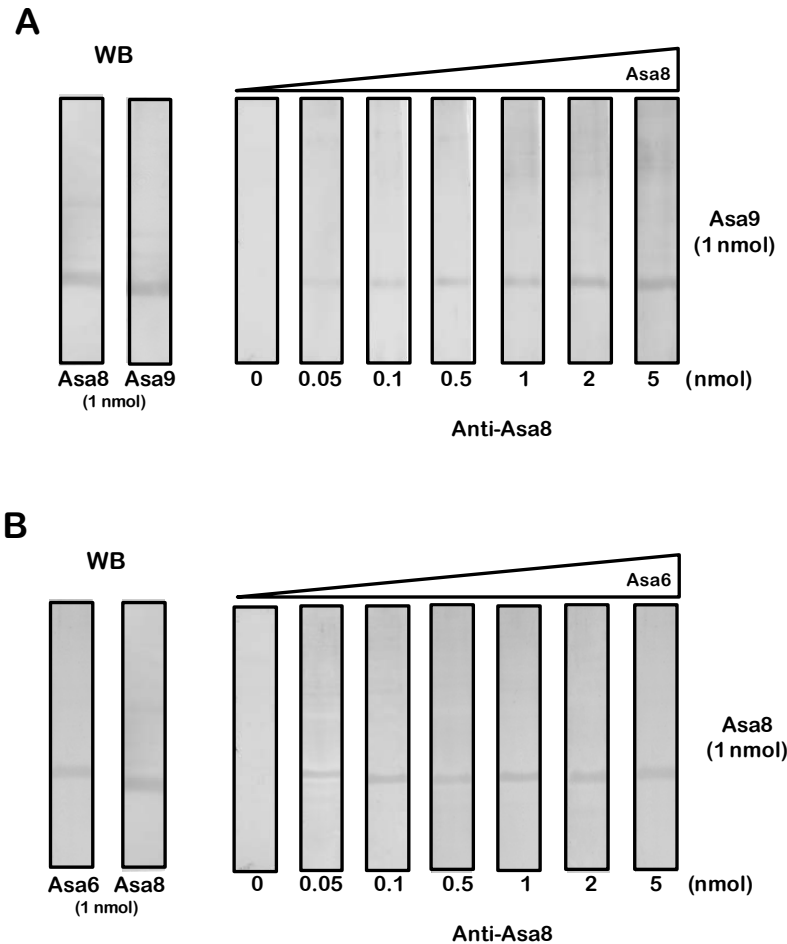


Figura 26. Interacción de la subunidad Asa8 con Asa9 y Asa6 ensayadas por inmunorréplica tipo Far-Western. Izquierda: Electrotransferencia tipo Western (WB) de las subunidades Asa8-Asa9 (Panel A) y Asa6-Asa8 (Panel B) marcadas con histidina, un nanomol de cada proteína se transfirió y decoró independientemente con su anticuerpo respectivo (control de transferencia y revelado). Derecha: En panel A ensayos de interacción Asa9_{6His} (1 nanomol por carril) incubado con cantidades crecientes de Asa8_{6His} (0-5 nanomoles de proteína, indicados en la parte inferior y representado como un triángulo en la parte superior) y luego decorado con un anticuerpo anti-Asa8. En panel B ensayos de interacción Asa8_{6His} (1 nanomol por carril) incubado con cantidades crecientes de Asa6_{6His} (0-5 nanomoles de proteína, indicados en la parte inferior y representado como un triángulo en la parte superior) y luego decorado con un anticuerpo anti-Asa6. Asa6_{6His}: 14 kDa, Asa8_{6His}: 10.8 kDa y Asa9_{6His}: 11.9 kDa.

Co-purificación mediante cromatografía de afinidad

Esta metodología se basa en la unión específica de los polipéptidos de interés, provenientes de una mezcla compleja de componentes, a una columna de afinidad a través de la interacción con proteínas recombinantes marcadas con histidina, debido a la alta afinidad de este residuo por la matriz de níquel. De esta manera, los polipéptidos blanco permanecen adosados a la columna, mientras que el resto de los componentes no se unen a la misma o lo hacen muy débilmente, a pesar de ello cualquier interacción inespecífica puede desplazarse competitivamente con concentraciones bajas de imidazol (Wilchek & Miron, 1999).

En principio, para determinar el tipo de asociación que pudieran establecer las subunidades Asa hidrofóbicas se realizaron ensayos de co-purificación mediante cromatografía de afinidad (Copu-CAf). Para esto, Asa_{6His} se unió a una columna de Ni-NTA y se lavó con 30 mM de imidazol. A continuación, a la misma columna se cargó Asa₆ y se repitió el lavado. Ambas subunidades eluyeron empleando un gradiente de imidazol (30-500 mM). En paralelo, en una segunda columna de afinidad se cargó solamente Asa₆ y se procedió como se describió anteriormente. Esta segunda columna funcionó para descartar la presencia de cualquier interacción inespecífica de la subunidad sin etiqueta con la matriz de níquel. La versión recombinante de la proteína con etiqueta de 6His y sin marca pueden distinguirse tanto por su diferencia en el perfil de migración en geles de poliacrilamida de gradiente discontinuo (del 12.5 al 18.0 %), como por el análisis de las inmunorrélicas tipo Western. De esta forma, Asa₆ eluyó fácilmente cuando no había otra proteína unida a la columna (Figura 27A, sección superior). En contraste, la mayor parte de la fracción del polipéptido sin marca se mantuvo en la columna en presencia de Asa_{6His}. Así, ambas subunidades se encontraron en las mismas fracciones del gradiente de imidazol (Figura 27A, sección central e inferior). El anticuerpo anti-Asa₆ reconoció a ambos polipéptidos (Asa₆ y Asa_{6His}) (Figura 27A, sección central), mientras que el anticuerpo anti-histidina reconoció solamente a la versión con etiqueta (Asa_{6His}) (Figura 27A, sección inferior).

De manera similar, se caracterizó la interacción de Asa₈ consigo misma. El análisis de las inmunorrélicas tipo Western de las fracciones correspondientes al perfil de elución de la co-purificación de Asa_{8His} y Asa₈ sugirió que, solamente cuando se unió primero Asa_{8His} a la columna ambos polipéptidos recombinantes se encontraban en las mismas fracciones de co-purificación (Figura 27B, sección central e inferior). Cuando sólo se cargó Asa₈ a la columna (Figura 27B, sección superior)

esta no se unió a la columna. Lo anterior sugiere una interacción Asa8^{6His}-Asa8. Por el contrario, siguiendo el procedimiento anterior, los resultados obtenidos indican que Asa9 no forma ningún tipo de asociación consigo misma, ya que Asa9 eluyó de la columna independientemente si Asa9^{6His} se encontraba unida o no a la matriz de níquel (Anexo III, figura 8, pág. 127).

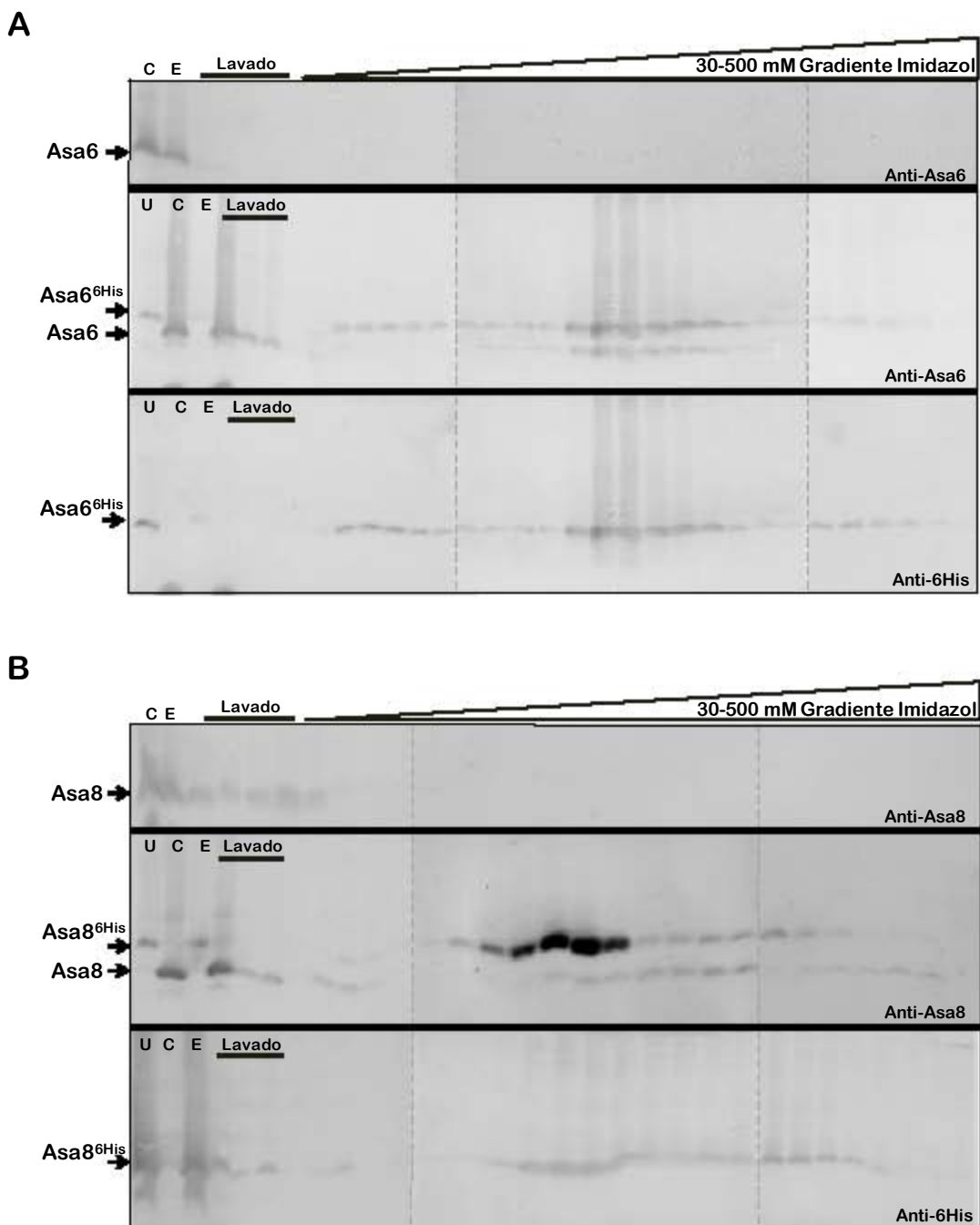


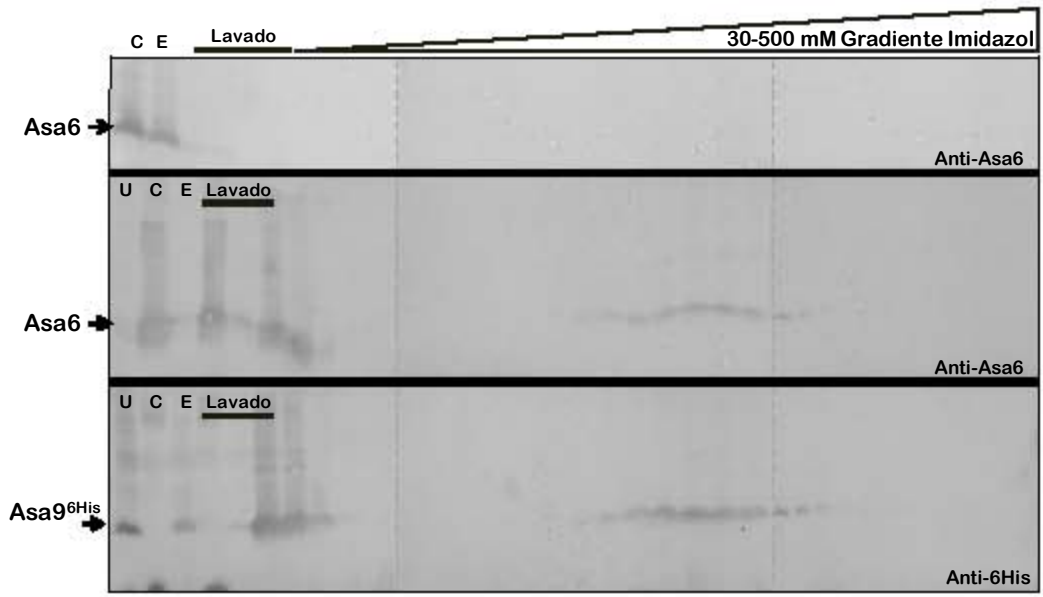
Figura 27. Las subunidades recombinantes Asa6 y Asa8 se asocian formando homo-dímeros mediante Copu-CAf. Interacción de las subunidades Asa6-Asa6_{6His} (Panel A) y Asa8-Asa8_{6His} (Panel B) ensayadas por Copu-CAf. En cada panel se muestran las inmunorrélicas tipo Western de las fracciones de elución del gradiente de imidazol cuando la proteína recombinante sin marca (Panel A: Asa6 | Panel B: Asa8) se cargó sola a una columna (Sección superior) o cuando previamente a una columna se unió el polipéptido con etiqueta (Panel A: Asa6_{6His} | Panel B: Asa8_{6His}) (Sección intermedia e inferior). Los carriles señalados como U, C y E corresponden a: unida (Panel A: Asa6_{6His} | Panel B: Asa8_{6His}), cargada (Panel A: Asa6 | Panel B: Asa8) y proteína excluida de la columna (lavada), respectivamente. El lavado se realizó con 30 mM de imidazol. El gradiente de imidazol (30-500 mM) se representa con un triángulo. Los inmunoblots utilizados por panel se indican con líneas punteadas, así como el anticuerpo empleado en la esquina inferior derecha. Asa6: 13.1 kDa, Asa6_{6His}: 14 kDa, Asa8: 9.9 kDa y Asa8_{6His}: 10.8 kDa.

Los resultados obtenidos indican que las subunidades Asa6 y Asa8 en las condiciones del ensayo de co-purificación son capaces de asociarse consigo mismas. La observación de un homo-dímero de Asa6 concuerda con lo encontrado mediante la inmunorréplica tipo Far-Western con el complejo nativo del alga, en cambio para Asa8 la información deducida a partir del análisis *in silico* propone que el motivo de glicina (G⁵⁹xxxG⁶³) podría ser suficiente para la formación de un homo-dímero.

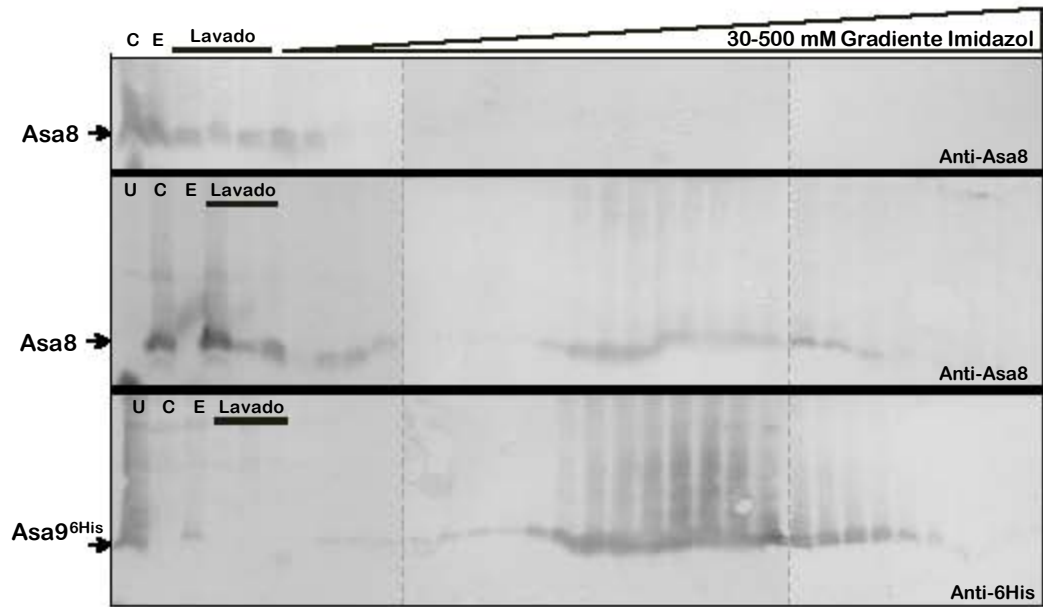
Continuando con la caracterización *in vitro* de las proteínas recombinantes, se probaron las posibles combinatorias de los pares de interacción Asa6, 8 y 9. Siguiendo la metodología anterior, las subunidades Asa6 y Asa8 se cargaron de manera independiente en columnas paralelas sin ninguna otra proteína unida a la misma (Figura 28A y 28B, sección superior) o con la subunidad Asa9_{6His} previamente unida a la misma columna (Figuras 28A y 28B, sección central e inferior). Teniendo como resultado que, exclusivamente cuando Asa9_{6His} se encontraba unida a la columna de afinidad las subunidades Asa6 y Asa8 eluyeron en las mismas fracciones del perfil de co-purificación.

De la misma manera, solamente se cargó Asa6 a una columna (Figura 28C, sección superior) y en conjunto uniendo previamente a otra columna Asa8_{6His} (Figura 28C, sección central e inferior). Encontrando que, la subunidad sin marca permaneció unida a la columna sólo cuando se encontraba la proteína marcada con histidinas. Así pues, la presencia de ambas proteínas tras la aplicación de un gradiente de imidazol en la mismas fracciones de elución se consideró como una interacción positiva. Estos resultados sugieren la formación de tres hetero-dímeros, los cuales coinciden con los pares de interacción observados por la inmunorréplica tipo Far-Western: Asa6-Asa8, Asa6-Asa9 y Asa8-Asa9. Adicionalmente, se realizaron ensayos de interacción *in vivo* a través del sistema del doble híbrido en levadura con la finalidad de confirmar las interacciones descritas al momento.

A



B



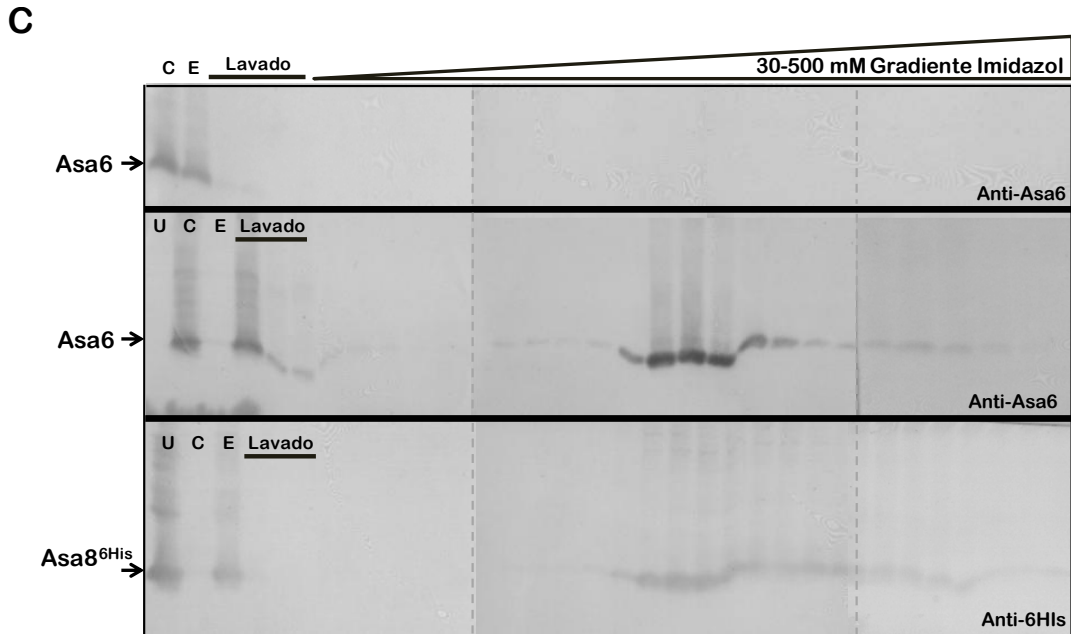


Figura 28. Asociación hetero-dimérica de las subunidades recombinantes Asa6, Asa8 y Asa9 mediante Copu-CAf. Interacción de las subunidades Asa6-Asa9_{6His} (Panel A), Asa8-Asa9_{6His} (Panel B) y Asa6-Asa8_{6His} (Panel C) ensayadas por Copu-CAf. En cada panel se muestran las inmunorrélicas tipo Western de las fracciones de elución del gradiente de imidazol cuando la proteína recombinante sin marca (Panel A: Asa6 | Panel B: Asa8 | Panel C: Asa6) se cargó sola a una columna (Sección superior) o cuando previamente a una columna se unió el polipéptido con etiqueta (Panel A y B: Asa9_{6His} | Panel C: Asa8_{6His}) (Sección intermedia e inferior). Los carriles señalados como U, C y E corresponden a: unida (Panel A y B: Asa9_{6His} | Panel C: Asa8_{6His}), cargada (Panel A y C: Asa6 | Panel B: Asa8) y proteína excluida de la columna (lavada), respectivamente. El lavado se realizó con 30 mM de imidazol. El gradiente de imidazol (30-500 mM) se representa con un triángulo. Los inmunoblots utilizados por panel se indican con líneas punteadas, así como el anticuerpo empleado en la esquina inferior derecha. Asa6: 13.1 kDa, Asa6_{6His}: 14 kDa, Asa8: 9.9 kDa, Asa8_{6His}: 10.8 kDa, Asa9: 11 kDa y Asa9_{6His}: 11.9 kDa.

Interacciones in vivo de las subunidades Asa del dominio membranal mediante el sistema del doble híbrido en levadura

El sistema del doble híbrido en levadura (Y2H) se basa en la naturaleza modular de los factores de transcripción eucariotas. Esta técnica permite la identificación rápida de pares putativos de interacción de proteínas, teniendo como ventaja respecto a los enfoques bioquímicos, tales como la co-inmunoprecipitación o la cromatografía de afinidad, que la selección de las parejas de interacción se realiza en un sistema *in vivo* (Stasi *et al.*, 2015).

De acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, se generó una mini-biblioteca con todos los posibles pares de interacción (Tabla V). Con esta finalidad se realizaron los ensayos de interacción de las subunidades: *a* (Atp6), *c* (Atp9), Asa6, Asa8 y Asa9 en medios mínimos acorde a las instrucciones del proveedor (Promega®).

Tabla V. Ejemplo de pares de interacción ensayados para Asa6 mediante Y2H.

Domino de activación (DA)	Dominio de unión (DU)
Asa6	Asa6
Asa6	Asa8
Asa6	Asa9
Asa6	<i>a</i> (Atp6)
Asa6	<i>c</i> (Atp9)
Asa6	Vacío
Asa8	Asa6
Asa9	Asa6
<i>a</i> (Atp6)	Asa6
<i>c</i> (Atp9)	Asa6
Vacío	Asa6

Del total de combinatorias exploradas por este método, tan solo se identificaron las interacciones Asa6-Asa6, Asa8-9 (Figura 29A y 29B, respectivamente), *a-c* (Atp9) y Asa6-*a* (Atp6) (Figura 9A y 9B del anexo III, pág. 128). En este sentido, todos los pares de interacción encontrados presentan un crecimiento significativo en comparación a los controles del ensayo empleados, a excepción de la pareja Asa8-Asa9 cuyo crecimiento celular es menos robusto. Mientras que el resto de interacciones observadas anteriormente (Asa6-Asa8, Asa6-Asa9 y Asa8-Asa8) se consideraron negativas, ya que todos los resultados obtenidos fueron similares a los controles del ensayo (datos no mostrados).

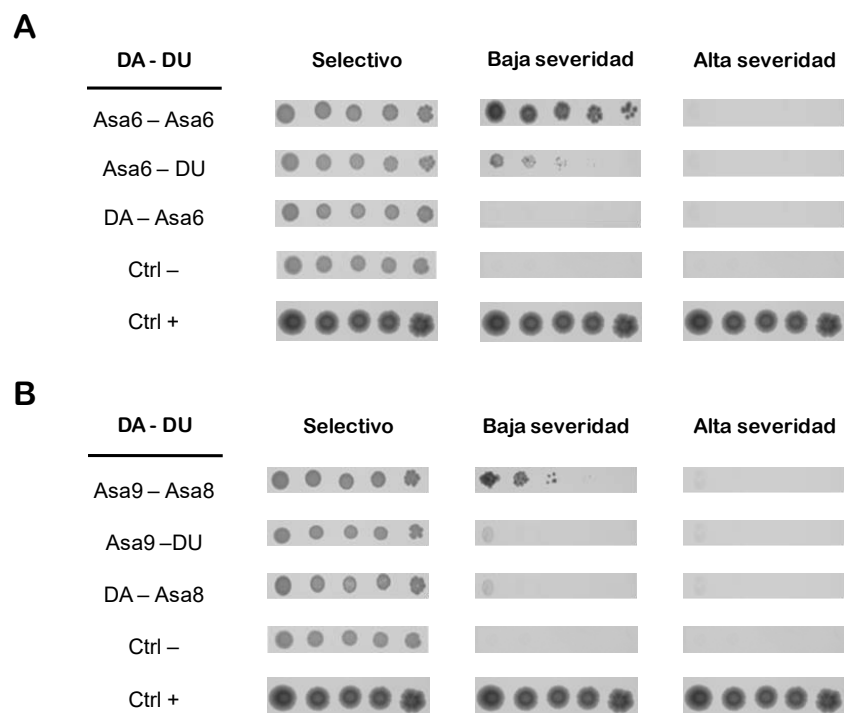


Figura 29. Interacción de las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 a través del Y2H. Interacción Asa6-Asa6 (Panel A) y Asa9-Asa8 (Panel B). Izquierda: En la columna se indica el inserto de interés contenido tanto en el DA, como en el DU. Derecha: En la parte superior se describe el medio de crecimiento utilizado: selectivo (-Leu/-Trp), baja severidad (-Leu/-Trp/-His) y alta severidad (-Leu/-Trp/-His/-Ade). Diluciones empleadas en el ensayo: 1:10 - 1:10,000. Como controles externos del ensayo se usaron las construcciones DA: proteína p53 | DU: antígeno T SV40 (Ctrl +); y DA: proteína p53 | DU: laminina C (Ctrl -).

Ensayos de entre-cruzamiento con la ATP sintasa de *Polytomella*

La topología de los complejos polipeptídicos puede abordarse empleando agentes entrecruzadores, éstos se han utilizado en el estudio de la estructura de la ATP sintasa de bovino (Joshi & Burrows, 1990), levadura (Velours & Arselin, 2000), en la elucidación del complejo bc₁ de bovino (González-Halphen *et al.*, 1988), así como en el estudio del mecanismo de inhibición de la IF₁ en el complejo nativo de bovino (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002).

Con respecto al complejo enzimático del alga, anteriormente se habían reportado varios productos de entrecruzamiento empleando un gran número de agentes entrecruzadores (Cano-Estrada *et al.*, 2010). A pesar de haber usado reactivos tanto homo-, como hetero- bifuncionales solubles en ambientes apolares, el único producto de interacción de las subunidades Asa hidrofóbicas fue el correspondiente a Asa6-Asa6. La determinación de la composición de los productos de entrecruzamiento obtenidos se realizó empleando agentes escindibles en condiciones reductoras a través de un sistema de geles en dos dimensiones (1D-glicina-SDS-PAGE al 7.0 % y 2D-tricina-SDS-PAGE al 12.0 %).

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se reportan los productos de entrecruzamiento de las subunidades Asa, tanto de aquellos polipéptidos altamente hidrofóbicos, como de las que se han descrito meramente solubles, utilizando reactivos homo-bifuncionales (polares y apolares) e identificándolos usando anticuerpos específicos para las subunidades Asa. Los resultados se resumen en la tabla VI, así como en las figuras 30 y 10 del anexo III, pág. 129.

Tabla VI. Productos de entrecruzamiento obtenidos.

Entrecruzador no-escindible		Entrecruzador escindible	
DSS	BS ³	DSP	DTSSP
Asa6-Asa8	Asa6-Asa8	Asa6-Asa8	Asa6-Asa8
Asa8-Asa1		Asa8-Asa1	
Asa8-Asa3	Asa8-Asa3	Asa8-Asa3	
Asa8-Asa5	Asa8-Asa5		
Asa8-Asa6	Asa8-Asa6	Asa8-Asa6	Asa8-Asa6
Asa8-Asa9	Asa8-Asa9	Asa8-Asa9	Asa8-Asa9
Asa9-Asa8	Asa9-Asa8	Asa9-Asa8	Asa9-Asa8

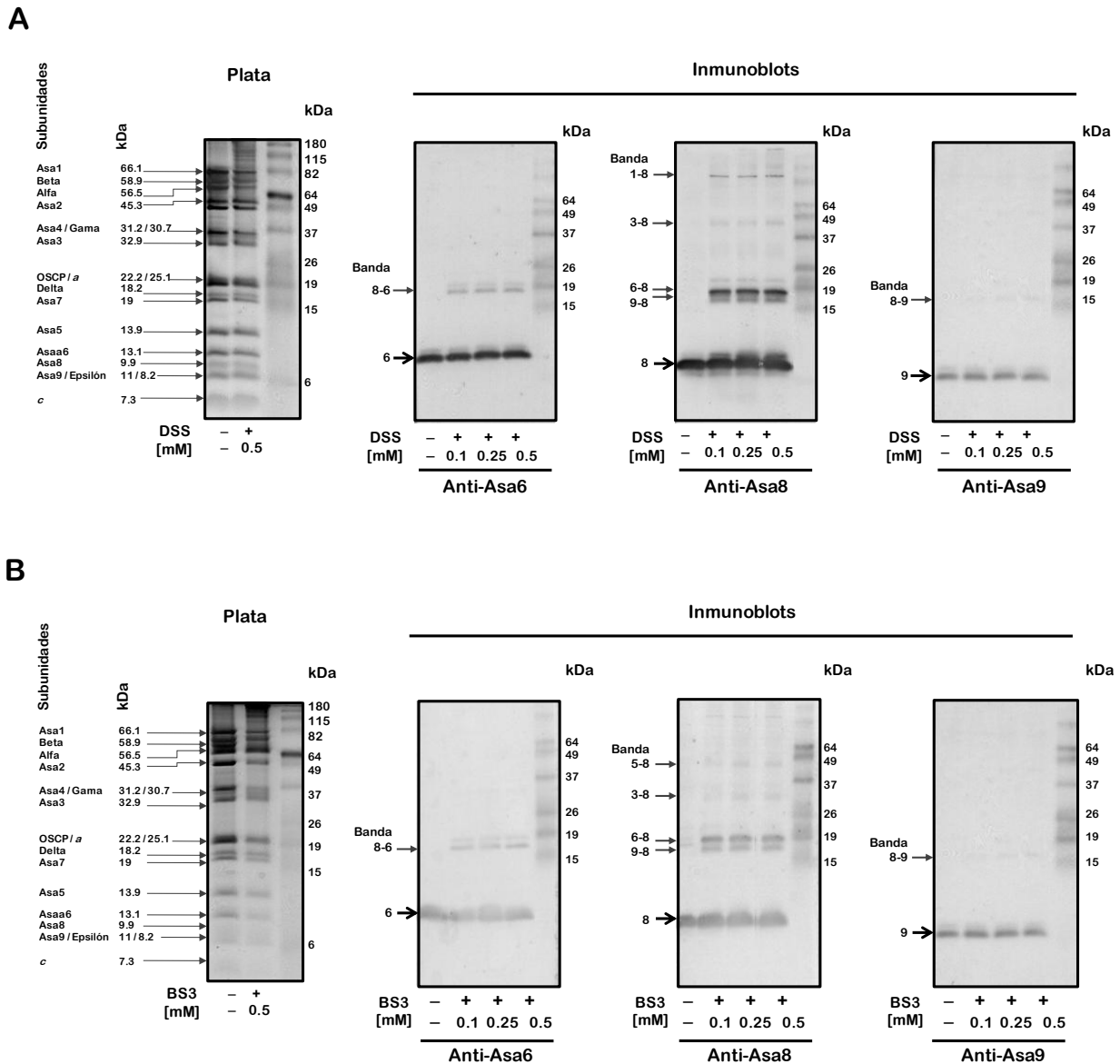


Figura 30. Productos de entrecruzamiento de la ATP sintasa de *Polytomella*. Los ensayos de entrecruzamiento se realizaron con agentes homo-bifuncionales no-escindibles. Izquierda: La tinción con plata muestra la composición polipeptídica de la enzima del alga (50 μ g de proteína por carril) incubada en ausencia (signo negativo) o presencia (signo positivo) de DSS (panel A) o BS3 (panel B), así como la masa molecular aparente. Derecha: Inmunorréplicas tipo Western de la ATP sintasa del alga (30 μ g de proteína por carril) incubada en ausencia (signo negativo) o presencia (signo positivo) de DSS (panel A) o BS3 (panel B) e inmunodecorada con los anticuerpos específicos indicados. Las concentraciones usadas en el ensayo se indican en la parte inferior. Los productos de entrecruzamiento se identificaron con el número de las subunidades Asa que los componen (Ej. Banda 8-6: Asa8-Asa6).

Se obtuvieron resultados similares utilizando los diferentes tipos de entrecruzadores (escindible: apolar y polar / no-escindible: apolar y polar). Las parejas de interacción Asa6-Asa8 y Asa8-Asa9 son acordes a lo observado tanto en la co-purificación por cromatografía de afinidad, como en la inmunorréplica tipo Far-Western empleando a las subunidades Asa recombinantes. De igual forma, mediante este ensayo empleando el complejo enzimático de alga, se observaron los pares vecinos Asa8-Asa1, Asa8-Asa3 y Asa8-Asa5 (Figura 30).

DISCUSIÓN

En las ATP sintasas canónicas, la región F_O está formada por las subunidades *a*, *b* y el anillo de *c* (Walker, 2013). Por ejemplo, la composición polipeptídica del dominio membranal del complejo enzimático de la bacteria *E. coli*, comprende a las subunidades *a*₁, *b*₂ y *c*₁₀ (con la estequiometría indicada en subíndices) (Foster & Fillingame, 1982). De manera similar, la ATPasa de las rodobacteráceas, como *P. denitrificans*, presenta las subunidades *a*, *b*, *b'* y *c*₁₂. En cambio, el sector membranal tanto de la enzima de levadura como la de los mamíferos están compuestas por las subunidades *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* y *g* (Wittig & Schägger, 2008). Por su parte, las subunidades *h*, *i* (también llamada *j*) y *k* son exclusivas de la primera (Arselin *et al.*, 1996; Paumard *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2015), mientras que las subunidades F₆, 8 o A6L, AGP o DAPIT, MLQ (Wittig & Schägger, 2008; Meyer *et al.*, 2007), Factor B y la proteína TMEM70 sólo se encuentran en la enzima de bovino (Jonckheere *et al.*, 2012).

En contraste, en las algas clorofíceas como *Polytomella* las subunidades Asa1 a Asa9 son los constituyentes principales del brazo periférico y del dominio de dimerización del complejo enzimático (Lapaille *et al.*, 2010). Estudios previos han revelado un subcomplejo formado por las subunidades *a*, *c*, Asa1, Asa3, Asa5 y Asa8; así como la interacción Asa1-Asa8 empleando subunidades recombinantes (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016; Colina-Tenorio *et al.*, 2016). Los resultados anteriores sugieren que algunos polipéptidos de la región extrínseca de membrana pudieran establecer contactos con las subunidades Asa del dominio membranal. El análisis de secuencia de Asa1 revela dos regiones putativas (N₃₀₈-L₃₂₆ y L₅₂₀-I₅₃₈) con la capacidad de interactuar con superficies hidrófobas probablemente a través de regiones anfipáticas (Anexo I, figura 4A, pág. 119). De igual modo, esta característica la presentan las regiones V₁₀₃-F₁₂₁, L₁₇₇-L₁₉₅ y T₂₆₀-I₂₇₈ de Asa3 (Anexo I, figura 4B, pág. 119), al igual que los extremos amino (V₁₇-M₃₅) y carboxilo (A₁₀₅-F₁₂₃) terminales de Asa5 (Anexo I, figura 4C, pág. 120).

El dominio membranal de la ATPasa de las algas clorofíceas está compuesto, además de la subunidad *a* y el anillo de *c*, por polipéptidos de pequeña masa molecular denominados Asa6, Asa8 y Asa9, sin embargo, se sabe poco sobre la disposición de estas proteínas en el dominio membranal de la enzima. Estas subunidades están bien representadas en las algas clorofíceas y sus secuencias muestran una alta similitud como lo revelan alineamientos múltiples de secuencia (Anexo I, págs. 115-118),

además se predice que estas subunidades están embebidas en la membrana de acuerdo a lo sugerido por análisis de hidrofobicidad y de segmentos transmembranales (STM). Los análisis *in silico* previamente descritos, al igual predicen una hélice re-entrante putativa en Asa6 que podría estar involucrada en la dimerización de la enzima. Por su parte, Asa8 posee un motivo G⁵⁹xxxG⁶³, tal como en el STM de las subunidades *e* y *g* de levadura, por lo que podría desempeñar un papel importante en la oligomerización del complejo enzimático (Arselin *et al.*, 2004; Everard-Gigot *et al.*, 2005).

El presente trabajo abordó una caracterización bioquímica más detallada de las subunidades hidrofóbicas que conforman el brazo periférico de la ATP sintasa de *Polytomella*, cuya naturaleza altamente hidrófoba había limitado su estudio en el pasado. Una de las principales dificultades para trabajar con proteínas altamente hidrofóbicas es encontrar condiciones que favorezcan el repliegado sobre la agregación (Banères, 2006), ya que la producción recombinante de estas proteínas con frecuencia resulta en la acumulación de productos de agregación llamados cuerpos de inclusión (CIs) (Vinothkumar *et al.*, 2013). El repliegamiento de CIs se realiza habitualmente por dilución o diálisis. Durante el proceso de dilución para ciertas proteínas, al alcanzar concentraciones intermedias de los agentes desnaturizantes empleados, se da lugar a la formación de productos intermedios de plegamiento, lo que puede conducir a la agregación (Rudolph & Lilie, 1996). En cambio, se ha reportado el repliegamiento de proteínas hidrofóbicas a partir de CIs (Nagy *et al.*, 2001, Valiyaveetil *et al.*, 2002, Harris *et al.*, 2014) eliminando el agente desnaturizante mediante diálisis en un amortiguador de repliegamiento.

En nuestro caso, la renaturalización por diálisis en amortiguador de repliegamiento (Anexo IV, pág. 151) nos permitió recuperar la proteína solubilizada con un porcentaje muy bajo de formas agregadas. Este problema se abordó realizando ensayos de solubilidad con los detergentes más comúnmente empleados (por ejemplo, digitonina, lauril sulfato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, Tween-20, así como Tritón X-100 y Tritón X-114), considerando además la concentración iónica recomendada para proteínas de membrana (Smith, 2017; Lin & Guidotti, 2009) y el valor de pH normalmente utilizado en nuestro protocolo de purificación de ATPasa. Desafortunadamente, no obtuvimos información sobre la estructura secundaria de estas subunidades. Asimismo, se dificultó el estudio del proceso de plegamiento debido al bajo número de residuos Trp (1 en Asa8 y 3 en Asa6/9, respectivamente).

Para comprender mejor las interacciones establecidas por estas subunidades del dominio membranal, se siguieron tres enfoques diferentes empleando proteínas recombinantes. La mayoría de las interacciones observadas se obtuvieron con el método de co-purificación, demostrando ser una técnica clásica pero robusta. Dado que, todos los amortiguadores usados contenían detergente en concentración suficiente, consideramos que estamos observando interacciones proteína-proteína reales, y no un fenómeno de agregación mediado por interacciones hidrofóbicas. Esta hipótesis es apoyada al no observar interacciones inespecíficas como Asa9-Asa9 (Anexo III, figura 8, pág. 127). En este sentido, a través de la inmunorréplica tipo Far-Western, empleando al complejo nativo del alga y las subunidades Asa recombinantes, se observaron algunas señales que corresponderían a interacciones inespecíficas en el caso de Asa6 y Asa9, mas no en Asa8 (Anexo III, figura 6, pág. 124). No obstante, los resultados obtenidos indican que algunas subunidades del brazo periférico de la región F₁, como Asa1, Asa3 o Asa5, podrían encontrarse en la cercanía del dominio membranal. En cambio, cuando solamente se emplearon los polipéptidos heterólogos, se determinó de manera clara la interacción Asa8-Asa9 (Figura 26A, pág. 64 y figura 7 del anexo III, pág. 126), mientras que el sistema del doble híbrido sugiere las interacciones Asa6-Asa6 y Asa8-Asa9 (Figura 29, pág. 71), además de la interacción de las subunidades *a-c* (Anexo III, figura 9A, pág 128).

Probablemente, las limitaciones de los dos últimos métodos son una consecuencia de la alta hidrofobicidad de las subunidades Asa, que tienden a ser insolubles y agregarse, afectando la detección de las interacciones *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos de interacción proteica sugieren que Asa6 y Asa8 son capaces independientemente de formar homodímeros (Figura 27, pág. 66), que existe una asociación Asa6-Asa9, y también un fuerte reconocimiento de Asa8-Asa9 (Figura 28, pág. 68). Las parejas de interacción Asa6-Asa6 y Asa6-Asa9, junto con los experimentos de entrecruzamiento llevados a cabo con las formas monomérica y dimerica del complejo nativo (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009; Cano-Estrada *et al.*, 2010) apoyan la idea de que estas subunidades pueden estar involucradas en la dimerización de la enzima del alga. Los ensayos de entrecruzamiento llevados a cabo sobre la ATP sintasa de *Polytomella* purificada confirmaron dos de las interacciones descritas en este trabajo: Asa6-Asa8 y Asa6-Asa9. Además, se encontró que Asa8 entrecruza con las proteínas Asa1, Asa3 y Asa5 del dominio extrínseco de membrana, tal como lo sugiere el análisis de hidrofobicidad de secuencia y la inmunorréplica tipo Far-Western. La asociación de estas subunidades no fue sorprendente, ya que se sabe que éstas forman el subcomplejo *a/c/Asa1/Asa3/Asa5/Asa8* (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006, Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009; Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016). Con respecto al homodímero de

Asa8, la baja identidad de secuencia (≤ 20.0 % de homología con respecto a otras subunidades de las ATP sintasas ortodoxas) no permite establecer inequívocamente los equivalentes de algas para las subunidades de levadura o de bovino, ni obtener modelos tridimensionales fiables (Figura 17).

Por otra lado, modelos estructurales obtenidos tanto por cristalografía de rayos X para la enzima de *P. denitrificans* (Morales-Ríos *et al.*, 2015), así como por crío-microscopía electrónica para las ATP sintasas de la bacteria *E. coli* (Sobti *et al.*, 2016), de la levadura *Y. lipolytica* (Hahn *et al.*, 2016), el hongo *Pichia angusta* (Vinothkumar *et al.*, 2016), el mamífero *Bos taurus* (Zhou *et al.*, 2015) y el alga clorofícea *Polytomella* sp. (Allegretti *et al.*, 2015) han proporcionado nuevos conocimientos sobre la función de este complejo enzimático. En suma, en estos modelos se puede observar claramente una arquitectura similar en la región que corresponde al dominio catalítico y al tallo rotor central. Por el contrario, las diferencias en la composición polipeptídica, como se ha descrito previamente, se encuentran en el brazo periférico y en las subunidades que componen el dominio membranal principalmente (Figura 31). Sin embargo, los mapas de densidad electrónica previos han revelado la disposición de las hélices horizontales de la subunidad *a*. Es importante resaltar que los cuatro segmentos helicoidales de la región C-terminal de dicha subunidad, se encuentran altamente conservados no solo en los organismos descritos anteriormente, sino también en las ATPasas más lejanas de tipo A y V (Zhao *et al.*, 2015; Kühlbrandt & Davies, 2016).

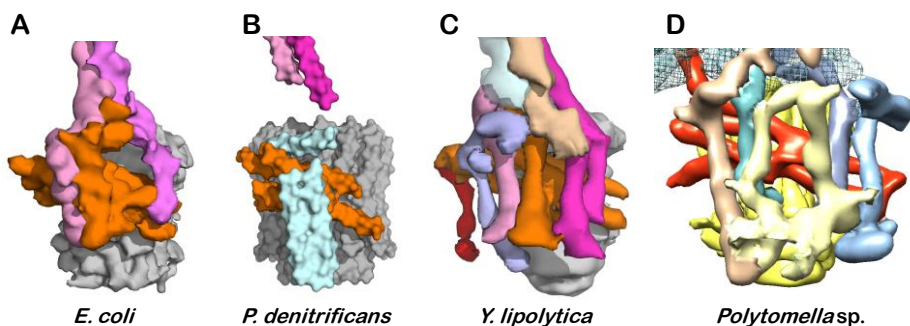


Figura 31. Arquitectura membranal de la ATP sintasa de distintos organismos. La imagen muestra la organización estructural de las subunidades membranales de: *E. coli* (A), *P. denitrificans* (B), *Y. lipolytica* (C) y *Polytomella* sp. (D). Corte vertical del dominio membranal de modelos obtenidos por imágenes de crío-EM de los organismos descritos anteriormente. En la parte superior de cada panel se encuentran las subunidades que corresponden al brazo periférico, mientras que el anillo de subunidades de *c* está representado en gris (Paneles A, B y C) y amarillo (Panel D), respectivamente. Por su parte, las hélices horizontales de la subunidad *a* en todos los organismos se muestran en naranja (delante del oligómero de subunidades *c*). Como se puede apreciar no es

posible definir con claridad el resto de subunidades que componen el dominio membranal (densidades electrónicas en distintos colores al frente de la imagen). Paneles A, B y C tomado de (Sobti *et al.*, 2016), y Panel D modificado de (Allegretti *et al.*, 2015; EMD-2852).

De esta manera, se ha puesto de manifiesto en diferentes organismos que la subunidad *a* exhibe un primer segmento transmembranal vertical (STM) y un grupo de cuatro hélices horizontales (H1-H4). En el mapa de crío-microscopía electrónica del alga solo se observan las cuatro secciones transversales de la subunidad *a* embebidas en la membrana, mas la región amino terminal es de resolución insuficiente para permitir una asignación concluyente del STM vertical. Recientemente, mediante un enfoque bioinformático se ha predicho la posición de la subunidad *a* con respecto al anillo de subunidades de *c* con mayor precisión (Leone & Faraldo-Gómez, 2016). El modelo propuesto es coherente con todos los productos de entrecruzamiento de las subunidades *a* y *c* obtenidos en *E. coli* (Jiang & Fillingame, 1998; Vik & Ishmukhametov, 2005). Sin embargo, un análisis del perfil de hidrofobicidad de la subunidad *a* de las secuencias de la bacteria y el alga sugiere que el STM vertical putativo no es lo suficientemente hidrofóbico para insertarse en esta región (Figura 18, pág. 50).

Lo anterior podría deberse a que la subunidad *a* de las algas clorofíceas es codificada en el núcleo (Funes *et al.*, 2002). A la fecha, esta subunidad es la única conocida cuyo único gen reside en el núcleo, por tanto exhibe una vía de biogénesis diferente a la de sus homólogos mitocondriales. Previamente, se ha reportado que la subunidad de las algas clorofíceas presenta una hidrofobicidad menor en varios de sus segmentos helicoidales, en especial en el STM vertical (Funes *et al.*, 2002). Esta hidrofobicidad disminuida debería permitir la translocación completa de este primer segmento durante la biogénesis de esta subunidad en algas. Esta hipótesis se fortalece aún más con los análisis de hidrofobicidad media de las subunidades *a* de diferentes organismos codificadas en el núcleo, en donde claramente muestran un carácter menos hidrofóbico en comparación a la región C-terminal (Figura 19, pág. 52). En este escenario, el primer STM putativo probablemente no está embebido en la membrana. Por lo tanto, proponemos que la subunidad *a* de las algas clorofíceas es única en el sentido que solamente exhibe cuatro alfa hélices horizontales (H2 a H4), de esta forma el segmento N-terminal podría interactuar con otras de las subunidades *Asa*, probablemente *Asa6*, como se observó por el sistema de doble híbrido (Anexo III, figura 9B, pág. 128).

Teniendo en cuenta los resultados antes mencionados, proponemos un modelo en el que, de acuerdo con múltiples observaciones de microscopía electrónica, el oligómero en forma de anillo de subunidades *c* se ubica a los extremos de cada monómero, el cual está interaccionando estrechamente con los cuatro segmentos horizontales de membrana de la subunidad *a*. Posiblemente, los otros seis segmentos transmembranales, que aparentemente se pueden observar en el corte horizontal a nivel de la membrana, podrían atribuirse de la siguiente manera: dos para la hélice reentrante de Asa6, una para un STM clásico de la misma subunidad; dos STM de un posible homodímero de Asa8 y un STM de Asa9 (Figura 32).

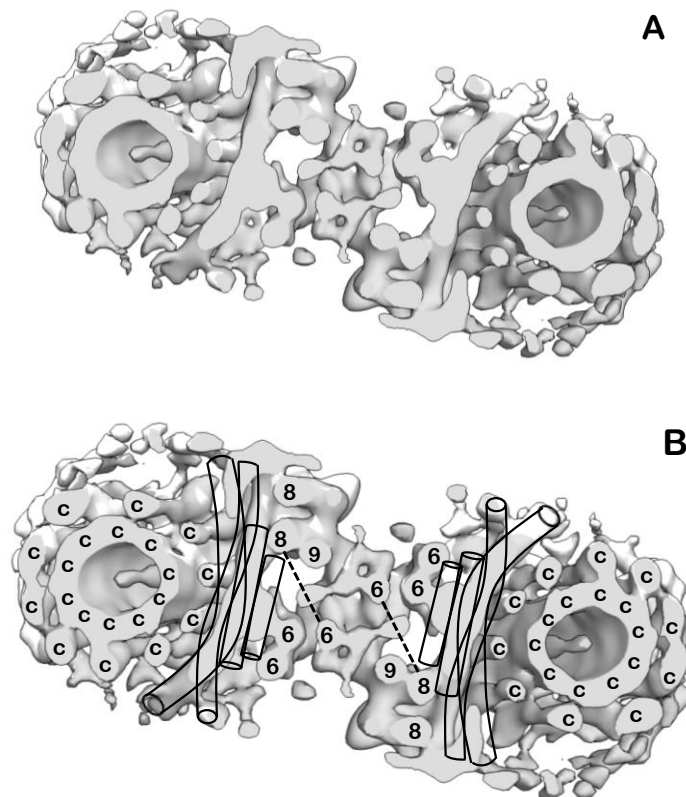


Figura 32. Modelo de la organización estructural de las subunidades del dominio membranar de la ATP sintasa de *Polytomella*. Panel A: Perspectiva desde la matriz mitocondrial de un corte de la sección transversal del dominio membranar del mapa de densidad electrónica obtenido por crío-EM para la enzima del alga (No. EMD: 2852) (Allegretti *et al.*, 2015). Panel B: Misma perspectiva que en el Panel A. Los segmentos transmembranales (STM) se representan como círculos y las hélices horizontales de la subunidad *a* como cilindros curvados. El nombre de cada subunidad está indicado con el número o la letra correspondiente. En el modelo Asa6 y Asa9 participan en la interfaz de dimerización de la enzima (dímero verdadero), mientras que Asa8 se representa como un homodímero involucrado en la interfaz de oligomerización (pseudo-dímero) del

complejo enzimático. Las líneas punteadas indican que las subunidades Asa6 y Asa8 podrían interactuar en un plano diferente de la perspectiva mostrada en la figura.

Sin embargo, no podemos excluir totalmente la posibilidad de que uno de los STM observados podría ser proporcionado por una hélice reentrante o una región hidrofóbica de las subunidades Asa1, Asa3 o Asa5 del brazo periférico que se insertarían parcialmente en la membrana. Ahora bien, si se intentará buscar análogos estructurales de las subunidades de algas en el modelo estructural de criomicroscopía de *Y. lipolytica* (Hahn *et al.*, 2016), Asa6 podría sustituir a la subunidad *f* de levadura, Asa8 dimérica podría reemplazar a las subunidades *e* y *g*, mientras que Asa9 relevaría a las subunidades Atp8 ó *i*. Además, nuestro modelo propone que la subunidad Asa6 es esencial para estabilizar la estructura dimérica del complejo enzimático, mientras que Asa8 podría desempeñar una función importante, similar a las subunidades *e* y *g* de la levadura, en la oligomerización de la enzima.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se caracterizaron las interacciones de las subunidades Asa hidrofóbicas que componen el brazo periférico de la F₁F₀-ATP sintasa de *Polytomella*. Empleando las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 recombinantes a través de diferentes estrategias de interacción proteína-proteína se observaron las interacciones: Asa6-Asa6, Asa6-Asa8, Asa6-Asa9, Asa8-Asa8 y Asa8-Asa9.

En conjunto con los productos de entrecruzamiento obtenidos con la enzima nativa del alga, se propuso un modelo de la organización del dominio membranal del complejo dimérico, en donde las subunidades Asa6 y Asa8 podrían desempeñar una función importante en la interfaz de dimerización y de oligomerización del complejo enzimático, respectivamente. Asimismo, el análisis de hidropatía del segmento amino terminal de la subunidad α sugiere que este segmento helicoidal podría estar dispuesto fuera de la membrana.

A pesar de que el modelo propuesto es acorde con los datos de crío-microscopía electrónica disponibles, estudios de alta resolución estructural son necesarios para describir con mayor detalle la organización de las subunidades intrínsecas de membrana de la ATPasa del alga.

PERSPECTIVAS

Confirmar las asociaciones Asa6-Asa6 y Asa8-Asa8, a través de otra metodología para el estudio de hélices membranales, como el sistema genético de interacción *in vivo* TOXCAT.

Realizar estudios de dicroísmo circular de los polipéptidos recombinantes para determinar el porcentaje de estructura secundaria para cada uno.

Determinar la interacción de las subunidades Asa3 y Asa5 con Asa6, Asa8 y Asa9.

Obtener imágenes de alta resolución estructural del dominio membranal del complejo enzimático del alga para definir con mayor precisión las interacciones de las subunidades Asa hidrofóbicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos (marca comercial), amortiguadores y soluciones empleadas en los métodos se encuentran descritos en el anexo IV (pág. 130).

Cultivo del alga incolora *Polytomella* sp.

Las algas del género *Polytomella* pueden crecer en mezclas de acetato de sodio con triptona y extracto de levadura, debido a que obtienen el nitrógeno de las sales de amonio y el carbono a partir del acetato u otros ácidos orgánicos, siempre que la tiamina esté presente en el medio. Sin embargo, en ausencia de acetato *Polytomella* sp. produce almidón y esta producción es independiente de la utilización de ácidos orgánicos (E.G. Pringsheim, 1955).

Considerando lo anterior, se cultivó *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80, colección de algas de la Universidad de Göttingen (<http://sagdb.uni-goettingen.de/>), en 2 L de medio Ember (Acetato de sodio, bactotriptona y extracto de levadura) adicionado con vitaminas (B₁ y B₁₂) en matraces de fondo ancho de 2.5 L por 48 h a 25 °C sin agitación (Colina-Tenorio *et al.*, 2016).

Obtención de las mitocondrias del alga

Se cosecharon las células de *Polytomella* centrifugando a 2,000 x g durante 5 min en el rotor JA-10 (Beckman). Posteriormente, se resuspendieron en amortiguador de sacarosa y centrifugaron a 2,000 x g por 5 min usando el mismo rotor. Nuevamente, se resuspendió la pastilla de células con el mismo amortiguador y a continuación ésta se transfirió a un homogeneizador de vidrio para romperlas mecánicamente con ayuda de un vástago de teflón. Se repitió este procedimiento 10 veces y el lisado celular se centrifugó por 10 min a 2,000 x g empleando el rotor anterior. Por segunda ocasión, esta pastilla se homogeneizó para romper a aquellas células que mantuvieron su integridad en el paso previo y se centrifugó a 2,000 x g. En un segundo paso, el sobrenadante se centrifugó durante 10 min a 17,000

x g usando un rotor JA-25.50 (Beckman). La pastilla resultante, la cual corresponde a la fracción mitocondrial, se resuspendió en 10 mL de amortiguador de sacarosa y almacenó a -70 °C hasta su uso.

Purificación de la ATP sintasa de *Polytomella* sp.

Se determinó la concentración de proteína (ver determinación de la concentración por el método de Markwell, página siguiente) de la fracción anterior y se diluyó con el amortiguador de solubilización a una concentración de 10 mg/mL. A continuación, las mitocondrias se solubilizaron añadiendo lauril maltósido (gota a gota) a una concentración final de 2 g por gramo de proteína y agitando por 30 min a 4 °C. El solubilizado se centrifugó por 30 min a 90,000 x g usando el rotor SW 60Ti (Beckman). Posteriormente, el sobrenadante se dializó (membrana SpectraPore con un punto de corte 12-14,000 Da) por 2 h en amortiguador de diálisis y se cargó a una columna de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose®) previamente equilibrada (amortiguador de equilibrio). Enseguida, el complejo V se eluyó con un gradiente de 0 a 125 mM de cloruro de sodio en el amortiguador de equilibrio determinando la absorbancia de las fracciones de purificación a 280 nm (Espectrofotómetro Shimadzu UV-160U). Se analizó la composición y pureza de las fracciones colectadas a través de geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 % (ver electroforesis en gel de poliacrilamida, página siguiente) y las fracciones correspondientes se concentraron con ayuda de un ultra filtro Amicon (Amicon Ultracel-15, Milipore). El concentrado se cargó a un tubo de polipropileno (14 x 89 mm) conteniendo un gradiente discontinuo del 15.0 al 50.0 % de glicerol en amortiguador de Lutter y se centrifugó a 40,000 x g durante 17 h a 4 °C usando el rotor SW 40Ti. Finalmente, con ayuda de una micropipeta se colectaron fracciones de 400 µL comenzando por la parte superior del tubo. Las fracciones del gradiente de glicerol se analizaron por geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 %, se concentraron (Amicon Ultracel-15) y se cuantificó su concentración final de proteína. Cuando se purificó la ATP sintasa de *Polytomella* para realizar los ensayos de entrecruzamiento, los pasos de purificación fueron los mismos excepto que el gradiente de glicerol se sustituyó el amortiguador de Lutter, que contiene Tris, por el de HEPES con la finalidad de evitar el apagamiento químico (quenching) de los agentes entrecruzantes.

Análisis de proteínas

Determinación de la concentración de proteína por el método de Markwell

El método utilizado es una modificación del método de Lowry, en el que las proteínas son detectadas a través de la formación de un complejo de cobre en medio alcalino y su posterior reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Dicha modificación consiste en la adición del tensoactivo dodecil sulfato de sodio (1.0 % v/v de SDS) en el reactivo alcalino y un aumento en la cantidad de tartrato de cobre (0.16 % p/v de tartrato). De esta forma, el método de Markwell permite determinar la concentración de proteína de muestras que contienen proteínas de membrana o lipoproteínas (Markwell *et al.*, 1978).

La muestra problema (10-75 μ L de muestra) y los estándares (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μ g) de albúmina sérica bovina (BSA) se aforaron a 1 mL con agua destilada. Posteriormente, a cada muestra se adicionó 1 mL de solución A, se mezcló por inversión e incubó a temperatura ambiente por 10 min. De igual forma, se agregó 0.5 mL de solución B, se mezcló por inversión e incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min (Ver solución A y B en anexo IV, pág. 135). En este paso, el tiempo de incubación puede ser hasta de 60 min. Posterior a este tiempo, hay cambios en la absorbancia final no relacionados con la concentración de proteína total de la muestra (Markwell *et al.*, 1978).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas se analizaron mediante electroforesis con geles de Tricina SDS-PAGE de acuerdo con (Schägger *et al.*, 1988) en el sistema MINI-PROTEAN® de Bio-Rad (geles de 84 x 73 x 15 mm). El gel concentrador se preparó al 4.0 % de acrilamida/bis-acrilamida, mientras que la concentración de acrilamida/bis-acrilamida del gel separador fue de 14.0 % para un gradiente continuo y del 12.5 % al 18.0 % de acrilamida/bis-acrilamida para un gradiente discontinuo (Schägger & von Jagow, 1987). Los geles se polimerizaron con APS y TEMED. A las muestras se añadió amortiguador de carga con una relación 1:6 (amortiguador:muestra). El proceso se realizó empleando los amortiguadores de

electroforesis correspondientes al cátodo y al ánodo. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente manteniendo un voltaje de 50 V durante el gel concentrador, y posteriormente a 100 V para el gel separador. Al finalizar, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Anexo II, pág. 137) o con plata (Anexo II, pág. 138) o se transfirieron para realizar inmunorrélicas tipo Western o tipo Far-Western como se describe posteriormente.

Inmunorréplica tipo Western

La inmuno detección se llevó a cabo en membranas de nitrocelulosa (BioRad) de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin *et al.* (1979). Esta técnica se basa en el reconocimiento específico de proteínas electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, gracias a la obtención de una señal producida por la actividad de una enzima acoplada a un complejo anticuerpo secundario-anticuerpo primario.

Para llevar a cabo la transferencia de proteínas se utilizó una cámara semi-seca de transferencia (Hoefer TE77XP, Amersham Biosciences). Se colocaron tres piezas de papel filtro (Whatman) humedecidas con amortiguador positivo sobre la superficie de la cámara de transferencia. A continuación y de igual forma, se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre el papel filtro. Posteriormente, se colocó la parte correspondiente del gel separador de poliacrilamida humedecida en amortiguador negativo más tres piezas de papel filtro con el mismo amortiguador. La corriente (miliamperios, mA) para llevar a cabo la transferencia se calculó multiplicando el largo (cm) de la membrana por el ancho (cm) de la misma, de tal manera que se mantuviera una corriente de 1.2 mA/cm^2 durante 2 h. Para verificar que las proteínas se transfirieron con éxito, al término del proceso se incubó la membrana en rojo de Ponceau por 5 min y se destiño incubando con agua destilada. Todos los pasos de incubación se realizaron con agitación constante a temperatura ambiente (rotador giratorio modelo G2, New Brunswick). En seguida, la membrana se bloqueó con 3.0 % de gelatina en TBS a temperatura ambiente toda la noche. Se lavó la membrana dos veces con TTBS por 10 min. Después, se añadió el primer anticuerpo (dilución óptima determinada) en una solución de gelatina al 1.0 % en TTBS por 3 h. Nuevamente, se lavó la membrana de la misma manera e incubó el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1:10,000) con una solución de gelatina al 1.0 % en TTBS por 1.5 h. De igual

forma, se lavó la membrana y se reveló empleando una solución de bicarbonato de sodio conteniendo los sustratos BCIP y NBT acorde con (Hawkes *et al.*, 1982). El tiempo para obtener una señal es variable y la reacción enzimática se detuvo con agua destilada.

La membrana puede utilizarse de nuevo para otra inmuno detección, para lo cual se incubó a 60 °C durante 30 min en solución de desnudamiento (solución para eliminación de reactivos), lavando dos veces con TTBS por 10 min. Enseguida, la membrana se bloquea con una solución de gelatina al 3.0 %, continuando de acuerdo al proceso anteriormente descrito.

*Ensayos de entrecruzamiento con el complejo enzimático nativo del alga *Polytomella**

El entrecruzamiento de proteínas implica la formación de un enlace covalente entre dos polipéptidos. Este proceso está mediado por la reacción de un entrecruzador con las cadenas laterales, tales como las aminos primarias y los grupos sulfhidrilos, de los aminoácidos. Los agentes entrecruzantes son reactivos bifuncionales que contienen grupos reactivos idénticos ó no (homo- ó hetero-bifuncionales, respectivamente) separados por un brazo espaciador. Los ésteres de N-hidroxisuccinimidil o amidatos amino-reactivos y homo-bifuncionales son los entrecruzadores más comúnmente empleados. Debido a que éstos son solubles tanto en disolventes acuosos como orgánicos, se han utilizado para determinar la disposición de subunidades dentro de complejos multiproteicos (Kapoor, 1996).

Los experimentos con agentes entrecruzantes se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor comercial (Pierce Chemical). Así, la ATP sintasa del alga (2.5 mg/mL) se incubó de manera independiente con concentraciones crecientes (0.1, 0.25 y 0.5 mM) de los reactivos homo-bifuncionales, no escindibles DSS y BS³, así como con concentraciones crecientes (0.25 y 0.5 mM) de sus análogos escindibles DSP y DTSSP, respectivamente. Cada ensayo de entrecruzamiento se realizó en un volumen final de 50 µL durante 60 min a 4 °C empleando el amortiguador de HEPES. Al finalizar, la reacción se detuvo al añadir Tris-HCl (pH 7.5) a una concentración final de 50 mM e incubando a temperatura ambiente por 15 min con agitación constante. Como control del ensayo se incubó a la enzima en ausencia de entrecruzadores bajo las mismas condiciones. Finalmente, los productos de entrecruzamiento se analizaron en geles de Tricina-SDS-PAGE al 14.0 % teñidos con plata

y se llevó a cabo la inmunorréplica tipo Western empleando los anticuerpos específicos para cada subunidad (Asa6, 8 y 9). La masa molecular (PM) de los productos de entrecruzamiento obtenidos se estimó al interpolar su valor de movilidad electroforética (Rf) en un gráfico del logaritmo de la masa molecular (PM_{\log}) de los polipéptidos del complejo enzimático de *Polytomella* contra su valor de Rf.

Obtención de las subunidades recombinantes

Clonación de los genes de las subunidades de la ATP sintasa de Polytomella sp.

La amplificación de los genes de interés se llevó a cabo mediante PCR (Termociclador Techne TC-512, Bibby Scientific Ltd.) a partir de una genoteca de ADNc utilizando el fago lambda (van Lis *et al.*, 2005), así como los cebadores específicos para las versiones maduras de las subunidades: *a* (984 pb, 25.1 kDa), *c* (384 pb, 8.2 kDa), Asa6 (375 pb, 13.1 kDa), Asa8 (270 pb, 9.9 kDa) y Asa9 (294 pb, 11 kDa) (Anexo II, pág. 123) acorde a las instrucciones del proveedor (New England Biolabs Inc.) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la amplificación de las subunidades.

Componente	Volumen	Concentración final
10 X Amortiguador de PCR	5 μ L	1 X
10 mM dNTPs	1 μ L	200 μ M
10 μ M cebador directo	1 μ L	0.2 μ M
10 μ M cebador reverso	1 μ L	0.2 μ M
Templado de ADN	1 μ L	1 ng-1 μ g
Polimerasa de ADN	0.5 μ L	1.25 unidades/50 μ L
H ₂ O (libre de nucleasas)	cbp 50 μ L	

Por otra parte, las condiciones óptimas de la reacción de amplificación se determinaron experimentalmente ensayando tanto diferentes temperaturas de alineamiento, como número y duración de los ciclos de amplificación (Cuadro 2). La temperatura de amplificación fue de 50 °C para las subunidades *a*, *c* y Asa6, mientras que para Asa8 y 9 fue de 55 °C.

Cuadro 2. Condiciones de reacción para la amplificación de las subunidades.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min
35 ciclos	94 °C	1 min
	50 °C / 55 °C	2 min
	72 °C	2 min
Extensión final	72 °C	10 min
Mantener	4 °C	Indefinido

Los productos de amplificación resultantes se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % en amortiguador TAE 1 X y teñidos con bromuro de etidio. La banda de interés correspondiente al número de pares de bases (marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) esperado se cortó con ayuda de un bisturí y se purificó mediante el sistema comercial de extracción en gel de Promega [Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System®] siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se clonaron los productos de PCR purificados en el vector pGEM T-Easy vector® de Invitrogen. Este vector comercial está diseñado para la ligación de amplicones debido a que posee extremos de timina en el centro del sitio de clonación múltiple. Por ello, se adicionaron nucleótidos de adenina (Qiagen Taq PCR kit) a los extremos del producto de PCR purificado (Cuadro 3), y a continuación se ligaron en el vector comercial siguiendo las instrucciones del proveedor (Cuadro 4). Una vez realizada la ligación, se transformaron en la cepa *E. coli* DH5α por choque térmico.

Cuadro 3. Mezcla para la reacción de poli-adenilación de los amplicones.

Componente	Volumen
10 X Amortiguador de PCR	5 μ L
Amortiguador Q	10 μ L
10 mM dNTPs	1 μ L
5 U/ μ L Taq polimerasa	0.5 μ L
Producto purificado de PCR	30 μ L
H ₂ O (libre de nucleasas)	cbp 50 μ L
72 °C por 30 min	

Cuadro 4. Reacción de ligación en el vector comercial.

Componente	Volumen
2 X Amortiguador de ligación	5 μ L
50 ng/ μ L vector pGEM	1 μ L
100 ng/ μ L ADN	variable
T4 ligasa de ADN	1 μ L
H ₂ O (libre de nucleasas)	cbp 20 μ L
4 °C toda la noche.	

Preparación de células competentes y transformación por choque térmico por el método de KCM

Las células competentes se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por (Sambrook & Russel, 2001) en condiciones de esterilidad. Brevemente, se inocularon 100 mL de medio 2xYT con 3 mL de pre-inóculo (cultivo de 12 h de crecimiento en medio LB con agitación a 250 rpm a 37 °C) hasta alcanzar una DO_{550nm} de 0.3-0.6 (2-3 h de crecimiento a 37 °C, 250 rpm). Después, las células se transfirieron a tubos de 50 mL estériles (Falcon®, Corning), se incubaron a 4 °C durante 10 min y se centrifugaron (rotor Sorvall F21-8x50y) a 2,500 x g por 10 min a 4 °C. La pastilla resultante se resuspendió suavemente con ayuda de una micropipeta en 1/20 de volumen (5 mL) de medio 2xYT-CC frío y se repitió el proceso. Al finalizar, se resuspendió la pastilla en 1/30 de volumen (3 mL) de medio 2xYT-CC frío, e inmediatamente se congelaron las células en alícuotas de 200 μ L con nitrógeno líquido y almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Para la transformación de *E. coli* se tomaron 50-100 μ L de células competentes (previamente descongeladas en frío), se mezclaron con un volumen igual de solución de KCM y 2-10 μ L de la

reacción de ligación. Esta mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se dio un choque térmico a 42 °C por 90 seg y se incubó en hielo por 2 min. Para detener la reacción de transformación, se adicionaron 500 µL de medio SOC e incubó durante 60 min a 37 °C con agitación constante. Finalmente, las células se sembraron en placas LB-agar (con el antibiótico correspondiente y adicionando X-gal e IPTG) e incubaron por 12-16 h a 37 °C. Las clonas de interés se preservaron en glicerol al 20.0 % a -70 °C.

Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

A partir de un cultivo de *E. coli* del paso anterior (3 mL de medio LB con 8-12 h de crecimiento a 37 °C con agitación a 250 rpm y antibiótico), se obtuvo una pastilla de células bacterianas centrifugando a 4,300 x g por 10 min (Centrífuga clínica, IEC). La pastilla resultante se resuspendió con vórtex en 200 µL de solución I y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL (microtubo). Al resuspendido celular se le agregó 1 µL de solución de RNasa y 200 µL de solución II. Se mezcló por inversión e incubó 5 min a 37 °C. Después, se adicionaron 200 µL de solución III y mezcló por inversión.

Este método aprovecha las diferencias en las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el ADN plasmídico (circularizado) y el cromosómico (fragmentado) (Birnboim & Doly, 1979). La alcalinización con NaOH en presencia de un tensoactivo aniónico fuerte (SDS) provoca la lisis celular, así como la desnaturalización del ADN cromosómico, de las proteínas y liberación del ADN plasmídico. Además, la neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato de potasio) provoca la precipitación de las proteínas, así como del ADN cromosómico.

Por lo anterior, los agregados insolubles de proteínas y ADN cromosómico se separaron centrifugando la muestra durante 15 min a 18,400 x g [Centrífuga(micro) 5424, Eppendorf] y el sobrenadante se transfirió con ayuda de una micropipeta a un microtubo nuevo, el cual contiene principalmente ADN plasmídico. El ADN precipitado se resuspendió con un volumen de isopropanol (600 µL) y centrifugó por 10 min a 18,400 x g. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70.0 %. El etanol restante se evaporó calentando la muestra a 65 °C por 15 min y se resuspendió el ADN en 30 µL de H₂O destilada.

Al finalizar el proceso, se comprobó la presencia del inserto de interés en el plásmido mediante una reacción de doble digestión (New England Biolabs) (Cuadro 5). Una vez realizado el diagnóstico, el ADN plasmídico se purificó mediante el sistema Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega).

Para obtener las construcciones de interés se realizó una reacción de doble restricción (Cuadro 5) tanto en el inserto como en el vector deseado. Se procedió con su purificación como se describe en "clonación de los genes de las subunidades". Adicionalmente, el vector es desfosforilado (Cuadro 6) y re-purificado mediante el sistema comercial de Promega. Concluido este proceso, la reacción de ligación se llevó a cabo con una relación inserto-vector de 3:1 y 6:1 (Cuadro 7).

Cuadro 5. Reacción de doble digestión con enzimas de restricción.

Componente	Volumen
5 unidades/μg ADN/enzima de restricción	Variable
1 μg ADN (mínimo)	Variable
10 X Amortiguador SDB	2 μL (1 X)
H ₂ O (libre de nucleasas)	cbp 20 μL
37 °C por 2.5 h	

Cuadro 6. Reacción de desfosforilación del vector de expresión.

Componente	Volumen
0.2-1 μg ADN	Variable
10 X Amortiguador SDB	3.5 μL
Fosfatasa alcalina	1 μL
H ₂ O (libre de nucleasas)	cbp 35 μL
1. Reacción de desfosforilación: 37 °C por 15 min	
2. Inactivación de la enzima de reacción: 65 °C por 20 min	

Cuadro 7. Reacción de ligación inserto-vector (relación 3:1).

Componente	Volumen
10 X Amortiguador de ligación + ATP	5 μ L
50 ng vector	variable
75 ng inserto	variable
T4 ligasa de ADN	1 μ L
H ₂ O (libre de nucleasas)	cbp 20 μ L
4 °C toda la noche	

Clonación en vectores de expresión y producción recombinante de las subunidades

Las subunidades *a* y *c* se clonaron en los vectores del sistema del doble híbrido en levadura, mientras que las subunidades Asa se clonaron independientemente en los vectores de expresión pET3a y pET28a. El vector pET28a añade una etiqueta de seis histidinas (6His) en el extremo amino de la proteína recombinante expresada (Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His}), mientras que el vector pET3a produce la versión sin marcar (Asa6, 8 y 9). Una vez realizada la ligación, se procedió como se ha descrito verificando la presencia del inserto y confirmando la identidad de su secuencia. Las construcciones obtenidas en los vectores de expresión se transformaron por choque térmico en la cepa *E. coli* C41 (DE3) y se realizaron ensayos de expresión de proteínas.

Para los ensayos de expresión de proteína, se inocularon 3 mL de medio LB (37 °C con agitación a 250 rpm más antibiótico) con las células de *E. coli* C41 (DE3), obtenidas anteriormente, hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.8-1.0. Las condiciones óptimas de expresión se determinaron probando tanto a distintas temperaturas (25, 30 y 37 °C) como diferentes concentraciones de IPTG (0.01, 0.1 y 1 mM) y tiempos de inducción (2, 4, 6, 8, 12 h y hasta 16 h para 25 °C). Se tomaron alícuotas de 300 μ L por cada tiempo de inducción en las condiciones de expresión descritas. La eficiencia de expresión se determinó analizando las muestras en geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 % y mediante inmunorreplica tipo Western. La condición óptima de expresión para las subunidades Asa6_{6His}, Asa8_{6His}, Asa8, Asa9_{6His} y Asa9 fueron 6 h de inducción a 37 °C, mientras que para Asa6 (sin etiqueta) fue de 6 h de inducción a 30 °C, empleando en todos los casos 0.1 mM de IPTG. Estas construcciones se guardaron en glicerol al 20.0 % a -70 °C hasta su uso.

Purificación de las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión

Se inoculó 1 L de cultivo LB con 3 mL de pre-inoculo (cultivo de 8-12 h de crecimiento en medio LB con agitación a 250 rpm a 37 °C más antibiótico) hasta obtener una DO_{600nm} de 0.8-1.0 y se expresó cada subunidad como se describió anteriormente. Al término de la inducción, el cultivo se centrifugó a 7,000 x g por 20 min (rotor Sorvall F10S-6x500y). La pastilla resultante (1.5-2.5 g de peso húmedo) se resuspendió con ayuda de un pincel en amortiguador de lisis (30 mL/L de cultivo). Las células bacterianas se rompieron mediante sonicación (sonicador Branson-250) con 4-6 intervalos de 30 seg cada uno a 60.0 % de poder, intercalando con 1 min de descanso en hielo. Las proteínas recombinantes se obtuvieron a partir de cuerpos de inclusión de acuerdo a los descrito por (Burgess, 2009) (Anexo IV, pág. 147). Los pasos siguientes se realizaron a 4 °C.

Los cuerpos de inclusión lavados se solubilizaron en amortiguador de PBS modificado (30 mL/L) con Tritón X-100 al 1.0 % y 8 M de urea durante 18 h con agitación suave (Vari-Mix Test Tube Rocker, Thermo Scientific). El material insoluble se removió centrifugando a 15,000 x g durante 20 min (rotor Sorvall F21-8x50y). El sobrenadante resultante se diluyó con amortiguador modificado de PBS a una concentración de 4 M de urea y se le añadió imidazol a una concentración final de 30 mM. Posteriormente, se equilibró una columna de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (5 mL HisTrapFF, GE Healthcare Life Sciences) con amortiguador A, se cargó la muestra hasta alcanzar 10 volúmenes de columna (VC) y se lavó con 3 VC empleando el mismo amortiguador con 30 mM de imidazol. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (ÄKTA FPLC, GE Healthcare Life Sciences), empleando un gradiente de 30-500 mM de imidazol (gradiente de amortiguador de A a B en 10 VC), con un flujo de 2 mL/min y colectando 2 mL por fracción. Las muestras obtenidas de la purificación se analizaron a través de geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 % e inmunorréplica tipo Western. Las fracciones enriquecidas con la proteína de interés se recolectaron, concentraron y almacenaron a -70 °C hasta su uso. Al finalizar el proceso de purificación, la cantidad promedio de proteína obtenida fue de 2.8 g/L de cultivo para las subunidades con etiqueta de histidina y de 1.6 g/L de cultivo para las versiones sin marca.

Generación de anticuerpos a partir de las subunidades recombinantes

Para la generación de anticuerpos, se cargó 1 mg de proteína por polipéptido (purificado con etiqueta de histidinas) en un gel de tricina SDS-PAGE al 14.0 % empleando el amortiguador de cátodo (superior) con azul de Serva G, mientras que el amortiguador del ánodo se usó sin cambios (Schägger *et al.*, 1988). Al término del proceso, las bandas correspondientes a las proteínas de interés se cortaron y con ayuda de un mortero de porcelana se obtuvo una suspensión homogénea en amortiguador de suspensión. Se prepararon alícuotas con 100 µg de proteína y almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Se tomó un volumen de la suspensión anterior equivalente a 200 µg de proteína y se aforó a 1 mL con adyuvante completo de Freud, se mezcló (Thermomixer, Eppendorf) a 1,400 rpm a 37 °C por 30 min y administró intramuscularmente a un conejo (primer inóculo). Se dieron tres refuerzos más empleando 100 µg de proteína y 800 µL de adyuvante incompleto de Freud con intervalos de tres semanas en cada administración (González-Halphen *et al.*, 1991).

Al finalizar el protocolo de inmunización, se obtuvo una muestra de la sangre del conejo por punción en la arteria de la oreja, se quitó el coágulo y centrifugó (rotor Sorvall F21-8x50y) a 11,800 x g por 30 min a 4 °C. Se prepararon alícuotas de 200 µL y almacenaron a -70 °C hasta su uso. La presencia del anticuerpo contra la subunidad recombinante en el suero fue corroborada mediante inmunorréplica tipo Western. Una vez verificado el reconocimiento del anticuerpo, se obtuvo la sangre del conejo por punción cardíaca y la muestra se procesó al igual que el suero obtenido por punción de la oreja. Se hicieron alícuotas de 200 µL y se almacenaron a -70 °C.

Ensayos de interacción proteína-proteína mediante la inmunorréplica tipo Far-Western

Esta técnica se basa en el proceso descrito por (Hall, 2004). Brevemente, se cargó en un gel de poliacrilamida al 14.0 % una nanomola de subunidad recombinante (purificada con etiqueta de histidinas) en cada carril y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa como se describió para las inmunorréplicas tipo Western. A continuación, los carriles del inmunoblot se cortaron de manera individual y se bloquearon con gelatina al 3.0 % en TBS. Después de 4 h de incubación a temperatura ambiente, los carriles se lavaron dos veces con TTBS por 10 min e incubaron 3 h de manera independiente con concentraciones crecientes del polipéptido de interés (0.5-5 nanomoles en 5 mL de gelatina al 1.0 % en TTBS). Nuevamente, se lavaron las membranas de la misma manera y se continuó el proceso como una inmunorréplica tipo Western. En el caso de haber interacción, se observó la aparición de bandas en las membranas de nitrocelulosa, cuya intensidad aumenta en relación a la concentración de la proteína prueba (Figura 33).

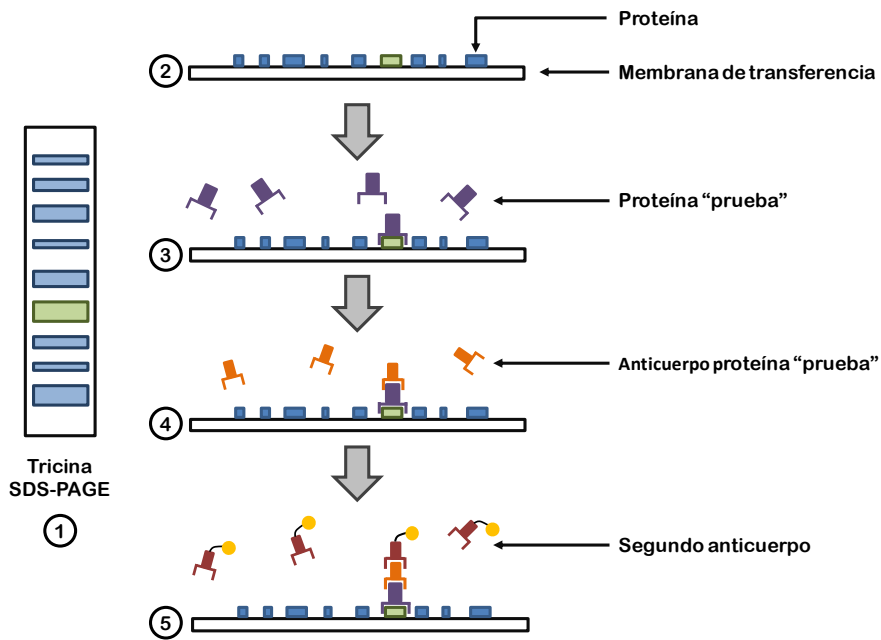


Figura 33. Inmunorréplica tipo Far-Western (F-WB). Esquema de la secuencia de pasos seguidos durante los ensayos de F-WB: 1-2) transferencia de un gel de tricina SDS-PAGE al 14.0 % a una membrana de nitrocelulosa, 3) incubación con la proteína prueba, 4) incubación con el anticuerpo primario (Anti-proteína prueba), y 5) incubación con el anticuerpo secundario y revelado de la membrana mediante el sistema de fosfatasa alcalina (círculo amarillo).

Ensayos de interacción proteína-proteína a través de la co-purificación por cromatografía de afinidad

Los ensayos de co-purificación (Figura 34) se llevaron a cabo a 4 °C a partir de los cuerpos de inclusión, con una pastilla de células correspondiente a 1 L de cultivo previamente lavada con detergente y solubilizados con urea, tanto de las proteínas marcadas con histidina (Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His}), así como de las versiones sin etiqueta (Asa6, 8 y 9). Cada una de las fracciones solubles se recuperó por centrifugación a 15,000 x g durante 20 min (rotor Sorvall F21-8x50y). Los sobrenadantes resultantes se dializaron (membrana SpectraPore con un punto de corte 12-14,000 Da) en 2 L de amortiguador de renaturalización por 36 h con dos cambios de amortiguador a las 8 y 12 h, respectivamente. Los dializados de proteína se centrifugaron a 15,000 x g por 20 min para eliminar el material insoluble. A la fracción soluble (sobrenadante) se le añadió imidazol a una concentración final de 30 mM. Cada muestra se cargó por separado (hasta alcanzar 10 VC) en una columna de Ni-NTA (HisTrapFF de 1 mL, GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada con amortiguador A, y se lavó con 3 VC empleando el mismo amortiguador con 30 mM de imidazol. De igual forma, se cargó y se lavó la fracción solubilizada conteniendo la proteína recombinante sin etiqueta a una columna de afinidad, en la cual se había unido previamente una subunidad marcada con histidina. A continuación, usando la misma columna se llevó a cabo la purificación mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (ÄKTA FPLC, GE Healthcare Life Sciences), empleando un gradiente de 30-500 mM de imidazol (gradiente de amortiguador de A a B en 10 VC), con un flujo de 0.5 mL/min y colectando 1 mL por fracción.

Las fracciones obtenidas de la co-purificación se analizaron mediante geles de Tricina SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los perfiles de elución de proteínas se analizaron mediante inmunorréplica tipo Western usando anticuerpos específicos. Con la finalidad de evaluar cualquier unión inespecífica posible, se cargaron por separado cada una de las muestras que contenían al polipéptido no marcado a una columna de afinidad, se analizaron las fracciones de elución en geles de poliacrilamida y cualquier interacción con la columna se descartó revelando con anticuerpos específicos. Cuando las subunidades sin marcar se encontraban en las mismas fracciones de elución que las proteínas con etiqueta de histidina se consideró como una interacción positiva.

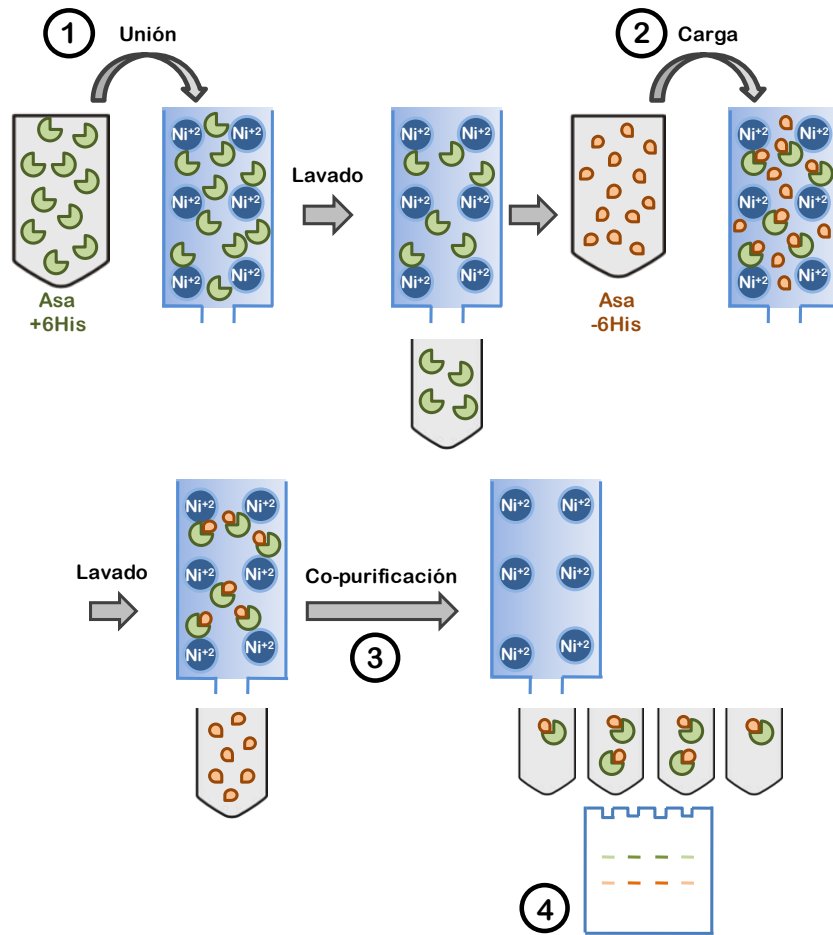


Figura 34. Co-purificación por cromatografía de afinidad (Copu-CAF). Representación de los pasos principales seguidos durante la Copu-CAF: 1) unión de la proteína de interés etiquetada con histidinas (Asa_{+6His}) a la columna de afinidad (Ni-NTA, Ni²⁺), 2) carga de la proteína "prueba" (Asa_{-6His}) a la misma columna, y 3) co-purificación mediante un gradiente de imidazol (30-500 mM). En cada uno de los pasos anteriores se realizó un lavado de la columna para eliminar el exceso de proteína y eluir uniones inespecíficas. 4) Por último, las fracciones obtenidas se analizaron mediante geles de tricina SDS-PAGE al 14.0 % e inmunorréplica tipo Western empleando anticuerpos específicos para las proteínas de interés. De manera independiente y paralela, solamente la proteína sin etiqueta se cargó a una columna de afinidad y se trató bajo las mismas condiciones (control del ensayo, no representado).

Ensayos de interacción proteína-proteína mediante el sistema del doble híbrido en levadura

El sistema del doble híbrido en levadura consiste en que un factor de transcripción eucarionte es separado en dominios individuales: *i*) un dominio de unión (DU) capaz de reconocer una secuencia específica de ADN; y *ii*) un dominio de activación (DA) responsable de promover la expresión de un gen reportero específico. Usando esta metodología se puede determinar la interacción de dos proteínas (X y Y), debido a que éstas se encuentran fusionadas a cada fragmento (DU-X, conocido como carnada; y DA-Y, también llamado presa), reconstituyendo de esta manera la actividad del factor transcripcional, y en consecuencia permitiendo la expresión de genes río abajo (Fields & Sternglanz, 1994) (Figura 35).

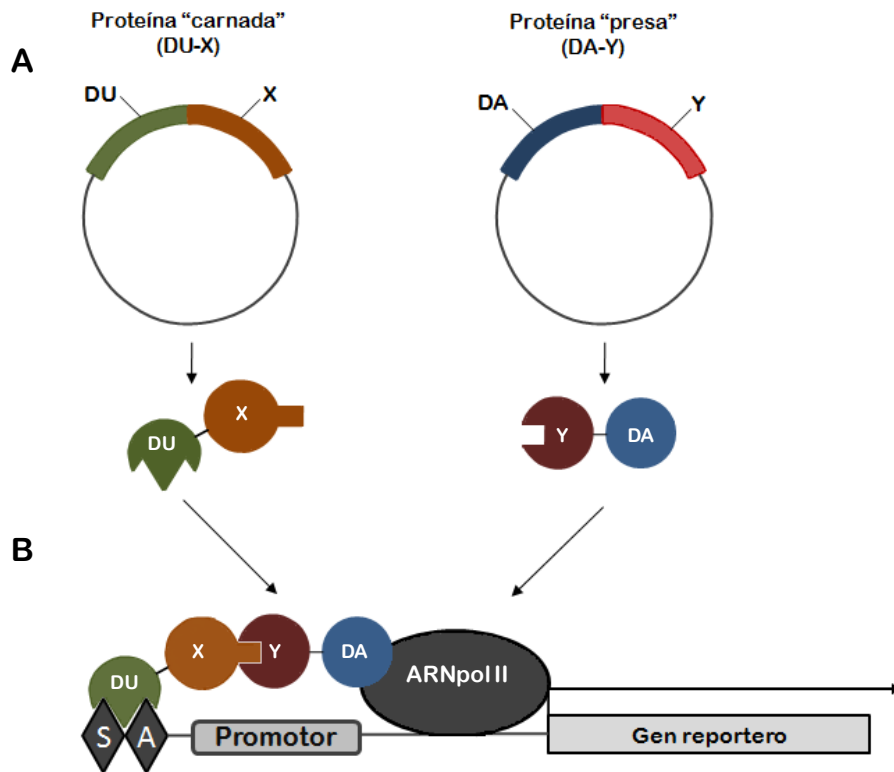


Figura 35. Sistema del doble híbrido en levadura (Y2H). Panel A. El gen de la proteína de interés X, llamada carnada, se fusiona con la secuencia del dominio de unión (DU) al ADN. Mientras que el gen de la proteína Y, conocida como presa, se fusiona con el dominio de activación (DA). Panel B. La construcción DU-X, se une a la secuencia activadora (SA) río arriba del promotor. Cuando la construcción DA-Y interacciona con la DU-X el factor transcripcional se reconstituye, llevando a cabo el reclutamiento de la ARN polimerasa II (ARN pol II) y la posterior transcripción de un gen reportero. Modificado de (Brückner *et al.*, 2009; Promega®).

Bajo este principio, los ensayos del doble híbrido se llevaron a cabo con el sistema comercial Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método comercial utiliza a la cepa de levadura AH109, debido a que cuenta con genes reporteros, cuya expresión se encuentra regulada por el activador transcripcional GAL4, que permiten tanto la selección por medios auxótrofos (*TRP1* y *LEU2*), así como una reducción en la incidencia de falsos positivos (*HIS3* y *ADE2*).

Por otra parte, las construcciones de interés se obtuvieron insertando de manera independiente los fragmentos que codifican para las versiones maduras de las subunidades *a*, *c*, Asa6, Asa8 y Asa9 (como se describió en Clonación de las subunidades recombinantes) en los vectores pGBKT7 (aminoácidos 1-147 del DU de GAL4) y pGADT7 (residuos 768-881 del DA de GAL4). Todas las posibles combinaciones de estas construcciones (DU-X & DA-Y) se utilizaron para co-transformar células de levadura por el método de acetato de litio (Gietz & Schiestl, 2007) y esta mini-biblioteca se utilizó para detectar posibles interacciones proteína-proteína *in vivo*. Adicionalmente, se ensayaron los controles positivo (DU-p53 y DA-SV-40) y negativo (DU-laminina C y DA-SV-40) suministrados por el fabricante comercial. En este sentido, se repitieron los ensayos de Y2H con las combinatorias DU-X y DA (vacío), así como DU (vacío) y DA-Y con la finalidad de descartar interacciones inespecíficas. La selección auxótrofa se realizó con el medio SD/-Trp/-Leu, mientras que las interacciones se determinaron en los medios de baja severidad (SD/-Leu/-Trp/-His) y de alta severidad (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) (Clontech Laboratories Inc.) realizando diluciones seriadas (diluciones de 1:10 a 1:10,000) con la finalidad de obtener colonias individuales. El crecimiento celular en al menos el medio de baja astringencia es evidencia de una interacción proteína-proteína.

Análisis bioinformático de las subunidades Asa de *Polytomella* sp.

Las secuencias utilizadas en el análisis múltiple de secuencias se obtuvieron de Taxoblast (https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/AlgoBLAST/algoBlast_mainpage.php) realizando una búsqueda tipo Blastp en la base de datos de Chlorophyceae (taxid: 3166) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para los análisis de estructura secundaria de las subunidades Asa6, 8 y 9 se utilizaron los programas: DPM (Deleage and Roux, 1987), DSC (King & Stenberg, 1996), GOR4 (Garnier *et al.*, 1996), HNN (Guermeur, 1997), JPred (Drozdetskiy *et al.*, 2015), PHD (Rost & Sander, 1993; Rost *et al.*, 1994), Predator (Frishman & Argos, 1996), Psipred (Buchan *et al.*, 2013), SIMPA96 (Levin *et al.*, 1986) y SOPMA (Geourjon & Deleage, 1995).

La predicción de cruces membranales y su orientación en la bicapa lipídica se llevó a cabo mediante los servidores: DAS (Cserző *et al.*, 1997), HMMTOP (Tusnády & Simon, 2001), OCTOPUS (Käll *et al.*, 2004), Phobius (Käll *et al.*, 2007), SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998), Split 4.0 server (Juretić D. *et al.*, 1999), TMPred (Hofmann & Stoffel, 1993), Topcons (Tsirigos *et al.*, 2015) y RHYTHM (Rose *et al.*, 2009). Adicionalmente, mediante el servidor PREDDIMER se realizó un análisis conformacional de segmentos putativos diméricos de membrana (Polyansky *et al.*, 2013).

Finalmente, se obtuvieron los modelos tridimensionales de Asa6, 8 y 9 empleando los servidores: I-TASSER (Yang *et al.*, 2015), Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), Raptor X (Källberg *et al.*, 2012), SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) y QUARK (Xu & Zhang, 2012). Los modelos Asa seleccionados se optimizaron con el software Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen *et al.*, 2015), empleando el campo de fuerza AMBERff14SB considerando los átomos de hidrógeno, así como las cargas de los aminoácidos mediante un proceso de 1000 pasos de minimización.

Adicionalmente, se analizaron las secuencias de las subunidades Asa1, 3 y 5 con la finalidad de definir las regiones putativas con hélices anfipáticas empleando el programa MPEx (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>), utilizando un coeficiente de partición agua-bicapa lipídica de acuerdo a la escala establecida por Wimley-White (Snider *et al.*, 2009). Asimismo, se realizó un análisis de dominios tipo coiled-coil con el servidor Marcoil (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil>) (Delorenzi & Speed, 2002).

Por otra parte, se realizó un estudio del amino terminal de la subunidad *a* de *Polytomella* para proponer su posible orientación espacial. Con el propósito anterior, se generó un modelo teórico optimizado de la subunidad *a* empleando el servidor Phyre2 y el programa Chimera como se detalló anteriormente. Posteriormente, mediante diagramas de hidropatía se comparó la subunidad *a* de *Polytomella* y *E. coli*, utilizando una ventana de 17 residuos y la escala de hidrofobicidad específica para proteínas de membrana interna mitocondrial (Botelho *et al.*, 2011).

Considerando lo anterior, la secuencia de la subunidad *a* se dividió en dos regiones: la secuencia que comprende al amino terminal y la segunda que corresponde a las cuatro hélices horizontales membranales. Estas dos regiones se analizaron por separado comparando la hidrofobicidad media contra la máxima hidrofobicidad promedio en una ventana de 17 residuos (Claros *et al.*, 2011), empleando la escala de hidrofobicidad deducida a partir de las posiciones de cada residuo en un segmento transmembranal (Botelho *et al.*, 2011). La longitud de los segmentos analizados (no. de aminoácidos, aa) fue de: 62 en *Bos taurus* (YP_209210.1), 89 en *Saccharomyces cerevisiae* (NP_009313.1), 85 en *Yarrowia lipolytica* (NP_075433.2), 91 en *Pichia angusta* (5LQX_Y), y 85 en *Paracoccus denitrificans* (5DN6_X).

Para las secuencias de algas y plantas, se consideraron los primeros: 190 aa de *Hordeum vulgare* (BAV58098.1), 78 aa de *Ulva prolifera* (YP_009183719.1), 128 aa de *Helianthus annuus* (YP_008999577.1), 210 aa de *Arabidopsis thaliana* (NP_085503.1), 239 aa de *Zea mays* 1 (CAA77868.1), 220 aa de *Zea mays* 2 (ACZ65558.1), 79 aa de *Chlorella sorokiniana* (YP_009049975.1), 125 aa de *Tetradismus obliquus* (AAF72060.1) y 115 aa de *Bracteacoccus aeriis* (YP_009054588.1).

En el caso de subunidades codificadas en el núcleo, es decir, aquellas que contienen secuencias de direccionamiento mitocondrial (MTS), se consideraron las secuencias de las proteínas maduras. El N-terminal de la subunidad *a* de *Polytomella parva* y *Chlamydomonas reinhardtii* se obtuvo previamente por degradación de Edman (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; van Lis *et al.*, 2003) y se estableció que estas subunidades contienen una MTS de 94 y 107 residuos, respectivamente. Por lo tanto, los segmentos analizados como amino terminal corresponden a los residuos: 95 a 142 de *Polytomella parva* (CBK55668.1), 108 a 155 de *Chlamydomonas reinhardtii* (AAN70986.1), 92 a 139 de *Gonium pectorale* (KXZ48726.1), 106 a 153 de *Volvox Carteri* (XP_002956659.1), 101 a 148 de *Haematococcus pluvialis* (número de acceso de NCBI GEO GSE71986), y 110 a 157 de *Dunaliella tertiolecta* (https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/AlgoBLAST/algoBlast_mainpage.php).

REFERENCIAS

1. Abrahams J.P., Leslie A.G., Lutter R., Walker J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370(6491):621-628. DOI: 10.1038/370621a0.
2. Allegretti M., Klusch N., Mills D.J., Vonck J., Kühlbrandt W., Davies K.M. (2015). Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*. 521(7551): 237-240. DOI: 10.1038/nature14185.
3. Aragaos H. de B. (1910). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 45-57.
4. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2):195-201. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti770.
5. Arselin G., Giraud M.F., Dautant A., Vaillier J., Brèthes D., Couлары-Salin B., Schaeffer J., Velours J. (2003). The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.* 270(8):1875-1884. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03557.x.
6. Arselin G., Vaillier J., Graves P.V., Velours J. (1996). ATP synthase of yeast mitochondria, isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J. Biol. Chem.* 271(34):20284–20290. DOI: 10.1074/jbc.271.34.20284.
7. Arselin G., Vaillier J., Salin B., Schaeffer J., Giraud M.F., Dautant A., Brèthes D., Velours J. (2004). The modulation in subunits *e* and *g* amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J. Biol. Chem.* 279(39):40392–40399. DOI: 10.1074/jbc.M404316200.
8. Banères J.L. (2006). Refolding of G-Protein-Coupled Receptors en R. Grishamer & S.K. Buchanan (Eds.), *Structural Biology of Membrane Proteins*, RCS Publishing, 887 p.p. 3-14. DOI: 10.1039/9781847552563.
9. Birnboim H.C. & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7(6):1513-1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
10. Botelho S.C., Osterberg M., Reichert A.S., Yamano K., Björkholm P., Endo T., von Heijne G., Kim H. (2011). TIM23-mediated insertion of transmembrane α -helices into the mitochondrial inner membrane, *EMBO J.* 30(6):1003-1011. DOI: 10.1038/emboj.2011.29.
11. Brückner A., Polge C., Lentze N., Auerbach D., Schlattner U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* 10(6):2763-2788. DOI: 10.3390/ijms10062763.
12. Buchan D.W., Minneci F., Nugent T.C., Bryson K., Jones D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic acids res.* 41(W1):W349-357. DOI: 10.1093/nar/gkt381.
13. Burgess R.R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.* 463:259-282. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63017-2.
14. Bustos D.M. & Velours J. (2005). The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit *g* destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 280(32):29004-29010. DOI: 10.1074/jbc.M502140200.
15. Cano-Estrada A. & González-Halphen D. (2011). F₁F₀-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB.* 30(3):98-108.

16. Cano-Estrada A., Vázquez-Acevedo M., Villavicencio-Queijeiro A., Figueroa-Martínez F., Miranda-Astudillo H., Cordeiro Y., Mignaco J.A., Foguel D., Cardol P., Lapaille M., Remacle C., Wilkens S., González-Halphen D. (2010). Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797(8):1439-1448. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.024.
17. Cardol P., González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C. (2005). The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol.* 137(2):447-59. DOI: 10.1104/pp.104.054148.
18. Carstens C.P., Bonnardel J., Allen R., Waesche A. (2001). BL21-CodonPlus™ Cells Correct Expression Problems Caused by Codon Bias. High-level expression of heterologous proteins in *E. coli*. *Stratagene Product Update.* (14):50-54.
19. Casali N. (2003). *Escherichia coli*: Host Strains, en Casali N. and Preston A. (Eds.), *E. coli Plasmid Vectors: Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, N.J. Vol. 235, pp. 27-48. DOI: 10.1385/1-59259-409-3:27.
20. Chaban Y., Boekema E.J., Dudkina N.V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim Biophys Acta.* 1837(4):418-426. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.10.004.
21. Chang J.W., Zhou Y.Q., Ul Qamar M.T., Chen L.L., Ding Y.D. (2016). Prediction of Protein-Protein Interactions by Evidence Combining Methods. *Int J Mol Sci.* 17(11): pii: E1946. DOI: 10.3390/ijms17111946.
22. Cingolani G. & Duncan T.M. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an auto inhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18(6):701-707. DOI: 10.1038/nsmb.2058.
23. Claggett S.B., Grabar T.B., Dunn S.D., Cain, B.D. (2007). Functional incorporation of chimeric b subunits into F₁F₀ ATP synthase. *J. Bacteriol.* 189(15):5463-5471. DOI: 10.1128/JB.00191-07.
24. Claros M.G., Perea J., Shu Y., Samatey F.A., Popot J.L., Jacq C. (1995). Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria: The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur. J. Biochem.* 228(3):762-771. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.0762m.x.
25. Colina-Tenorio L., Miranda-Astudillo H., Cano-Estrada A., Vázquez-Acevedo M., Cardol P., Remacle C., González-Halphen D. (2016). Subunit Asa1 spans all the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp. *Biochim Biophys. Acta.* 1857(4):359-369. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.11.012.
26. Cross R.L. & Taiz L. (1990). Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of F₀F₁ ATPases and synthases. *FEBS Lett.* 259(2):227-9.
27. Cross R.L. & Müller V. (2004). The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* 576(1-2):1-4. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.08.065.
28. Cserző M., Wallin E., Simon I., von Heijne G., Elofsson A. (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* 10(6):673-676. DOI: 10.1093/protein/10.6.673.
29. Deckers-Hebestreit G. & Altendorf K. (1992). The F₀ complex of the proton-translocating F-type ATPase of *Escherichia coli*. *J. Exp. Biol.* 172:451-459.

30. Deckers-Hebestreit G. & Altendorf K. (1996). The F_0F_1 -type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F_0 complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:791-824. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.791.
31. Deléage G. & Roux B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* 1(4):289-94.
32. Delorenzi M. & Speed T. (2002). An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* 18(4):617-625. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.4.617.
33. Dickson V.K., Silvester J.A., Fearnley I.M., Leslie A.G., Walker J.E. (2006). On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* 25:2911–2918. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601177.
34. Domínguez-Ramírez L. & Tuena de Gómez-Poyou M. (2003). Virtudes y pecados de una enzima: La F_0F_1 ATP sintasa. *Mensaje Bioquímico*, Depto. de Bioq., Fac. de Medicina, UNAM, 27:25-44.
35. Drozdetskiy A., Cole C., Procter J., Barton G.J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 43(W1):W389-W394. DOI: 10.1093/nar/gkv332.
36. Dudkina N.V., Heinemeyer J., Keegstra W., Boekema E.J., Braun H.P. (2005). Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* 579(25):5769-5772. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.09.065.
37. Dudkina N.V., Sunderhaus S., Braun H.P., Boekema E.J. (2006). Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultra structure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* 580(14):3427-3432. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.097.
38. Dudkina N.V., Kouril R., Bultema J.B., Boekema E.J. (2010). Imaging of organelles by electron microscopy reveals protein-protein interactions in mitochondria and chloroplasts. *FEBS Lett.* 584(12):2510-5. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.03.027.
39. Everard-Gigot V., Dunn C.D., Dolan B.M., Brunner S., Jensen R.E., Stuart R.A. (2005). Functional analysis of subunit *e* of the F_1F_0 -ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot Cell.* 4(2):346-355. DOI: 10.1128/EC.4.2.346-355.2005.
40. Fields S. & Sternglanz R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10(8):286-292. DOI: 10.1016/0168-9525(90)90012-U.
41. Figueroa-Martinez F., Nedelcu A.M., Smith D.R., Adrian R.P. (2015). When the lights go out: the evolutionary fate of free-living colorless green algae. *New Phytol.* 206(3):972-982. DOI: 10.1111/nph.13279.
42. Foster D.L. & Fillingame R.H. (1982). Stoichiometry of subunits in the H^+ -ATP synthase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 257:2009–2015.
43. Frishman D. & Argos P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* 9(2):133-42. DOI: 10.1093/protein/9.2.133.
44. Funes S., Davidson E., Claros M.G., van Lis R., Pérez-Martínez X., Vázquez-Acevedo M., King M.P., González-Halphen D. (2002). The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F_1F_0 -ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 277(8):6051-6058. DOI: 10.1074/jbc.M109993200.
45. García-Trejo J.J. & Morales-Ríos E. (2008). Regulation of the F_1F_0 -ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *J Biol Phys.* 34(1-2):197-212. DOI: 10.1007/s10867-008-9114-z.
46. García-Trejo J.J., Zarco-Zavala M., Mendoza-Hoffmann F., Hernández-Luna E., Ortega R., Mendoza-Hernández G. (2016). The Inhibitory Mechanism of the δ Subunit of the F_1F_0 -ATPase Nanomotor of

- Paracoccus denitrificans* and Related α -Proteobacteria. J Biol Chem. 291(2):538-546. DOI: 10.1074/jbc.M115.688143.
47. Garnier J., Gibrat J.F., Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol. 266:540-553. DOI: 10.1016/S0076-6879(96)66034-0.
 48. Geourjon C. & Deléage G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Comput Appl Biosci. 11(6):681-684. DOI: 10.1093/bioinformatics/11.6.681.
 49. Gietz R.D. & Schiestl R.H. (2007). Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat. Protoc. (2):35-37. DOI: 10.1038/nprot.2007.14.
 50. Godinot C. & Di Pietro A. (1986). Structure and function of the ATPase-ATP synthase complex of mitochondria as compared to chloroplasts and bacteria. Biochimie. 68(3):367-374.
 51. Gonzalez-Halphen D., Lindorfer M.A., Capaldi R.A. (1988). Subunit arrangement in Beef Heart Complex III. Biochemistry, (27):7021-7031. DOI: 10.1021/bi00418a053.
 52. González-Halphen D., Vázquez-Acevedo M., García-Ponce B. (1991). On the interaction of mitochondrial complex III with the Rieske iron-sulfur protein (subunit V). J. Biol. Chem. 266(6):3870-3876.
 53. Guermeur Y. (1997). Combinaison de classifieurs statistiques, application à la prédiction de la structure secondaire des protéines. Tesis Doctorado. Université de Paris VI.
 54. Habersetzer J., Ziani W., Larrieu I., Stines-Chaumeil C., Giraud M.F., Brèthes D., Dautant A., Paumard P. (2013). ATP synthase oligomerization: from the enzyme models to the mitochondrial morphology. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 45(1):99-105. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.05.017.
 55. Hahn A., Parey K., Bublitz M., Mills D.J., Zickermann V., Vonck J., Kühlbrandt W., Meier T. (2016). Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. Mol. Cell. 63(3):445-456. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.05.037
 56. Hall R.A. (2004). Studying protein–protein interactions via blot overlay or Far Western blot, en Fu H. (Ed.), Protein-protein interactions: Methods and applications, Humana Press, New Jersey, pp. 167–174. DOI: 10.1385/1-59259-762-9:167.
 57. Harris N.J., Findlay H.E., Simms J., Liu X., X. Booth X. (2014). Relative Domain Folding and Stability of a Membrane Transport Protein. J. Mol. Biol. 426:1812–1825.
 58. Hawkes R., Niday E., Gordon J. (1982). A dot-immuno binding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119(1):142-147. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90677-7.
 59. Heazlewood J.L., Whelan J., Millar A.H. (2003). The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are F_O components in the plant F₁F_O ATP synthase. FEBS Lett. 540(1-3):201-205. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00264-3.
 60. Herron M.D., Hackett J.D., Aylward F.O., Michod R.E. (2009). Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(9):3254-3258. DOI: 10.1073/pnas.0811205106.
 61. Hirokawa T., Boon-Chiang S., Mitaku S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics 14(4):378-379. DOI: 10.1093/bioinformatics/14.4.378.
 62. Hofmann K. & Stoffel W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 374(166):MF C-35.

63. Ishmukhametov R.R., DeLeon-Rangel J., Zhu S., Vik S.B. (2017). Analysis of an N-terminal deletion in subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 49(2):171-181. DOI: 10.1007/s10863-017-9694-z.
64. Itoh H., Takahashi A., Adachi K., Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K. (2004). Mechanically driven ATP synthase by F₁-ATPase. *Nature.* 427:465-468. DOI: 10.1038/nature02212.
65. Jiang W. & Fillingame R.H. (1998). Interacting helical faces of subunits *a* and *c* in the F₁F₀ ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(12):6607–6612. DOI:10.1073/pnas.95.12.6607.
66. Jiko C., Davies K.M., Shinzawa-Itoh K., Tani K., Maeda S., Mills D.J., Tsukihara T., Fujiyoshi Y., Kühlbrandt W., Gerle, C. (2015). Bovine F₁F₀ ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. *Elife.* 27(4):e06119. DOI: 10.7554/eLife.06119.
67. Jonckheere A.I., Smeitink J.A., Rodenburg R.J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35(2):211–225. DOI: 10.1007/s10545-011-9382-9.
68. Joshi S. & Burrows R. (1990). ATP Synthase Complex from Bovine Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.* (265):14516-14525.
69. Juretić D., Jerončić A., Zucić D. (1999). Sequence analysis of membrane proteins with the web server SPLIT. *Croatica Chemica Acta.* 72(4):975-997.
70. Kalanon M. & McFadden G.I. (2008). The chloroplast protein translocation complexes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a bioinformatic comparison of Toc and Tic components in plants, green algae and red algae. *Genetics.* 179(1):95-112. DOI: 10.1534/genetics.107.085704.
71. Käll L., Krogh A., Sonnhammer E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 338(5):1027-10236. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.03.016.
72. Käll L., Krogh A., Sonnhammer E.L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server *Nucleic Acids Res.* 35 (suppl_2): W429-432. DOI: 10.1093/nar/gkm256.
73. Källberg M., Wang H., Wang S., Peng J., Wang Z., Lu H., Xu J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* 7(8):1511-1522. DOI: 10.1038/nprot.2012.085.
74. Kapoor M. (1996). How to cross-link proteins. Cellular, Molecular and Microbial Biology Division, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4.
75. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 10(6):845-858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
76. King R.D. & Sternberg M.J. (1996). Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci.* 5(11):2298-2310. DOI: 10.1002/pro.5560051116.
77. Kühlbrandt W. & Davies, K.M. (2016). Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine. *Trends Biochem. Sci.* 41(1):106-116. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.006.
78. Kühlbrandt W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 13:89. DOI: 10.1186/s12915-015-0201-x.
79. Lapaille M., Escobar-Ramírez A., Degand H., Baurain D., Rodríguez-Salinas E., Coosemans N., Boutry M., Gonzalez-Halphen D., Remacle C., Cardol P. (2010). Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F₁F₀-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol Biol Evol.* 27(7):1630-1644. DOI: 10.1093/molbev/msq049.

80. Lee J., Ding S., Walpole T.B., Holding A.N., Montgomery M.G., Fearnley I.M., Walker J.E. (2015). Organization of Subunits in the Membrane Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking. *J. Biol. Chem.* 290(21):13308-13320. DOI: 10.1074/jbc.M115.645283.
81. Leone V. & Faraldo-Gómez J.D.(2016). Structure and mechanism of the ATP synthase membrane motor inferred from quantitative integrative modeling. *J. Gen. Physiol.* 148(6):441-457. DOI: 10.1085/jgp.201611679.
82. Levin J.M., Robson B., Garnier J. (1986). An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.* 205(2):303-308. DOI: 10.1016/0014-5793(86)80917-6.
83. Lewis E., Munger C., Watson R., Wise D. (1974). Life cycle of *Polytomella caeca* (Phytomonadida, Polyblepharidae). *The Journal of Protozoology.* 21(5):647-649.
84. Lewis L.A. & McCourt R.M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot.* 91(10):1535-1556. DOI: 10.3732/ajb.91.10.1535.
85. Leyva J.A., Bianchet M.A., Amzel L.M. (2003). Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F₁-ATPase. *Mol. Memb. Biol.* 20(1):27-33. DOI: 10.1080/0968768031000066532.
86. Lin S.H. & Guidotti G. (2009). Purification of membrane proteins in Burgess R. & Deutscher M., *Guide to Protein Purification: Methods in enzymology*, Academic Press. p.p. 619-629. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63035-4.
87. Liu S., Charlesworth T.J., Bason J.V., Montgomery M.G., Harbour M.E., Fearnley I.M., Walker J.E. (2015). The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species. *Biochem. J.* 468 (1):167–175. DOI: 10.1042/BJ20150197.
88. Markwell M.A.K., Hass S.M., Biber L.L., Tolbert N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87(1):206-210. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90586-9.
89. Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L.K., Maréchal-Drouard L., Marshall W.F., Qu L.H., ..., Grossman A.R. (2007). The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 318(5848):245-250. DOI: 10.1126/science.1143609.
90. Meyer B., Wittig I., Trifilieff E., Karas M., Schägger H. (2007). Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol. Cell. Proteomics.* 6(10):1690–1699. DOI: 10.1074/mcp.M700097-MCP200.
91. Minauro-Sanmiguel F., Bravo C., García J.J. (2002). Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34(6):433-43.
92. Minauro-Sanmiguel F., Wilkens S., García J.J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(35):12356-8. DOI: 10.1073/pnas.0503893102.
93. Miranda-Astudillo H., Cano-Estrada A., Vázquez-Acevedo M., Colina-Tenorio L., Downie-Velasco A., Cardol P., Remacle C., Domínguez-Ramírez L., 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. *Biochim Biophys Acta.* 1837(1):1-13. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.08.001.

94. Miroux B. & Walker J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol. Biol.* 260(3):289-298. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0399.
95. Morales-Ríos E., Montgomery M.G., Leslie A.G., Walker, J.E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(43):13231-13236. DOI: 10.1073/pnas.1517542112.
96. Morales-Rios E., Watt I.N., Zhang Q., Ding S., Fearnley I.M., Montgomery M.G., Wakelam M.J., Walker J.E. (2015). Purification, characterization and crystallization of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans*. *Open Biol.* 5(9):150119. DOI: 10.1098/rsob.150119.
97. Muench S.P., Trinick J., Harrison M.A. (2011). Structural divergence of the rotary ATPases. *Q Rev Biophys.* 44(3):311-356. DOI: 10.1017/S0033583510000338.
98. Nagy J.K., Lonzer W.L., Sanders C.R. (2001). Kinetic study of folding and misfolding of diacylglycerol kinase in model membranes. *Biochemistry.* 40: 8971–8980.
99. Nesci S., Trombetti F., Ventrella V., Pagliarani A. (2015). Opposite rotation directions in the synthesis and hydrolysis of ATP by the ATP synthase: hints from a subunit asymmetry. *J. Membr. Biol.* 248(2):163-169. DOI: 10.1007/s00232-014-9760-y.
100. Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K. (1997). Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature.* 386:299–302. DOI: 10.1038/386299a0.
101. Paumard P., Vaillier J., Coulyar B., Schaeffer J., Soubannier V., Mueller D.M., Brèthes D., di Rago J.P., Velours J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21(3):221–230. DOI: 10.1093/emboj/21.3.221.
102. Paumard P., Vaillier J., Napias C., Arselin G., Brèthes D., Graves P.V., Velours J. (2000). Environmental study of subunit *i*, a F(O) component of the yeast ATP synthase. *Biochemistry.* 39(14):4199–4205. DOI: 10.1021/bi992438l.
103. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13):1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
104. Polyansky A.A., Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2013). PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers. *Bioinformatics.* DOI: 10.1093/bioinformatics/btt645.
105. Pringsheim E.G. (1955). The genus *Polytomella*. *J. Protozool.* 2(4):137-145. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1955.tb02413.x.
106. Pullman M.E. & Monroy G.C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 238:3762-3769.
107. Rajesh S., Knowles T., Overduin M. (2011). Production of membrane proteins without cells or detergents. *N. Biotechnol.* 28(3):250-254. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.07.011.
108. Rao V.S., Srinivas K., Sujini G.N., Kumar G.N. (2014). Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics.* 2014:147648. DOI: 10.1155/2014/147648.
109. Rawson S., Harrison M.A., Muench S.P. (2016). Rotating with the brakes on and other unresolved features of the vacuolar ATPase. *Biochem Soc Trans.* 44(3):851-855. DOI: 10.1042/BST20160043.
110. Rees D.M., Leslie A.G., Walker, J.E. (2009). The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:21597–21601. DOI: 10.1073/pnas.0910365106.

111. Rose A., Lorenzen S., Goede A., Gruening B., Hildebrand P.W. (2009). RHYTHM—a server to predict the orientation of transmembrane helices in channels and membrane-coils. *Nucleic Acids Res.* 37(W1):W575–580. DOI: 10.1093/nar/gkp418.
112. Rost B. & Sander C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232(2):584-599. DOI: 10.1006/jmbi.1993.1413.
113. Rost B., Sander C., Schneider R. (1994). PHD—an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *CABIOS.* 10(1):53-60. DOI: 10.1093/bioinformatics/10.1.53.
114. Roy A., Hutcheon M.L., Duncan T.M., Cingolani G. (2012). Improved crystallization of *Escherichia coli* ATP synthase catalytic complex (F₁) by introducing a phosphomimetic mutation in subunit ϵ . *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68(Pt 10):1229–1233. DOI: 10.1107/s1744309112036718.
115. Rudolph R. & Lilie H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10(1):49-56.
116. Teese M.G. & Langosch D. (2015). Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry.* 54(33):5125-5135. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00495.
117. Sambrook J. & Russel D.W. (2001). The Hanahan Method for preparation and Transformation of Competent *E. coli*: High-efficiency Transformation, en Sambrook J. and Russel D.W. (Eds.), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2001), pp. 1.105-1.111. DOI: 10.1101/pdb.prot3942.
118. Schägger H. & von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166(2):368-379. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
119. Schägger H., Aquila H., Von Jagow G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem.* 173(1):201-205. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90179-0.
120. Shirakihara Y., Shiratori A., Tanikawa H., Nakasako M., Yoshida M., Suzuki T. (2015). Structure of a thermophilic F₁-ATPase inhibited by an ϵ -subunit: deeper insight into the ϵ -inhibition mechanism. *FEBS J.* 282(15):2895–2913. DOI: 10.1111/febs.13329.
121. Smith D.R. & Lee R.W. (2014). A plastid without a genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *Plant Physiol.* 164(4):1812-1819. DOI: 10.1104/pp.113.233718.
122. Smith S. M. (2017). Strategies for the purification of membrane proteins in Dermot Walls and Sinéad T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, Methods in Mol. Biol., Humana Press, New York. p.p. 389-400. DOI: 10.1007/978-1-4939-6412-3_21.
123. Snider C., Jayasinghe S., Hristova K., White S.H. (2009). MPEx: a tool for exploring membrane proteins. *Protein. Sci.* 18(12):2624-2628. DOI: 10.1002/pro.256.
124. Sobti M., Smits C., Wong A.S., Ishmukhametov R., Stock D., Sandin S., Stewart A.G. (2016). Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states. *Elife.* 5. pii: e21598. DOI: 10.7554/eLife.21598.
125. Soubannier V., Rusconi F., Vaillier J., Arselin G., Chaignepain S., Graves P.V., Schmitter J.M., Zhang J.L., Mueller D., Velours J. (1999). The second stalk of the yeast ATP synthase complex: identification of subunits showing cross-links with known positions of subunit 4 (subunit *b*). *Biochemistry.* 38(45):15017-15024. DOI: 10.1021/bi9916067.
126. Stasi M., De Luca M., Bucci C. (2015). Two-hybrid-based systems: powerful tools for investigation of membrane traffic machineries. *J Biotechnol.* 202:105-117. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.12.007.

127. Sternweis P.C. & Smith J.B. (1980). Characterization of the inhibitory (epsilon) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 5;19(3):526-531. DOI: 10.1021/bi00544a021.
128. Stewart A.G., Laming E.M., Sobti M., Stock D. (2014). Rotary ATPases--dynamic molecular machines. *Curr Opin Struct Biol*. 25:40-8. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.11.013.
129. Stewart A.G., Sobti M., Harvey R.P., Stock D. (2013). Rotary ATPases: models, machine elements and technical specifications. *Bioarchitecture*. 3(1):2-12. DOI: 10.4161/bioa.23301.
130. Stock D., Leslie A.G., Walker, J.E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*. 286:1700–1705. DOI: 10.1126/science.286.5445.1700.
131. Stocker A., Keis S., Vonck J., Cook G.M., Dimroth P. (2007). The structural basis for unidirectional rotation of thermo alkaliphilic F₁-ATPase. *Structure*. 15(8):904–914. DOI: 10.1016/j.str.2007.06.009.
132. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76(9):4350-4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4.
133. Tsigirgos K.D., Peters C., Shu N., Käll L., Elofsson A. (2015). The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res.* 43(W1):W401-407. DOI: 10.1093/nar/gkv485.
134. Tusnády G.E. & Simon I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server *Bioinformatics*. 17(9):849-850. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.9.849.
135. van Lis R., Atteia A., Mendoza-Hernández G., González-Halphen D. (2003). Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol*. 132(1):318-330. DOI: 10.1104/pp.102.018325.
136. van Lis R., González-Halphen D., Atteia A. (2005). Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta*. 1708(1):23-34. DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.12.010.
137. van Lis R., Mendoza-Hernández G, Groth G, Atteia A. (2007). New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*. 144(2):1190-1199. DOI: 10.1104/pp.106.094060.
138. Vázquez-Acevedo M., Cardol P., Cano-Estrada A., Lapaille M., Remacle C., González-Halphen D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg. Biomembr*. 38(5-6):271-282. DOI: 10.1007/s10863-006-9046-x.
139. Vázquez-Acevedo M., Vega-deLuna F., Sánchez-Vásquez 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. *Biochim. Biophys. Acta*. pii: S0005-2728(16)30022-30026. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.02.003.
140. Velours J. & Arselin G. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP Synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32(4):383-390.
141. Vidal, F. & Gittleson S.M. (1981). The genus *Polytomella*: a review of classification, morphology, life cycle, metabolism, and motility. *Archiv für Protistenkunde*. 124(1):1-28.
142. Vik S.B. & Ishmukhametov R.R. (2005). Structure and function of subunit a of the ATP synthase of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr*. 37(6):445–449. DOI: 10.1007/s10863-005-9488-6.

143. Villavicencio-Queijeiro A., Vázquez-Acevedo M., Cano-Estrada A., Zarco-Zavala M., Tuena de Gómez M., Mignaco J.A., Freire M.M., Scofano H.M., Foguel D., Cardol P., Remacle C., González-Halphen D. (2009). The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41(1):1-13. DOI: 10.1007/s10863-009-9203-0.
144. Vinothkumar K.R., Edwards P.C., Standfuss J. (2013). Practical Aspects in Expression and Purification of Membrane Proteins for Structural Analysis en Schmidt-Krey I. & Cheng Y. (Eds.), *Electron Crystallography of Soluble and Membrane Proteins: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, p.p. 17-30. DOI 10.1007/978-1-883 62703-176-9_2.
145. Vinothkumar K.R., Montgomery M.G., Liu S., Walker J.E. (2016). Structure of the mitochondrial ATP synthase from *Pichia angusta* determined by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (45):12709–12714. DOI: doi.org/10.1073/pnas.1615902113.
146. Walker J.E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.* 41(1):1–16. DOI: 10.1042/BST20110773.
147. Walsh B.W., Lenhart J.S., Schroeder J.W., Simmons L.A. (2012). Far western blotting as a rapid and efficient method for detecting interactions between DNA replication and DNA repair proteins. *Methods Mol Biol.* 922:161–168. DOI:10.1007/978-1-62703-032-8_11.
148. Wilchek M. & Miron, T. (1999). Thirty years of affinity chromatography. *Reactive and Functional Polymers.* 41(1): 263-268. DOI: 10.1016/S1381-5148(99)00042-5.
149. Wilkens S. (2013). Rotary Motor ATPases en Allewell N.M., *et al.* (Eds.), *Molecular Biophysics for the Life Sciences*. Springer Science+Business Media, New York, p.p. 313-339. DOI: 10.1007/978-1-4614-8548-3_10.
150. Wittig I. & Schägger H. (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1777(7-8):592–598. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.04.027.
151. Xu D. & Zhang Y. (2012). *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* (7):1715-1735. DOI: 10.1002/prot.24065.
152. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods.* 12(1):7-8. DOI: 10.1038/nmeth.3213.
153. Zarco-Zavala M., Morales-Ríos E., Mendoza-Hernández G., Ramírez-Silva L., Pérez-Hernández G., García-Trejo J.J. (2014). The δ subunit of the F1FO-ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB J.* 28(5):2146-2157. DOI: 10.1096/fj.13-241430.
154. Zhang X. & Studier F.W. (1997). Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *J. Mol. Biol.* 269(1):10-27. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1016.
155. Zhao J., Benlekbir S., Rubinstein J.L. (2015). Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature.* 521(7551):241–245. DOI: 10.1038/nature14365.
156. Zhou A., Rohou A., Schep D.G., Bason J.V., Montgomery M.G., Walker J.E., Grigorieff N., Rubinstein J.L. (2015). Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM. *elife* 4:e10180. DOI: 10.7554/eLife.10180.

Tabla I. Asa6: segmentos helicoidales y su topología membranar.

Servidor	STM ¹	Residuos	Topología ²	Observación ³
DAS	2	V ₈₀ -A ₁₀₁	ND	Hélice re-entrante: A ₄₈ -A ₆₅
HMMTOP	2	S ₄₀ -I ₅₉ L ₇₆ -F ₉₅	In→out out→in	Ninguna
Octopus	2	V ₈₀ -A ₁₀₁	In→out out→in	Hélice re-entrante: S ₄₅ -A ₆₃
Phobius	2	V ₈₀ -A ₁₀₁	Out→in	Hélice re-entrante: T ₄₆ -Y ₆₁
SOSUI	1	L ₇₆ -V ₉₈	Out→in	Ninguna
Split 4.0 server	2	L ₇₈ -M ₁₀₅	Out→in	Hélice re-entrante: A ₄₈ -R ₆₂
TMPred	2	T ₄₆ -G ₆₅ V ₈₀ -A ₁₀₁	In→out out→in	Ninguna
Topcons	1	N ₇₉ -A ₁₀₁	Out→in	Ninguna
RHYTHM	2	L ₇₆ -F ₉₅	In→out out→in	Hélice re-entrante: S ₄₀ -I ₅₉
Sec. cons. ⁴	2	L ₇₆ -F ₉₅	Out→in	Ninguna
Sec. cons. ⁴	2	V ₈₀ -A ₁₀₁	In→out out→in	Hélice re-entrante: S ₄₁ -A ₆₃

¹STM: Segmento TransMembranar; ²Orientación en la membrana mitocondrial interna, es decir, Out: espacio intermembranar, In: matriz mitocondrial; ³Hélice re-entrante (putativa) se refiere a un segmento helicoidal con un alto valor de hidrofobicidad, pero menor a un cruce membranar; ⁴Secuencia consenso deducida a partir del análisis topológico de STM. ND: no determinado.

```

          10          20          30          40          50          60          70
          |          |          |          |          |          |          |
Asa8      VLGEVYLKDILRTPPTGAIPANVPHPFQTSFYTYATKKLIPRHWYLLGGFTFTITLYGILDGLRDSGKKK
DPM        cccheehhhehccccccccccccccccccccccccceehhhhhhechhececececececececectttctccc
DSC        ccchhhhhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhccccchhecccccecececececechhhhhhhhhhh
GOR4       cccceeeccccccccccccccccccccccccchhhccccccccceeecccccececececcccccccchhh
HNN        ccchhhhhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhchceeececececeehhhhhhhchccchh
JPred      --HHHHHHHH-----HHHHHHHH--HHHHH--HHHHHHHHHHHHHHHH-----
PHD        cceeececcccccccccccceccccccccceehhhhhhhhhhhhhccccceeecechhhcccccccc
Predator   ccchhhhhhhccccccccccccccccccccccccceccccccccccccccccceeececcccccccchhh
PsiPred    CCCCHHHCHHCCCCC--CCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCCHHHHHEHHHHHHHHHHHHCC
SIMPA96    ccchhhhhccccccccccccccccccccccccceccccccccccccceeececeeeehhhhhhhhhccccchh
SOPMA      eeeeeehheccccccccccccccccccccceehhhcccttceeeettceeeeeehhhhhhhhttcchh
Sec. Cons. ccch??h??ccccccccccccccccccccceehh??cccc?eecececececechhh?hccccchh

```

```

|
Asa8      AYDEAIHAGKTPYTAGGH
DPM        hhhhhhhcccccccccc
DSC        hhhhhhhcccccccccc
GOR4       hhhhhhhccccceeeec
HNN        hhhhhhhcccccccccc
JPred      HHHHHHH-----
PHD        hhhhhhhcccccccccc
Predator   hhhhhhhcccccccccc
PsiPred    CHHHHHHHCCCCCCCC
SIMP96     hhhhhhhcccccecccc
SOPMA      hhhhhhtccccccetcc
Sec. Cons. hhhhhhcccccccccc

```

Figura 2. Resultados de predicción de estructura secundaria para Asa8. Los servidores empleados se describen en materiales y métodos. Simbología: *Hh* alfa hélice, *Ee* hoja beta, *Cc* espiral aleatoria, y ? estado conformacional ambiguo. En negrita se resalta tanto la secuencia primaria de aminoácidos de Asa8 (parte superior), así como su secuencia consenso (parte inferior) deducida a partir del análisis *in silico*.

Tabla II. Asa8: segmentos helicoidales y su topología membranar.

Servidor	STM ¹	Residuos	Topología ²
DAS	1	L ₄₆ -L ₆₀	ND
HMMTOP	1	L ₄₆ -L ₆₃	Out→in
Octopus	1	I ₄₀ -D ₆₁	In→out
Phobius	1	H ₄₃ -L ₆₀	Out→in
SOSUI	1	P ₄₁ -L ₆₃	In→out
Split 4.0 server	1	L ₄₆ -L ₆₀	Out→in
TMPred	1	L ₄₆ -L ₆₃	*In→out out→in
Topcons	1	H ₄₃ -L ₆₃	Out→in
RHYTHM	1	L ₄₆ -L ₆₃	Out→in
Sec. cons. ³	1	L ₄₆ -L ₆₃	*Out→in In→out

¹STM: Segmento TransMembranar; ²Orientación en la membrana mitocondrial interna, es decir, Out: espacio intermembranar, In: matriz mitocondrial; ³Secuencia consenso deducida a partir del análisis topológico de STM. ND: no determinado. *Ambas orientaciones en la membrana son posibles.

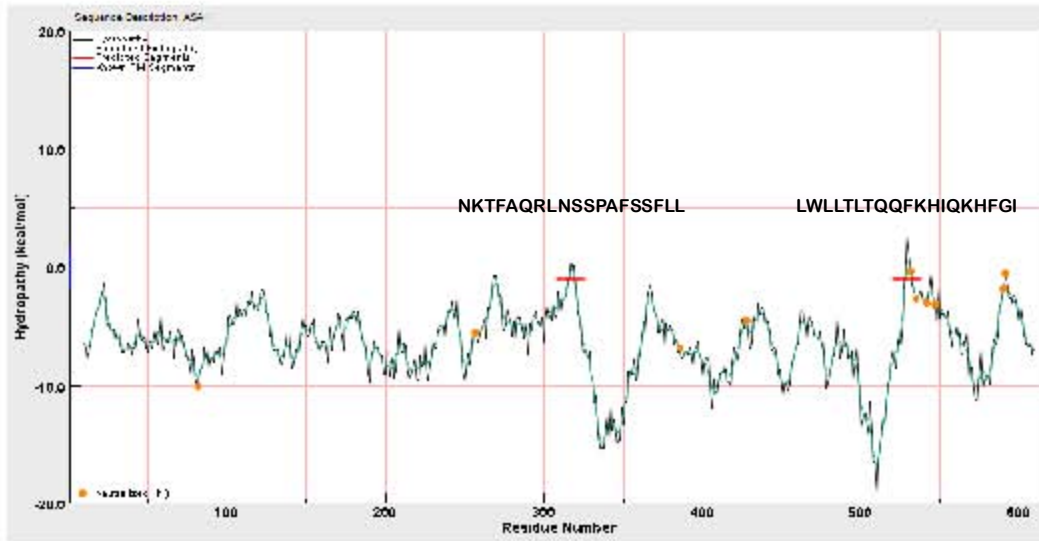
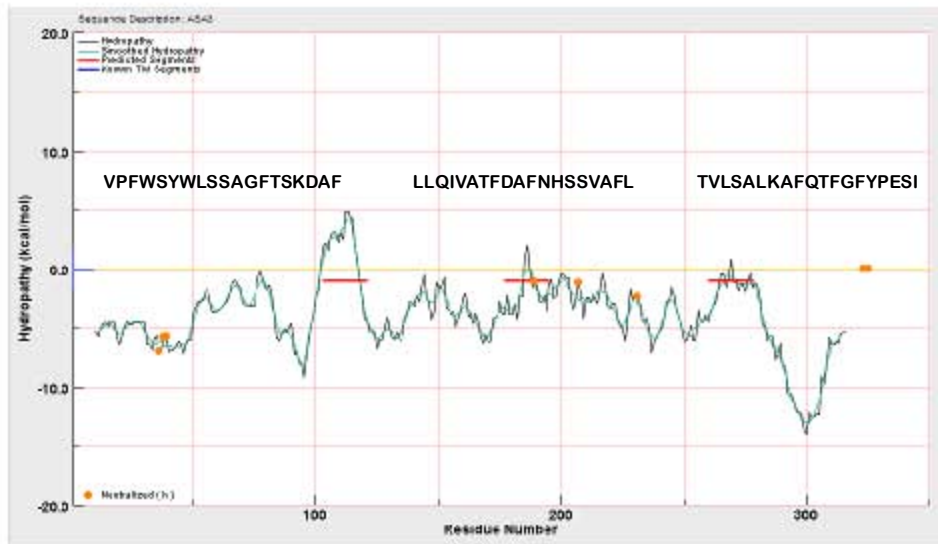


Figura 3. Resultados de predicción de estructura secundaria para Asa9. Los servidores empleados se describen en materiales y métodos. Simbología: *Hh* alfa hélice, *Ee* hoja beta, *Cc* espiral aleatoria, y *?* estado conformacional ambiguo. En negrita se resalta tanto la secuencia primaria de aminoácidos de Asa9 (parte superior), así como su secuencia consenso (parte inferior) deducida a partir del análisis *in silico*.

Tabla III. Asa9: segmentos helicoidales y su topología membranal.

Servidor	STM¹	Residuos	Topología²
DAS	1	R ₃₉ -A ₅₄	ND
HMMTOP	1	V ₄₁ -F ₅₈	In→out
Octopus	1	Q ₃₄ -N ₅₅	In→out
Phobius	1	V ₃₆ -F ₅₈	In→out
SOSUI	1	V ₃₆ -F ₅₈	In→out
Split 4.0 server	1	H ₄₁ -P ₆₀	In→out
TMPred	1	F ₄₃ -P ₆₀	In→out
Topcons	1	V ₃₆ -P ₅₇	In→out
RHYTHM	1	V ₄₁ -F ₅₈	In→out
Sec. cons. ³	1	V _{36/41} -F ₅₈ P ₆₀	In→out

¹STM: Segmento TransMembranal; ²Orientación en la membrana mitocondrial interna, es decir, Out: espacio intermembranal, In: matriz mitocondrial; ³Secuencia consenso deducida a partir del análisis topológico de STM. ND: no determinado.

A**B**

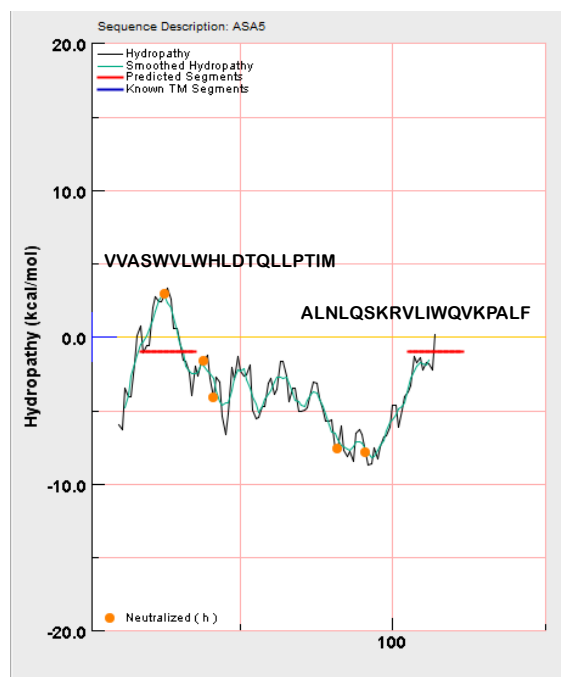
C

Figura 4. Análisis de las secuencias Asa1, Asa3 y Asa5. En la parte superior de cada panel se representa el gráfico de análisis de hidropatía de Asa1 (Panel A), Asa3 (Panel B) y Asa5 (Panel C). Cada panel muestra la hidropatía (línea más oscura) y la hidropatía suavizada (línea más clara) obtenida para cada secuencia, así como los residuos de histidina neutralizados (indicados con un punto). Se indican las regiones anfipáticas predichas (resaltadas con una barra de color) y la secuencia de aminoácidos correspondiente. Los datos de análisis de la hidropatía indican las siguientes regiones anfipáticas putativas: los residuos 308-326 y 520-538 para Asa1 (Panel A); aminoácidos 103-121, 177-195 y 260-278 para Asa 3 (Panel B); y los extremos amino (residuos 17-35) y carboxilo (residuos 105-123 residuos) de Asa5.

Subunidad Asa6

Secuencia de direccionamiento mit. 31

```

Ps_Asa6      MM-LRTLTRSSAVA-G---QAVRLFK TSA--AAA-EGNSVACIIKSVNETSGANLL-SSLKTKAQA
G_pectorale MAMRLALTRSRELL-A---PGARYLRTSVANASS-EGSSVAAMVKAVNESSGSSLL-ASLKEAKAKM
V_carteri    MAMRLALTRSRELL-A---PGVRYLRTSVANASA-EGNSVAAMVKAVNETSGSSLL-ASLKDAKAKL
C_leiostraca ML-ROVAQRGSLV-A---SLATQGARNACTSAT-EGSSITTLISAVKASNSSTFAAGGLSALKSTI
C_spxx3      ML-RQLAGRSQELS-RLAIASVAGSSRSASAAA-EGSSISITLISAVKASNPAYSSGGLAALKASM
C_euryale    ML-RAASS-GRQLRL--AGAAAGTRGVASSAASEGSSVASLIKAVNESSAKSF-ASGGLNSIKAAA
C_reinhardtii MM-RLAAQRSRGLL-A---PGARFLRTSA--ASA-EESVANLVKSVSETSGANLL-ASLKAEQAKL
  
```

96

```

Ps_Asa6      APITYPAAAS-STGYSTQAKIALFGALS--WILYRADCGOSKAHEWIVDLNVLNVLQAAWLISFSSSLIPFR
G_pectorale  QPYYPEPTP-SAAWSLQARLAVLGVIS--WTLYRLDTQARAHEWIVDLSLDVLAQAWYVVSFTSLIPFR
V_carteri    QPYYPEPAT-SSTWSLQARLALGALS--WTLYRLDTQARAHEWIVDLSLDVLAQAWYVVSFTSLIPFR
C_leiostraca QPAYPAC-K-KTGFSTQYKLLLGAAG--WFLYRADTQARSHDWIVDLSLDVLAQAWLISYASFLPFR
C_spxx3      TPSYAAPAGVSPGMSLNLKLVLCVAVGG--WVLYRVDQARSKDWIVDLSLNFQAAWWISYASFLPFR
C_euryale    QPYFPAAAK-DTGLSLNAQIALGAGAVYFWHRYTV--HASSPDWIVDLSLDVLAQAWWISFTSLPFR
C_reinhardtii KPFIYPEPAA-AAGWSLQARVAVLGLIS--WTLYRLDTQARAHEWIVDLSLDVLAQAWYVVSFTSLIPFR
  
```

124

```

Ps_Asa6      AVYFAFRGMAPATASTLNLGLKTFSSIS--L
G_pectorale  SVEVAFRGMAPHTSTPLTGLRTAVSLK--P
V_carteri    SVEVALRGLAPHTSTPLTGLRTAVTIK--P
C_leiostraca SIVMAFRGLAPHTATPINALRPAIALSMVA
C_spxx3      TVEFALRGIAPHTATPLAALRPVSFIR
C_euryale    SIYVSLRGIAPASAGPLSALKPTAFIK--P
C_reinhardtii SVEVALRGMAPATAAPFNGLRSAVALK--P
  
```

Subunidad Asa8

61

```

Ps_Asa8      MV-LGEVYVKDILRTPP--TG--AIPANVPHPFQTSFYTYAKKKLIPRHWYLLGGFTFTITLYGIL
P_parva      MV-LGEVYVKDILRTPP--TG--AIPANVPHPFQTSFYTYAKKKLIPRHWYLLGGFTFTITLYGIL
G_pectorale  MT-LGEAYVKDILRPPP--TG--FMPANVAHPYQKSFYTYAKKKLIPRHWYLLAGFTFTVTLYGQL
C_reinhardtii MT-LGEAYVKDILRPPP--TG--FMPENVAHPYQKSFYTYAKKKLIPRHWYLLAGFTFTITLYGTL
C_euryale    ML-T-ABYVKDIVRPPP--TG--GIPANVAHPFQTSFYTYVKKFLPRHWYLAAGATFTLLTYGTL
C_chlamydogama MG-LTEAYVKDILRPPP--TG--FLPANVAHPFQSFYTYLKKFIPKHWYLAAGVTALTLYGTL
C_leiostraca MT-LGEAYIKDILRPPP--VG--SVPGNVPHPFQKSFYTYLKKAMPKHWYLAAGFTFTLLYSAL
C_spxx5      MSGLSEYVKDILRPPP--LG--AVPGNVAHPFQKSFYTYLKKRAGPKHWYLAAGFGFTVTLYGYL
D_tertiolecta MD---ASYVKDILRPAP--TAAEGIPANVAHPFQKSFYTYLKKRAIPKHWYLAAGFGFTLFVYGAV
M_neglectum  MV-LGEAYLKGILRPPPLADV--ALPPNPPHFQTDLLFYLRQRFKHTPLVFGFAVAIYAFYQV
  
```

89

```

Ps_Asa8      DCLRDSCKKKAYDEATHACKTPYTAGGH
P_parva      DCLRDSCKKKAYDEATHACKTPYTAGGH
G_pectorale  DSLRDACKKKAYDEAVLACKQPFYTAGGH
C_reinhardtii DSLRDACKKKAYDEAVLACKQPFYTAGGH
C_euryale    DSLREACKKSAYDEAVAAGRPFYTAGGH
C_chlamydogama DSLRESCKKKAYDAVAAGRPFYTAGGH
C_leiostraca DSLREACKQKSYDQAVMEGKPFYTAGGH
C_spxx5      DCLRDAKKSAYDAAVLEGKPYTAGGH
D_tertiolecta DCLRDDIKKSAYDQKVLGQPFYTAGGH
M_neglectum  DSMMAAGCKKKAYDEATHAECGRSPF--GHH
  
```

Subunidad Asa9



Figure 5. Alineamiento múltiple de secuencia de las subunidades Asa6, Asa8 y Asa9 con varios miembros de las algas clorofíceas. Los residuos conservados en las secuencias se resaltan en negro. Asa6 es precedida por una señal de direccionamiento mitocondrial (en azul). La numeración es acorde a las subunidades Asa de *Polytomella* sp. Las secuencias usadas para este análisis se obtuvieron mediante una búsqueda de tipo Blastp en la base de datos Chlorophyceae (taxid: 3166) mediante el sitio web del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y a través de TaxoBlast (https://giavap-genomes.bpc.fr/cgi-bin/AlgoBLAST/algoBlast_mainpage.php): *Chlamydomonas* sp. CCMP681 (C_spxx5), *Chlamydomonas chlamydogama* (C_chlamydogama), *Chlamydomonas euryale* (C_euryale), *Chlamydomonas leiostraca* (C_leiostraca), *Chlamydomonas reinhardtii* (C_reinhardtii), *Gonium Pectorale* (G_pectorale), *Polytomella parva* (P_parva), *Polytomella* sp. (Ps_AsaX), *Monoraphidium neglectum* (M_neglectum) and *Volvox carteri* (V_carteri).

ANEXO II: CEBADORES

Los cebadores se diseñaron acorde a la secuencia de ADN de los genes reportados en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) que codifican para las versiones maduras de las subunidades: *a* (Atp6) (No. de acceso: CBK55668.1), *c* (Atp9) (No. de acceso: ADE92942.1), Asa6 (No. de acceso: ADE93002.1) y Asa8 (No. de acceso: ADH59420.1) de *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80, mientras que Asa9 (No. de acceso: DAA33943.1) se diseño tomando en cuenta la secuencia nucleotídica de *Polytomella parva* (Tabla IV).

Para cada uno de los cebadores los sitios de restricción elegidos fueron NdeI (CAT ATG) y BamHI (GGA TTC) para el extremo 5' y 3' respectivamente. Adicionalmente, al inicio de cada cebador se adicionaron 3 pares de bases para proteger los sitios de restricción. Asimismo, cuando la secuencia pertenece al cebador reverso le antecede el codón de paro TCC (Tabla IV).

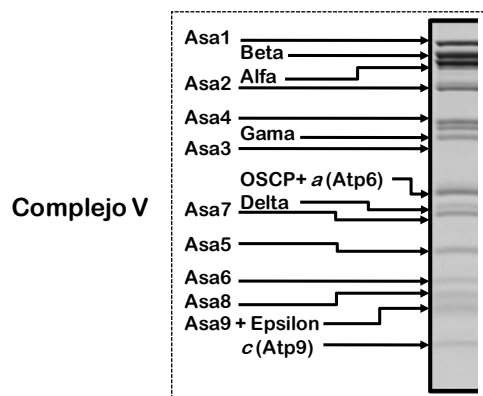
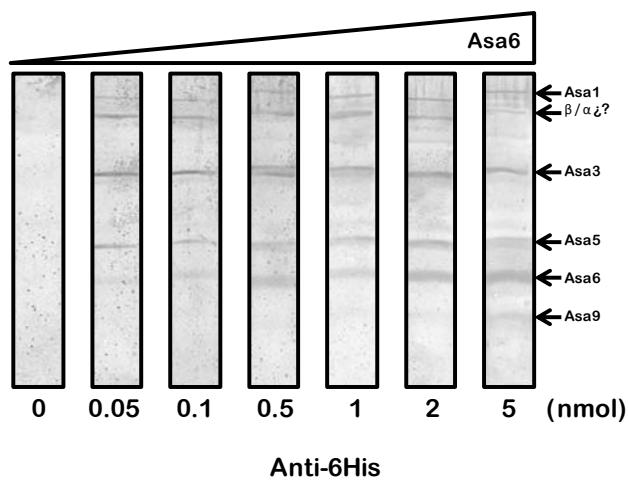
Tabla IV. Cebadores empleados para la amplificación de las subunidades de *Polytomella*.

Subunidad	Cebador directo	Cebador reverso
Subunidad <i>a</i> (Atp6)	5'- CCG CAT ATG TCC AGT GTT AGG GAT GTT AAG ACT GGC AGC -3'	5'- CGC GGA TCC TTA ATG GAT CTT CTT AAC AAT CTT AGC -3'
Subunidad <i>c</i> (Atp9)	5'- CGC CAT ATG AGC GTC CTC GCT GCC TCT AAG ATG -3'	5'- CGC GGA TCC TTA AGC GAA GAG GAT AAG GAA AAC -3'
Asa6	5'- CGC CAT ATG GAA GGC AAC TCT GTT GCT GGC ATT ATT -3'	5'- CGC GGA TCC TTA AAG GCT GAT GGA GCT GAA GGT -3'
Asa8	5'- CGC CAT ATG GTC CTC GGT GAG GTC TAC CTT AAG -3'	5'- CGC GGA TCC TTA GTG ACC ACC AGC AGT GTA AGG -3'
Asa9	5'- CCG CAT ATG GCT GTC ACT AGT TTC CTT GGC AAG -3'	5'- CGC GGA TCC TTA GTT GGA CTT CTT CCA CTC CTT -3'
Asa3	5'- CGC GGA TCC TTA ATG GAT CTT CTT AAC AAT CTT AGC -3'	5'- CGC GGA TCC TTA ATG ACC ATG GGC ACC TTC -3'
Asa5	5'- CCG CAT ATG GCT GTT GTG GCC TCC TGG GTG CTT -3'	5'- CAA GTC AAG CCT GCT CTT TTT TAA GGA TCC GCG -3'

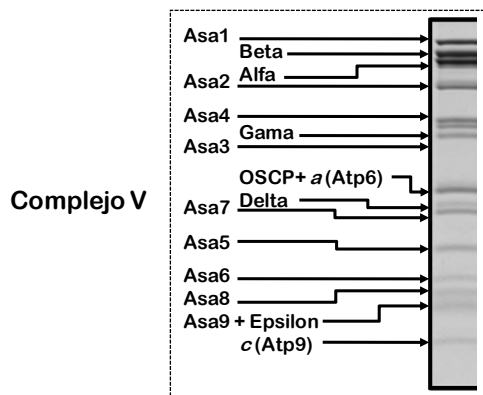
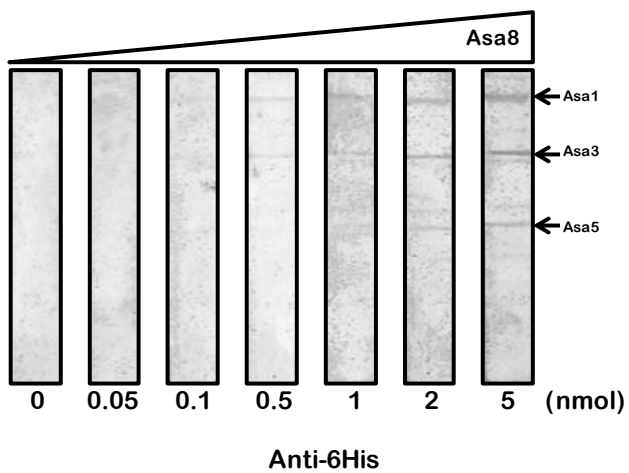
ANEXO III: ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL DOMINIO MEMBRANAL DE LA ATP SINTASA DE *Polytomella*.

Inmunorréplica tipo Far-Western.

A



B



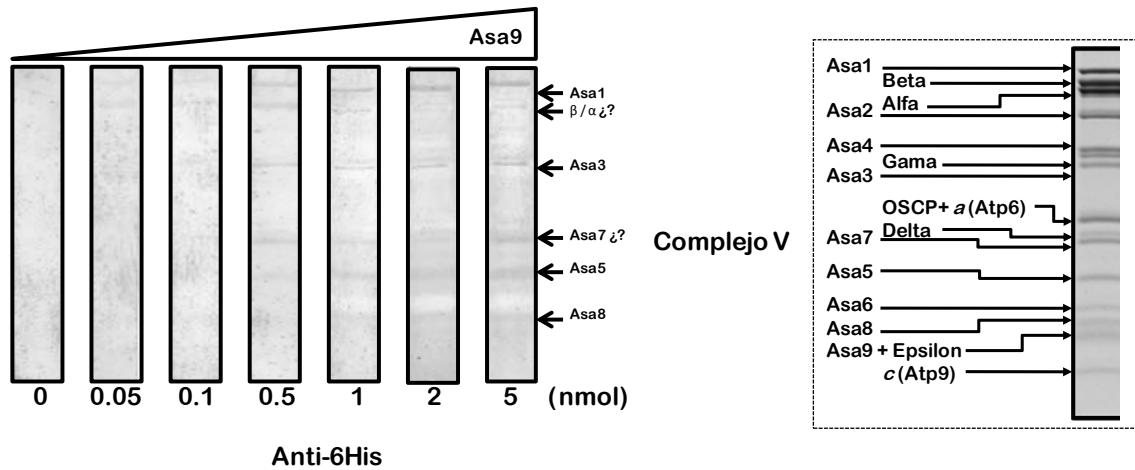
C

Figura 6. Interacción de las subunidades recombinantes con el complejo nativo de *Polytomella* por inmunorréplica tipo Far-Western. Izquierda: Carriles correspondientes al ensayo de interacción tipo F-WB de Asa6 (Panel A), Asa8 (Panel B) y Asa9 (Panel C) con el complejo enzimático nativo del alga. En cada ensayo se incubó a la enzima del alga (30 μg por carril) con concentraciones crecientes de Asa6_{6His}, Asa8_{6His} y Asa9_{6His} (0-5 nanomoles de proteína, indicados en la parte inferior y representado como un triángulo en la parte superior) y luego decorado con un anticuerpo anti-6His. Derecha: En cada panel se muestra un inserto de la composición polipeptídica del complejo enzimático de *Polytomella* a manera de referencia para las bandas identificadas a la izquierda.

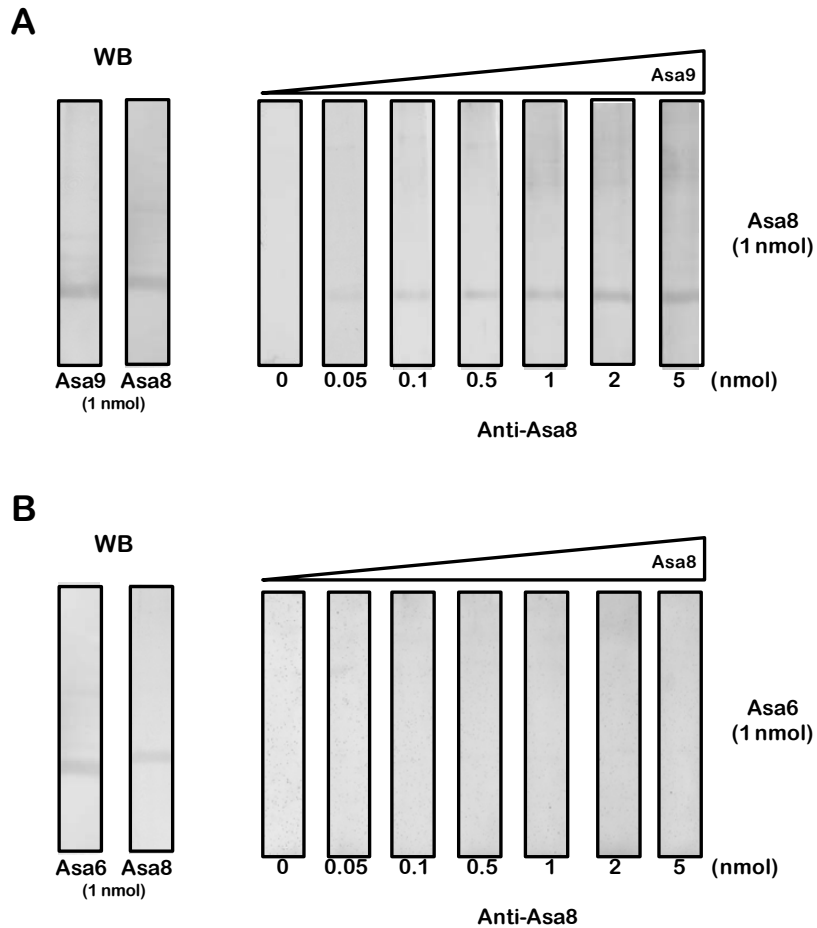


Figura 7. Ensayo de interacción de las subunidad Asa8 con Asa9 y Asa6 por inmunorréplica tipo Far-Western. Izquierda: Electrotransferencia tipo Western (WB) de las subunidades Asa9 | Asa8 (Panel A) y Asa8 | Asa6 (Panel B) marcadas con histidina, un nanomol de cada proteína se transfirió y decoró independientemente con su anticuerpo respectivo (control de transferencia y revelado). Derecha: En panel A ensayos de interacción Asa8_{6His} (1 nanomol por carril) incubado con cantidades crecientes de Asa9_{6His} (0-5 nanomoles de proteína, indicados en la parte inferior y representado como un triángulo en la parte superior) y luego decorado con un anticuerpo anti-Asa9. En panel B ensayos de interacción Asa6_{6His} (1 nanomol por carril) incubado con cantidades crecientes de Asa8_{6His} (0-5 nanomoles de proteína, indicados en la parte superior) y luego decorado con un anticuerpo anti-Asa8. Asa6_{6His}: 14 kDa, Asa8_{6His}: 10.8 kDa y Asa9_{6His}: 11.9 kDa.

Co-purificación mediante cromatografía de afinidad.

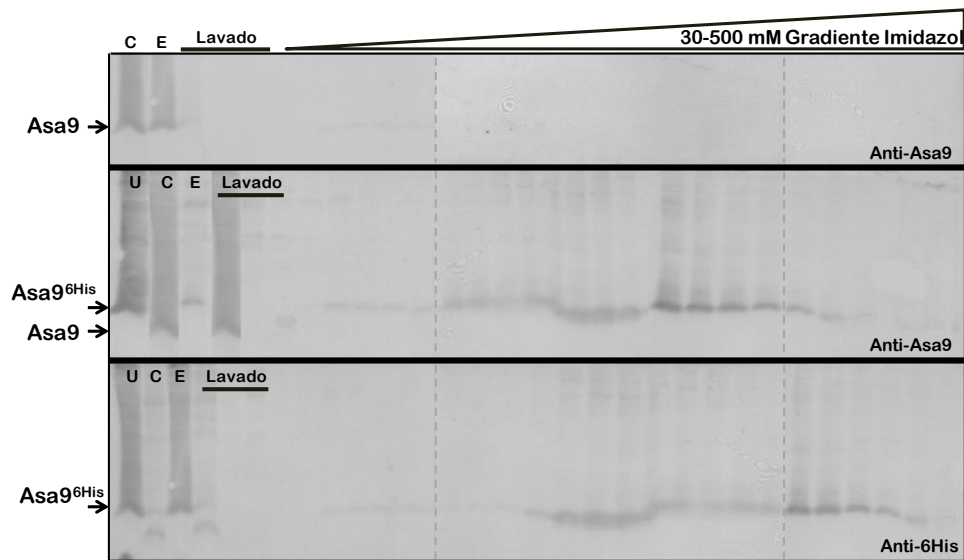


Figura 8. Ensayo de interacción de Asa9 por co-purificación mediante cromatografía de afinidad. Interacción de las subunidades Asa9-Asa9_{6His} ensayada por cromatografía de afinidad. Inmunorréplicas tipo Western de las fracciones de elución del gradiente de imidazol cuando la proteína recombinante sin marca se cargó sola a una columna (Panel superior) o cuando a una columna se unió el polipéptido con etiqueta previamente (Panel intermedio e inferior). Los carriles señalados como U, C y E corresponden a: Asa9_{6His} (unida), Asa9 (cargada) y proteína excluida de la columna (lavada), respectivamente. El lavado se realizó con 30 mM de imidazol. El gradiente de imidazol (30-500 mM) se representa con un triángulo. Los inmunoblots utilizados por panel se indican con líneas punteadas, así como el anticuerpo empleado en cada uno de ellos (esquina inferior derecha). Asa9: 11 kDa y Asa9_{6His}: 11.9 kDa.

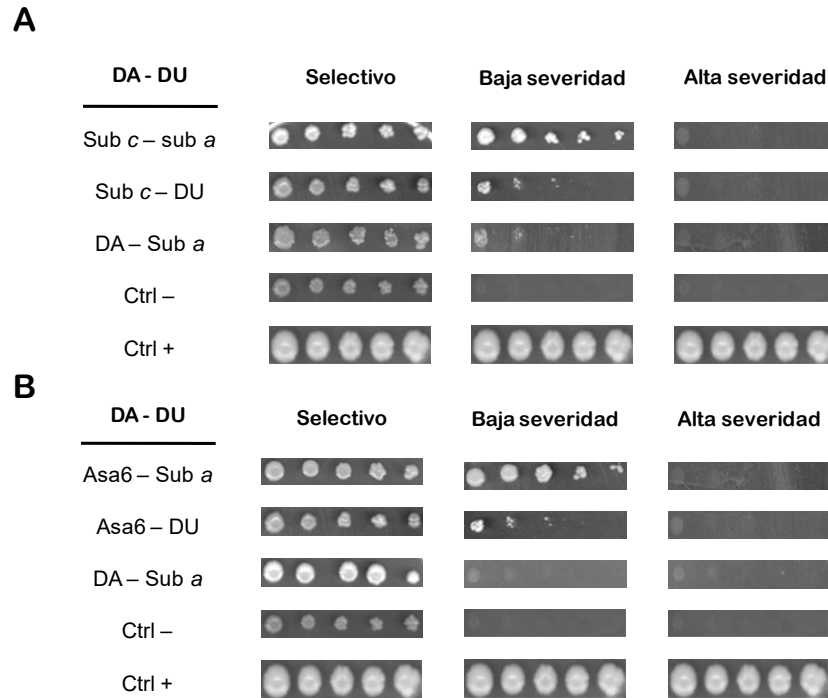


Figura 9. Interacción de las subunidades *a*, *c* y *Asa6* a través del Y2H. Interacción de *a*(Atp6)-*c*(Atp9) (Panel A) y *Asa6*-*a* (Panel B). Izquierda: En la columna se indica el inserto de interés contenido tanto en el DA, como en el DU. Derecha: En la parte superior se describe el medio de crecimiento utilizado: selectivo (-Leu/-Trp), baja severidad (-Leu/-Trp/-His) y alta severidad (-Leu/-Trp/-His/-Ade). Diluciones empleadas en el ensayo: 1:10 - 1:10,000. Como controles externos del ensayo se usaron las construcciones DA: proteína p53 | DU: antígeno T SV40(Ctrl +); y DA: proteína p53 | DU: laminina C (Ctrl -).

Ensayos de entre-cruzamiento con la ATP sintasa de *Polytomella* sp.

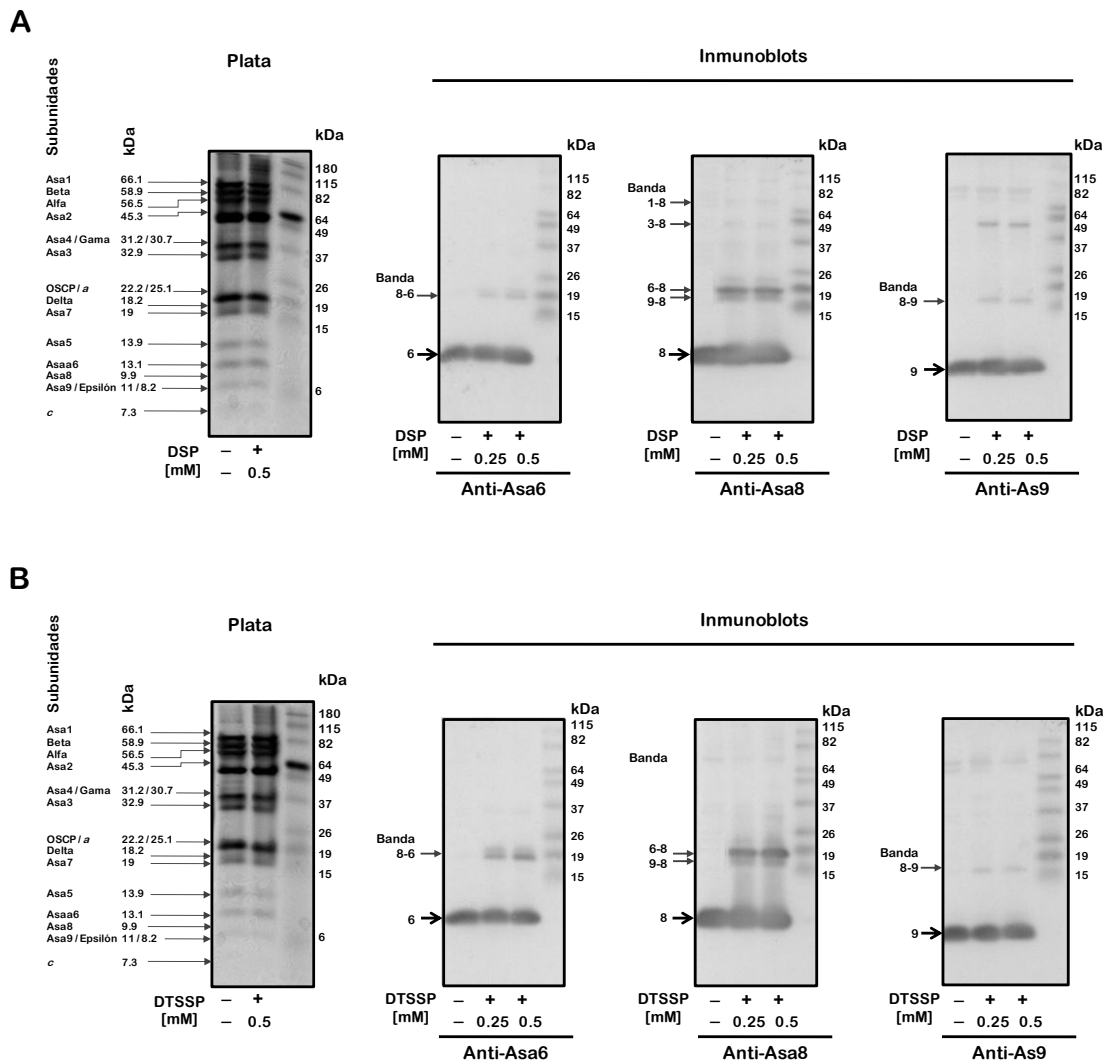


Figura 10. Productos de entrecruzamiento de la ATP sintasa de *Polytomella*. Los ensayos de entrecruzamiento se realizaron con agentes homo-bifuncionales escindibles. Izquierda: La tinción con plata muestra la composición polipeptídica de la enzima del alga (50 μ g de proteína por carril) incubada en ausencia (signo negativo) o presencia (signo positivo) de DSP (panel A) o DTSSP (panel B), así como la masa molecular aparente. Derecha: Inmunorréplicas tipo Western de la ATP sintasa del alga (30 μ g de proteína por carril) incubada en ausencia (signo negativo) o presencia (signo positivo) de DSP (panel A) o DTSSP (panel B) e inmunodecorada con los anticuerpos específicos indicados. Las concentraciones usadas en el ensayo se indican en la parte inferior. Los productos de entrecruzamiento se identificaron con el número de las subunidades Asa que los componen (Ej. Banda 8-6: Asa8-Asa6).

ANEXO IV: REACTIVOS, AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES

Reactivos.

Los compuestos acetato de sodio trihidratado, sacarosa, EDTA-Na₂, Tris, PMSF, TLCK, n-Dodecyl β-D-maltósido, DEAE-sepharose®, ATP (Adenosín-5'-trifosfato disódico), CuSO₄, BSA (albúmina sérica de bovino fracción V libre de ácidos grasos), el reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu, tricina, *N,N'*-metilen-bis-acrilamida, ácido 6-amino caproico, Ponceau S, Tween® 20, MgCl₂, NBT, BCIP, 2-mercaptoetanol, Agar, X-gal, gelatina, polietilnglicol 3350, CaCl₂, la glucosa, el SS DNA, el DTE, el DTT, el IPTG, el tritón X-100, la urea, el NiSO₄•6H₂O, tiosulfato de sodio, nitrato de plata y el acetato de litio se adquirieron de Sigma-Aldrich Chem., Co. (St. Louis MO, EUA).

Por otra parte, los compuestos MgSO₄•7H₂O, NaCl, Na₂CO₃, tartrato de sodio-potasio, NaOH, MeOH, EtOH, NaHCO₃, CH₃CO₂H (glacial), DMF, glicerol, KCl, CH₃CO₂K, NaH₂PO₄, sulfato de amonio y el isopropanol se compraron de J.T. Baker, Avantor Performance Materials (Center Valley PA, EUA).

Finalmente, los reactivos bactotripton, tripton, bacto-pepton, extracto de levadura y la base nitrogenada para la preparación de medios de cultivo se obtuvieron de Becton, Dickinson and Company (New Jersey, EUA). El tensoactivo SDS, la acrilamida, y el TEMED se adquirieron de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules CA, EUA). El APS y el imidazol se compraron de Affymetrix|USB; mientras que el bromuro de etidio, y los adyuvantes completo e incompleto de Freud se adquirieron de Gibco, ambas compañías forman parte de Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, EUA). El azul de Coomassie G y R se compró de Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Alemania). El DMSO y los agentes entrecruzantes (DSS, BS³, DSP y DTSSP) se obtuvieron de Pierce Chemical (Bronze Way, TX, EUA). El acetato de magnesio se compró de Reactivos Meyer (Tláhuac, Ciudad de México; México).

Cultivo del alga incolora *Polytomella* sp.

Medio Ember para crecimiento del alga cloroficea.

Acetato de sodio 29.4 mM 4 g/L

Bactotripton 0.2 % (p/v) 2 g/L

Extracto de levadura 0.2% (p/v) 2 g/L

Esterilización por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 30 min).

Vitaminas.

Tiamina (B₁) 2 mg/10 mL

Cianocobalamina (B₁₂) 0.1 mg/10 mL

La solución debe filtrarse para esterilidad (Filtro 0.22 µm).

Obtención de las mitocondrias del alga.

Amortiguador de mitocondrias.

Tris 20 mM 2.43 g/L

Sacarosa 0.3 M 126.65 g/L

EDTA-Na₂ 4 mM 1.49 g/L

Ajustar con HCl a pH 7.4

Purificación de la ATP sintasa de *Polytomella* sp.

Amortiguador de solubilización.

Tris	50 mM	607 mg/100 mL
NaCl	100 mM	584 mg/100 mL
MgSO ₄ •7 H ₂ O	1 mM	246.47 mg/100 mL
PMSF	1 mM	17 mg/100 mL
TLCK	50 µg/ mL	5 mg/100 mL

Ajustar con HCl a pH 8.0.

Amortiguador de diálisis.

Tris	50 mM	12.11 g/L
MgSO ₄	1 mM	0.492 g/L

Ajustar con HCl a pH 8.0.

Amortiguador de equilibrio de la columna de intercambio aniónico (DEAE).

Tris	50 mM	3.027 g/500 mL
MgSO ₄	1 mM	0.123 g/500 mL
n-Dodecil β-D-maltósido	0.1 mg/mL	0.05 g/500 mL
PMSF	1 mM	85 mg/100 mL
TLCK	50 µg/ mL	25 mg/100 mL

Ajustar con HCl a pH 8.0.

Amortiguador de ATPasa.

Tris	50 mM	3.027 g/500 mL
NaCl	125 mM	3.65 g/500 mL
MgSO ₄	1 mM	0.123 g/500 mL
n-Dodecil β-D-maltósido	0.1 mg/mL	0.05 g/500 mL
PMSF	1 mM	85 mg/100 mL
TLCK	50 µg/ mL	25 mg/100 mL

Ajustar con HCl a pH 8.0.

Amortiguador de Lutter.

Tris	20 mM	1.21 g/500 mL
NaCl	35 mM	1.02 g/500 mL
EDTA-Na ₂	1 mM	0.186 g/500 mL
n-Dodecil β-D-maltósido	0.1 mg/mL	0.05 g/500 mL
ATP	1 mM	0.275 g/500 mL

Ajustar con HCl a pH 7.5.

Tabla V. Soluciones porcentuales empleadas para el gradiente de glicerol.

% solución (v/v)	Amort. Lutter (mL)	Glicerol (mL)
50	10	10
40	12	8
30	14	6
20	16	4
15	17	3

Emplear 2 mL de cada solución (50.0-15.0 %) por cada gradiente de separación de glicerol.

Purificación de la enzima para ensayos de entrecruzamiento.

Amortiguador de HEPES.

HEPES	20 mM	2.38 g/500 mL
NaCl	35 mM	1.02 g/500 mL
EDTA-Na ₂	1 mM	0.186 g/500 mL
n-Dodecil β-D-maltósido	0.1 mg/mL	0.05 g/500 mL
ATP	1 mM	0.275 g/500 mL

Ajustar con HCl a pH 7.5.

Amortiguador de enfriamiento de la reacción de entrecruzamiento.

Tris	1 M	1.216 g/10 mL
------	-----	---------------

Ajustar con HCl a pH 7.5.

Análisis de proteínas.

Determinación de la concentración por el método de Markwell.

Solución A.

1/8 de solución de Na₂CO₃ 20.0 %

1/8 de solución de tartrato de sodio-potasio 1.0 %

1/8 de solución de CuSO₄ 0.5 %

1/4 de solución de NaOH 0.8 N

1/4 de solución de SDS 10.0 %

1/4 de H₂O destilada

Solución B.

1/6 del reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu

5/6 de H₂O destilada

Soluciones madre.

Na₂CO₃ 20.0 % (p/v) 20 g/100 mL

*KNaC₄H₄O₆·4H₂O 1.0 % (p/v) 1 g/100 mL

⁺CuSO₄ 0.5 % (p/v) 0.5 g/100 mL

NaOH 0.8 N 3.2 g/100 mL

SDS 10.0 % (p/v) 10 g/100 mL

BSA 1 mg/mL de albúmina sérica de bovino fracción V libre de ácidos grasos.

*⁺ El Tartrato de sodio-potasio y el sulfato de cobre se pesan individualmente, mas se disuelven en H₂O ambos para formar una sola solución.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Solución de acrilamida/bis-acrilamida.

Acrilamida	30.0 % (p/v)	30 g/100 mL
Bis-acrilamida	0.98 % (p/v)	0.98 g/100 mL

La solución debe filtrarse y guardar a 4 °C.

Amortiguador electroforético.

Tris	3 M	181.7 g/500 mL
HCl	1 N	40.3 mL/500 mL
SDS	0.3 % (p/v)	1.5 g/500 mL

Soluciones para geles de poliacrilamida.

Glicerol	79.5 % (v/v)	79.5 mL/100 mL
Persulfato de amonio	10.0 % (p/v)	5 g/50 mL

Tabla VI. Mezclas para geles de tricina SDS-PAGE.

	Gel separador			Gel concentrador
	12.0 %	14.0 %	18.0 %	4.0 %
Solución madre de acrilamida	3 mL	3.5 mL	4.5 mL	400 µL
Amortiguador electroforético	3.5 mL	3 mL	2 mL	750 µL
Glicerol 79.5 %	1 mL	1 mL	1 mL	
Agua				2 mL
Persulfato de amonio 10.0 %	50 µL			100 µL
TEMED	5 µL			10 µL

Amortiguador de carga de proteínas.

Tris	100 mM	1.25 g/25 mL
SDS	10.0 % (p/v)	2.5 g/25 mL
Glicerol	30.0 % (v/v)	7.5 g/25 mL
Azul de Coomassie	0.3 % (p/v)	75 mg/25 mL
Mercaptoetanol	4.0 % (v/v)	1 mL/25 mL

Ajustar con HCl a pH 6.8.

Amortiguador del cátodo.

Tris	0.1 M	36.3 g/3 L
Tricina	0.1 M	53.8 g/3 L
SDS	0.1 % (p/v)	3 g/3 L

Amortiguador del ánodo.

Tris	0.1 M	36.3 g/3 L
------	-------	------------

Ajustar con HCl a pH 8.9.

Solución para tinción con azul de Coomassie.

Etanol	50.0 % (v/v)	50 mL/100 mL
Ácido acético	12.0 % (v/v)	12 mL/100 mL
Coomasie Blue R-250	0.1 % (p/v)	100 mg/100 mL

Solución desteñidora.

Ácido acético	12.0 % (v/v)	12 mL/100 mL
Etanol	5.0 % (v/v)	5 mL/100 mL

Teñir de 4-12 h con Azul de Coomassie y desteñir de 3-6 h adicionales, con agitación.

Protocolo para tinción con plata.

Incubar el mini gel en 50 mL de solución fijadora (4-12 h).

Lavar el gel con etanol al 50.0 % durante 10 min (3 veces).

Incubar en 50 mL de tiosulfato de sodio por 1 min.

Inmediatamente, lavar con H₂O destilada incubando por 20 seg (2 veces).

Incubar en 50 mL de nitrato de plata adicionando 37.5 µL de formaldehído al 37.0 % por 1 h.

Lavar con H₂O destilada incubando por 1 min (2 veces).

Incubar en 50 mL de solución reveladora hasta la aparición de bandas de proteína color café obscuro-negro. El tiempo de revelado es variable (5-30 min).

Detener la reacción con CH₃CO₂H al 40.0 % (v/v).

Eliminar el fondo de la tinción con H₂O más etanol al 5.0 %.

Solución fijadora.

Metanol	50.0 % (v/v)	50 mL/100 mL
CH ₃ CO ₂ H	12.0 % (v/v)	12 mL/100 mL
Formaldehído al 37.0 %	50 µL/100 mL	

Soluciones complementarias.

Etanol	50.0 % (v/v)	50 mL/100 mL
Tiosulfato de sodio	20 mg/100 mL	
Nitrato de plata	200 mg/100 mL	
CH ₃ CO ₂ H	40.0 % (v/v)	40 mL/100 mL

Solución reveladora.

NaHCO ₃ (anhidro)	6 g/100 mL
Formaldehído al 37.0 %	50 µL/100 mL
Solución de tiosulfato de sodio	200 µL/100 mL

*Inmunorréplica tipo Western.***Amortiguador positivo.**

Tris	150 mM	18.2 g/L
Tricina	50mM	9 g/L
Metanol	20.0 % (v/v)	200 mL/L

Amortiguador negativo.

Ácido 6-amino caproico	300mM	39.4 g/L
SDS	0.05 % (p/v)	0.5 g/L

Ajustar con Tris a pH 8.5-8.7

Rojo de Ponceau.

Rojo de Ponceau S	0.1 % (p/v)	50 mg/50 mL
Ácido acético	5.0 % (v/v)	2.5 mL/50 mL

Amortiguador Salino de Tris (TBS).

Tris	20 mM	2.4 g/L
NaCl	500 mM	29.2 g/L

Ajustar con HCl a pH 7.5.

Amortiguador Salino de Tris-Tween (TTBS).

Tris	20 mM	2.4 g/L
NaCl	500 mM	29.2 g/L
Tween-20	0.05 % (v/v)	0.5 mL/L

Ajustar con HCl a pH 7.5.

Solución de revelado.

NaHCO ₃	100 mM	4.2 g/500 mL
MgCl ₂	1 mM	47.6 mg/500 mL
*NBT	0.1 % (v/v) de sol. madre por volumen de incubación	
*BCIP	0.1 % (v/v) de sol. madre por volumen de incubación	

Ajustar con NaOH a pH 9.8.

***Soluciones madre.**

NBT 60 mg en 2.8 mL de DMF y 1.2 mL H₂O.

BCIP 30 mg en 4 mL DMF.

Usar cada solución al 0.1 % (v/v) por un volumen de incubación.

Por ejemplo, añadir 100 µL de cada solución madre por 100 mL de solución reveladora.

Solución para eliminación de reactivos (stripping).

Tris	62.5 mM	0.76 g/100 mL
SDS	2.0 % (p/v)	2 g/100 mL
2-mercaptoetanol	100 mM	0.78 g/100 mL

Ajustar con HCl a pH 6.8.

Tabla VII. Características de los agentes entrecruzantes empleados.

Agente entrecruzante	Propiedades químicas
<p>DSS</p>	<p>Peso molecular: 368.35 g/mol Brazo espaciador: 11.4 Å Fórmula: C₁₆H₂₀N₂O₈ Solubilidad: DMS ó DMF</p>
<p>BS³</p>	<p>Peso molecular: 572.43 g/mol Brazo espaciador: 11.4 Å Fórmula: C₁₆H₁₈N₂Na₂O₁₄S₂ Solubilidad: H₂O</p>
<p>DSP</p>	<p>Peso molecular: 404.42 g/mol Brazo espaciador: 12 Å Fórmula: C₁₄H₁₆O₈N₂S₂ Solubilidad: DMSO</p>
<p>DTSSP</p>	<p>Peso molecular: 608.51 g/mol Brazo espaciador: 12 Å Fórmula: C₁₄O₁₄S₄H₁₄N₂Na₂ Solubilidad: H₂O</p>

Preparación de las soluciones para los ensayos de entrecruzamiento.

Se recomienda trabajar con soluciones recién preparadas de cada entrecruzador. Asimismo, para su uso se aconseja partir de una solución 100 mM. Para ello, se pesa 1 mg de DSS y DSP y se disuelven en 27 µL y 24.7 µL de DMSO, respectivamente. De igual forma, se pesa 1 mg de BS³ y DTSSP y se disuelven en 17.5 µL y 16.4 µL de H₂O, respectivamente. Por último, se prepara una solución 5 mM empleando como disolvente DMSO para DSS y DSP y amortiguador de HEPES (pH 7.5) para BS³ y DTSSP. Ésta última solución es la que se usa para los ensayos de entrecruzamiento.

Obtención de las subunidades recombinantes.

*Clonación de los genes de las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella sp.**

Gel de agarosa.

Agarosa 1.0 % (p/v) 1 g/100 mL

Disolver la agarosa mediante calentamiento con amortiguador TAE 1 X.

Amortiguador de carga de ADN 6 X.

Azul de bromofenol 0.25 % (p/v) 25 mg/10 mL

Xilen-cianol FF 0.25 % (p/v) 25 mg/10 mL

Glicerol 30.0 % (v/v) 3 mL/10 mL

Disolver en H₂O destilada y almacenar a -20 °C.

Solución madre de amortiguador Tris-Acetato-EDTA (TAE).

Tris 2 M 242 g/L

EDTA-Na₂ 50 mM 18.61 g/L

Ácido acético glacial 1 M 57.1 mL/L

Adicionar el Tris y el EDTA a 700 mL de H₂O destilada y agitar. Una vez disueltos agregar el ácido acético y aforar a un litro con agua destilada. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador TAE 1 X.

Tomar 20 mL de amortiguador TAE 50 X y aforar a un litro con agua destilada.

Solución teñidora de bromuro de etidio.

10 mg de bromuro de etidio/mL.

Disolver en agua destilada.

Preparación de células competentes de E. coli.

Medio Luria-Bertani (LB).

Triptona	10 g/L
NaCl	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

Esterilización por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 30 min).

Placas de LB sólido con IPTG y X-gal.

Para la preparación de medio sólido se adiciona Agar al 2.0 % (p/v).

⁺Agregar 10 µL de una solución madre de 1 M IPTG.

⁺Agregar 50 µL de una solución madre de 20 mg/mL de X-gal.

⁺Soluciones madre.

IPTG Disolver 238.3 mg en 1 mL de agua destilada.

X-gal Disolver 20 mg en 1 mL de DMF ó DMSO. Proteger de la luz.

Ambos se almacenan a -20 °C.

Soluciones madre de antibióticos.

Ampicilina (Amp) 100 mg/mL 100 µg/mL de medio

Kanamicina (Kan) 50 mg/mL 50 µg/mL de medio

Disolver en agua destilada.

*Cloranfenicol (Cm) 100 mg/mL 100 µg/mL de medio

⁺Tetraciclina (Tc) 15 mg/mL 15 µg/mL de medio

*Disolver en etanol absoluto. ⁺Disolver en 50.0 % de etanol (absoluto) y proteger de la luz.

Todos los antibióticos se almacenan a -20 °C.

Tabla VIII. Características de las cepas de *E. coli* empleadas.

Cepa	Características clave
DH5-Alfa	Está diseñada para procesos de clonación rutinarios, debido a las mutaciones múltiples en los genes: <i>i) lacZΔM15</i> facilitando la selección de colonias por alfa complementación (células blancas y azules); <i>ii) endA1</i> disminuyendo la degradación por endonucleasas; y <i>iii) recA1</i> reduciendo la recombinación homóloga. No tiene resistencia antibiótica (Casali, 2003).
BL21 CodonPlus-RIL	Posee un número de copias extra de los ARNt: argU, ileY y leuW. Los cuáles reconocen a los codones AGA/AGG (Arg), AUA (Ile) y CUA (leucina), respectivamente. Mejorando la expresión de proteínas cuyos genomas son ricos en GC. Resistencia a Tc & Cm (Carstens <i>et al.</i> , 2001).
BL21pLysS	El plásmido pLysS reduce los niveles de expresión del gen de interés, debido a la producción de la lisozima T7 y de esta forma se favorece la producción de proteínas tóxicas. Resistencia a Cm (Zhang & Studier, 1997).
Origami	Incrementa los niveles de expresión de proteínas con cisteínas gracias a las mutaciones en los genes de la tiorredoxina reductasa (<i>trxB</i>) y la glutatión reductasa (<i>gor</i>). Tiene resistencia a Km & Tc (Casali, 2003).
Rosetta	Está diseñada para incrementar la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raramente utilizados en <i>E. coli</i> , como los ARNt de los codones: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA. Resistencia antibiótica a Cm (Casali, 2003).
Tuner	Presenta una mutación en el gen <i>lacZY</i> (permeasa lac) permitiendo un control de la expresión dependiente de la concentración de IPTG. Por lo tanto, niveles de expresión menores pueden incrementar la solubilidad de proteínas recombinantes. No presenta resistencia antibiótica (Casali, 2003).
C41(DE3)	Efectiva en la expresión de proteínas de membrana y aquellas consideradas tóxicas para <i>E. coli</i> . Esta cepa deriva de la BL21(DE3) [<i>gal hsdS_B met ompT</i>]. Adicionalmente, posee una mutación en la actividad de la T7 ARN polimerasa, disminuyendo la muerte celular asociada a la expresión de proteínas tóxicas recombinantes. No tiene resistencia antibiótica (Miroux & Walker, 1996).

Medio 2xYT.

Bactotripton 16 g/L

Extracto de levadura 10 g/L

NaCl 5 g/L

Ajustar con NaOH a pH 7.0.

Esterilización por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 30 min).

Medio 2xYT-CC.

Medio 2xYT	60 mL/100 mL
NaCl	0.7 g/100 mL
PEG 3350	10 g/100 mL
Glicerol	10 mL
MgCl ₂	1 mL de una solución 1 M
MgSO ₄	1 mL de una solución 1 M
DMSO	5 mL

Ajustar con NaOH a pH 6.5-7.0 y aforar a 100 mL. La solución debe filtrarse para esterilidad (Filtro 0.22 μ m). Alícuotar y almacenar a -20 °C.

Solución de KCM.

KCl	100 mM	37.27 mg/50 mL
CaCl ₂	30 mM	22 mg/50 mL
MgCl ₂	50 mM	23.8 mg/50 mL

La solución debe filtrarse para esterilidad (Filtro 0.22 μ m). Alícuotar y almacenar a -20 °C.

Medio SOC.

Triptona	2.0 % (p/v)	2 g/100 mL
Extracto de levadura	0.5 % (p/v)	0.5 g/100 mL
NaCl	10 mM	58.44 mg/100 mL
KCl	2.5 mM	18.64 mg/100 mL
MgCl ₂	10 mM	95.21 mg/100 mL
Glucosa	20 mM	36 mg/100 mL

Preparar la solución con los primeros cuatro ingredientes y esterilizar por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 30 min). Después, adicionar el MgCl₂ y la glucosa esterilizados por filtración (Filtro 0.22 μ m).

Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.

Solución I.

Tris	50 mM	0.6 g/100 mL
EDTA-Na ₂	100 mM	3.7 g/100 mL

Solución RNasa.

Disolver en agitación 100 mg de la enzima en 10 mL de agua destilada y calentar a 90 °C durante 10 min, alicuotar y guardar a -20 °C.

Solución II.

NaOH	0.2 M	0.8 g/100 mL
SDS	1.0 %	1 g/100 mL

Primero solubilizar el NaOH y después el SDS.

Solución III.

Acetato de potasio	1.32 M	12.9 g/100 mL
--------------------	--------	---------------

Ajustar con CH₃CO₂H a pH 5.2.

Clonación en vectores de expresión y producción recombinante de las subunidades.

Amortiguador Súper Duper 10 X (SDB).

Tris	1 M	6 g/50 mL
Acetato de potasio	5 M	24.5 g/50 mL
Acetato de magnesio	1 M	1 g/50 mL
Espermidina	0.1 M	0.73 g/50 mL
Ditioeritritol (DTE)	0.1 M	0.77 g/50 mL

Ajustar con CH₃CO₂H a pH 7.8.

NOTA: Este amortiguador funciona bien con todas las enzimas de restricción, así como para la reacción de ligación (añadiendo ATP) y la de desfosforilación.

Purificación de las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión.

Protocolo de lavado de cuerpos de inclusión.

El lavado de los cuerpos inclusión (CI) comienza a partir del lisado celular obtenido por sonicación.

Por litro de cultivo se resuspende la pastilla en 30 mL de amortiguador de lisis. Asimismo, todos los pasos se realizan con el mismo amortiguador a 4 °C.

Al lisado celular se adiciona tritón X-100 al 1.0 % (300 µL/30 mL).

Homogeneizar y tomar 300 µL de alícuota del extracto total.

Incubar por 10 min.

Centrifugar a 15,000 x g durante 20 min. Tomar 300 µL de alícuota del sobrenadante.

Resuspender en amortiguador de lisis con tritón X-100 al 1.0 % (300 µL/30 mL).

Homogeneizar y tomar 300 µL de alícuota del resuspendido de CI.

Incubar por 10 min.

Centrifugar a 15,000 x g durante 20 min. Tomar 300 µL de alícuota del sobrenadante.

Resuspender en amortiguador de lisis.

Homogeneizar y tomar 300 μ L de alícuota del resuspendido de CI.

Incubar por 10 min.

Centrifugar a 15,000 x g durante 20 min. Tomar 300 μ L de alícuota del sobrenadante.

Conservar la pastilla de CI lavados a -70 °C.

Amortiguador de lisis.

Tris	50 mM	0.6 g/100 mL
NaCl	100 mM	0.58 g/100 mL
DTT	100 mM	1.5 g/100 mL
EDTA-Na ₂	100 mM	3.7 g/100 mL
Glicerol	5.0 % (v/v)	5 mL/100 mL

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

Amortiguador de PBS modificado.

NaH ₂ PO ₄	20 mM	2.76 g/L
NaCl	100 mM	5.8 g/L
Glicerol	5.0 % (v/v)	50 mL/L

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

NOTA: Todos los amortiguadores empleados en la purificación deben filtrarse y desgasificarse. Se almacenan a 4 °C.

Amortiguador A para purificación de proteínas recombinantes.

NaH ₂ PO ₄	20 mM	2.76 g/L
NaCl	100 mM	5.8 g/L
Glicerol	5.0 % (v/v)	50 mL/L
Tritón X-100	0.5 % (v/v)	5 mL/L

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

Amortiguador B para purificación de proteínas recombinantes.

NaH ₂ PO ₄	20 mM	2.76 g/L
NaCl	100 mM	5.8 g/L
Glicerol	5.0 % (v/v)	50 mL/L
Tritón X-100	0.5 % (v/v)	5 mL/L
Imidazol	500 mM	34.04 g/L

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

Protocolo de limpieza y regeneración de la columna de afinidad (Níquel-ácido nitrilotriacético).

Todos los pasos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor (GE Healthcare).

Colocar la columna en flujo reverso.

Se hacen pasar 3-5 volúmenes de columna (VC) de:

Agua destilada.

Amortiguador de quelación (remueve el níquel).

NaCl 1.5 M (interrumpe interacciones iónicas).

NaOH 1 M (precipita proteínas hidrofóbicas) e incubar por 4-12 h (máximo).

Isopropanol 30.0 % (remueve proteínas hidrofóbicas).

NiSO₄ 0.1 M (regenera el níquel de la columna).

Etanol 70.0 %.

En cada paso lavar con 3-5 VC de agua destilada. Almacenar con etanol al 20.0 % a temperatura ambiente.

Soluciones de limpieza y regeneración de la columna de afinidad.

Amortiguador de quelación.

NaH ₂ PO ₄	20 mM	1.38 g/0.5 L
NaCl	0.5 M	14.61 g/0.5 L
EDTA	50 mM	9.3 g/0.5 L

Ajustar con HCl a pH 7.4.

Soluciones restantes.

NaCl	1.5 M	43.83 g/0.5 L
NaOH	1 M	20 g/0.5 L
Isopropanol	30.0 % (v/v)	150 mL/0.5 L
NiSO ₄	0.1 M	13.14 g/0.5 L
Etanol	70.0 % (v/v)	350 mL/0.5 L
Etanol	20.0 % (v/v)	100 mL/0.5 L

Generación de anticuerpos a partir de las subunidades recombinantes.

Amortiguador superior.

Tris	0.1 M	6.05 g/0.5 L
Tricina	0.1 M	8.97 g/0.5 L
SDS	0.05 % (p/v)	0.25 g/0.5 L

Azul de Serva G 12.5 mg/0.5 L

Ajustar con HCl a pH 7.9.

Amortiguador inferior.

Tris	0.1 M	6.05 g/0.5 L
------	-------	--------------

Ajustar con HCl a pH 8.9.

Amortiguador de resuspensión.

Tris	20 mM	0.24 g/100 mL
------	-------	---------------

Ajustar con HCl a pH 7.0.

Co-purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.

Amortiguados de renaturalización.

NaH ₂ PO ₄	100 mM	27.6 g/2 L
----------------------------------	--------	------------

NaCl	150 mM	17.5 g/2 L
------	--------	------------

Glicerol	5.0 % (v/v)	100 mL/2 L
----------	-------------	------------

Tritón X-100	0.5 % (v/v)	10 mL/2 L
--------------	-------------	-----------

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

Amortiguador A para co-purificación de proteínas recombinantes.

NaH ₂ PO ₄	100 mM	6.8 g/0.5 L
----------------------------------	--------	-------------

NaCl	150 mM	4.38 g/0.5 L
------	--------	--------------

Glicerol	5.0 % (v/v)	25 mL/0.5 L
----------	-------------	-------------

Tritón X-100	0.5 % (v/v)	2.5 mL/0.5 L
--------------	-------------	--------------

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

Amortiguador B para co-purificación de proteínas recombinantes.

NaH ₂ PO ₄	100 mM	6.8 g/0.5 L
NaCl	150 mM	4.38 g/0.5 L
Glicerol	5.0 % (v/v)	25 mL/0.5 L
Tritón X-100	0.5 % (v/v)	2.5 mL/0.5 L
Imidazol	500 mM	17.02 g/0.5 L

Ajustar con NaOH a pH 7.9.

Sistema del doble híbrido en levadura.

Crecimiento y cultivo de levadura.

Medio YPDA.

Extracto de levadura	1 g/100 mL
Bacto-peptona	2 g/100 mL
Glucosa	2 g/100 mL
Adenina	2 mg/100 mL

Para la preparación de medio sólido se adiciona Agar al 2.0 % (p/v).

Esterilizar por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 20 min).

Medio SD.

Base nitrogenada	170 mg/100 mL
Sulfato de amonio	500 mg/100 mL
Glucosa	2 g/100 mL

Esterilizar por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 20 min).

Protocolo para transformar células de levadura.

Inocular 3 mL de medio YPDA con una colonia de levadura e incubar 12 h con agitación a 250 rpm a 30 °C.

Adicionar 50-100 µL del cultivo de levadura a 1 mL de medio SD. Aproximadamente la suspensión debe tener 5×10^8 células.

Centrifugar (microcentrifuga) a 13,000 x g por 30 seg y descartar el sobrenadante.

Repetir este paso dos veces más resuspendiendo con 1 mL de medio SD.

Adicionar en el siguiente orden: 240 µL de PEG 3350, 36 µL de acetato de litio, 50 µL de SS DNA, 34 µL de H₂O (estéril) y hasta 1 µg de ADN plasmídico.

Mezclar con vórtex a homogeneidad y adicionar la suspensión a la pastilla de células.

Mezclar con ayuda de una micropipeta e incubar a 42 °C por 40 min.

Centrifugar a 13,000 x g por 30 seg y remover el sobrenadante con ayuda de una micropipeta.

Repetir este paso dos veces más resuspendiendo con 1 mL de medio SD.

Finalmente, plaquear 1 mL del resuspendido celular en el medio de selección correspondiente (-Leu/-Trp/SD).

Para obtener transformantes incubar las placas a 30 °C por 48 h.

Soluciones.

Acetato de litio 1 M 10.2 g/100 mL

*PEG 3350 50.0 % (p/v) 50 mL/100 mL

⁺SS DNA 2 mg/mL 200 mg/100 mL

*Adicionar 50 mL a 30 mL de H₂O destilada. Solubilizar mediante calentamiento y aforar a 100 mL. Esterilizar por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 15 min). Almacenar evitando su evaporación.

⁺Disolver en 100 mL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) estéril con ayuda de un agitador magnético a 4 °C. Tomas varias horas disolver a homogeneidad.

Medios de selección del Y2H.

Base nitrogenada	1.7 g/L
Sulfato de amonio	5 g/L
Glucosa	20 g/L
-Leu/-Trp/SD ó -Leu/-Trp/-His/-Ade	0.6 g/L

Para la preparación de medio sólido se adiciona Agar al 2.0 % (p/v).

Esterilizar por autoclave (15 lb de presión, 121 °C por 20 min).

APÉNDICE

Artículos publicados

(i) *Near-neighbor interactions of the membrane-embedded subunits of the mitochondrial ATP synthase of a chlorophycean alga*

(ii) *Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae*

(iii) *Topología y función de las subunidades intrínsecas de la membrana de las F_1F_0 -ATP sintasa mitocondriales*



Near-neighbor interactions of the membrane-embedded subunits of the mitochondrial ATP synthase of a chlorophycean alga



Lorenzo Sánchez-Vásquez^a, Miriam Vázquez-Acevedo^a, Javier de la Mora^a, Félix Vega-deLuna^a, Pierre Cardol^b, Claire Remacle^b, Georges Dreyfus^a, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

^b Genetics and Physiology of Microalgae, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

F₁F₀-ATP synthase peripheral arm
Membrane domain of the ATP synthase
Chlorophycean algae
Chlamydomonas reinhardtii
Polytomella sp.
Asa subunits

ABSTRACT

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase of the chlorophycean algae *Polytomella* sp. can be isolated as a highly stable dimeric complex of 1600 kDa. It is composed of eight highly conserved orthodox subunits (α , β , γ , δ , ϵ , OSCP, a , and c) and nine subunits (Asa1–9) that are exclusive of chlorophycean algae. The Asa subunits replace those that build up the peripheral stalk and the dimerization domains of the ATP synthase in other organisms. Little is known about the disposition of subunits Asa6, Asa8 and Asa9, that are predicted to have transmembrane stretches and that along with subunit a and a ring of c -subunits, seem to constitute the membrane-embedded Fo domain of the algal ATP synthase. Here, we over-expressed and purified the three Asa hydrophobic subunits and explored their interactions *in vitro* using a combination of immunochemical techniques, affinity chromatography, and an *in vivo* yeast-two hybrid assays. The results obtained suggest the following interactions Asa6–Asa6, Asa6–Asa8, Asa6–Asa9, Asa8–Asa8 and Asa8–Asa9. Cross-linking experiments carried out with the intact enzyme corroborated some of these interactions. Based on these results, we propose a model of the disposition of these hydrophobic subunits in the membrane-embedded sector of the algal ATP synthase. We also propose based on sequence analysis and hydrophobicity plots, that the algal subunit a is atypical in as much it lacks the first transmembrane stretch, exhibiting only four hydrophobic, tilted alpha helices.

1. Introduction

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase (complex V) is a key component of oxidative phosphorylation. The oligomeric membrane complex exhibits two distinct domains: *i*) the F₀ sector, comprising a membrane-bound, proton-translocating unit formed by subunit a and an oligomer of c subunits, and a dimerization module formed by subunits A6L, e , f and g ; and *ii*) the F₁ extrinsic domain that comprises the catalytic core formed by 3 α and 3 β subunits, a central rotary shaft built by subunits γ , δ and ϵ , and a peripheral-stalk constructed by subunits OSCP, b , d and $F6$ (beef heart enzyme nomenclature) [1]. The enzyme is considered to work as a molecular rotary motor with stator and motor components that are driven by the electrochemical proton gradient. Proton translocation occurs through two offset channels shared by subunit a and the ring-shaped c -subunit oligomer. The c -ring rotates along with the central rotor stalk (subunits γ , δ and ϵ) which in turn rotates relative to the α_3/β_3 catalytic moiety in 120° stepped increments inducing three conformational states in the nucleotide-binding β -subunits, according to the Brownian ratchet mechanism, leading to

ATP synthesis [2,3]. Indeed, this was proven by direct visualization of the rotation of an actin filament attached to the γ subunit of bacterial F₁-ATPase [4].

In recent years, it has become evident that all mitochondrial ATP synthases exhibit a well-conserved basic core formed by subunits $\alpha_3/\beta_3/\gamma/\delta/\epsilon/c/a/OSCP$, but that different organisms contain atypical polypeptides in the peripheral stalk and/or in the dimerization modules. Thus, in ciliates [5], trypanosomatids [6], euglenoids [7], and chlorophycean algae [8], a variety of proteins seem to substitute the conventional b , d , $F6$, A6L, e , f and g subunits (beef heart enzyme nomenclature).

The mitochondrial F₁F₀-ATP synthase of chlorophycean algae can be isolated as a stable dimer of 1600 kDa after solubilizing mitochondria with detergents such as n-dodecyl- β -D-maltoside [9]. As in all known eukaryotes, the rotary and catalytic cores of the algal enzyme contain the eight conserved subunits mentioned above [10]. Nevertheless, nine non-conventional subunits (Asa1 to Asa9), unique to the mitochondrial ATP synthases of chlorophycean algae, are also constituents of the enzyme. Some Asa subunits form the robust peripheral

* Corresponding author at: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, Delegación Coyoacán, 04510, México D.F., Mexico.
E-mail address: dhalphen@ifc.unam.mx (D. González-Halphen).

stalk observed in several electron microscopy studies of the isolated enzyme [11–15], while others (Asa6, Asa8 and Asa9) are predicted to be membrane-embedded and may contribute to the dimerization and oligomerization of the enzyme [16–18].

The neighboring interactions of the extrinsic Asa subunits of the peripheral arm of the algal ATP synthase have been characterized in the past [8,13,16,19,20]. Partial dissociation of the enzyme upon a time course of heat treatment allowed the identification of a subcomplex Asa1/Asa3/Asa5/Asa8/a/c that contained the hydrophobic subunits *a* (with five putative hydrophobic alpha-helices), *c* (with two transmembrane stretches or TMS), and Asa8 (with one TMS) [8]. This result suggested that the membrane-embedded polypeptides could be in close contact with membrane-extrinsic components of the peripheral stalk including the Asa1, Asa3 and Asa5 subunits. In addition, treatment with relatively high concentrations of the detergent taurodeoxycholate induced monomerization of the enzyme along with a partial loss of the Asa6 and Asa9 subunits [17]. Also, cross-linking experiments carried out with the dimeric enzyme, revealed a possible Asa6–Asa6 interaction, suggesting an important role of this membrane-embedded subunit in stabilizing the dimeric algal ATP synthase [13]. Nevertheless, other than their strong hydrophobic character, little is known about the membrane-bound subunits Asa6, Asa8 and Asa9. In this study, we over-expressed and purified these hydrophobic subunits and explored their interactions using a combination of techniques.

2. Materials and methods

2.1. Algal strain and growth conditions

Polytomella sp. (strain number 198.80, Culture Collection of Algae at the University of Göttingen), identical to *Polytomella parva*, was grown as previously detailed [20].

2.2. *Polytomella* ATP synthase purification

The algal mitochondrial ATP synthase was purified according to a previously described procedure [8] carrying out all steps at 4 °C. Briefly, *Polytomella* sp. cells centrifuged at 2000 × *g* for 5 min and resuspended in SPT buffer (0.3 M sucrose, 4 mM sodium EDTA, 20 mM Tris, pH 7.2) were mechanically broken with a Potter homogenizer with five to six gentle manual strokes of the teflon-pestle. The broken cells were centrifuged at 1000 × *g* for 10 min and the resulting supernatant saved (S1). The pellet was subjected to a second round of cell lysis and the sample was treated as described above. The S1 and S2 were mixed and centrifuged at 17,000 × *g* for 10 min. The protein concentration of the resuspended mitochondrial pellet was estimated and then diluted to a final concentration of 10 mg of protein/mL adding drop by drop a buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 µg/mL tosyl-lysyl-chloromethylketone (TLCK), 100 mM NaCl, N-dodecyl-β-maltoside (added from a 10 mg/mL stock solution) until a final ratio (w/w) of 2 mg of detergent/mg of protein was reached. Then, the mixture was incubated with gentle stirring for 30 min and centrifuged at 90,000 × *g* for 20 min. The supernatant was recovered and dialyzed for two hours against 2 L of 50 mM Tris (pH 8.0) and 1 mM MgSO₄. The dialyzed sample was loaded onto a DEAE-Biogel A column equilibrated with 50 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgSO₄, 0.1 mg/mL of n-dodecyl-β-maltoside, 1 mM PMSF and 50 µg/mL TLCK (TMT buffer) and then eluted with a linear 0–125 mM NaCl gradient in the same buffer. The resulting fractions of the gradient were analyzed by Tricine SDS-PAGE and the ones enriched in *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase were collected and concentrated by ultrafiltration. Finally, this sample was loaded onto a discontinuous 15–50% glycerol gradient containing 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM sodium EDTA, 1 mM ATP and 0.1 mg/mL of n-dodecyl-β-maltoside, and centrifuged at 40,000 × *g* for 17 h. Fractions containing mitochondrial ATP synthase were identified,

pooled, and frozen at –70 °C until used. When the algal ATP synthase was purified for cross-linking assays, in order to avoid quenching of the chemical agents by Tris, the 15–50% glycerol gradient centrifugation step was carried out in the presence of the following buffer: 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM sodium EDTA, 1 mM ATP, 0.1 mg/mL n-dodecyl β-maltoside, 1 mM PMSF, and 50 µg/mL TLCK.

2.3. Protein analysis

SDS-denaturing gel electrophoresis was carried out in a Tricine-SDS-PAGE system [21] using 14.0% acrylamide or 12.5 to 18.0% acrylamide gradients. Protein concentrations were estimated as reported previously [22].

Cross-linking experiments were carried out with the water-insoluble, homo-bifunctional, non-cleavable and cleavable reagents disuccinimidyl suberate (DSS, Pierce, space arm 11.4 Å) and dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP, Pierce, space arm 12.0 Å), and the water-soluble analogs bis[sulfosuccinimidyl] suberate (BS³, Pierce, space arm 11.4 Å) and 3,3'-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate] (DTSSP, Pierce, space arm 12.0 Å). The purified algal enzymatic complex obtained in HEPES buffer (at 2.5 mg of protein/mL) was incubated independently in the presence of 0.5 mM of each cross-linker for 60 min at 4 °C. Reactions were stopped by the addition of 1.0 M Tris pH 7.5 at a final concentration of 50 mM Tris and incubated for 15 min at room temperature with vigorous agitation. The corresponding samples were subjected to Tricine-SDS-PAGE followed by silver staining or electrotransferred to nitrocellulose membranes and decorated with several specific anti-Asa antibodies. The molecular weights of the cross-linked products were estimated by interpolating their electrophoretic mobilities in a graph of the logarithmic molecular masses versus the electrophoretic mobility of the subunits of the *Polytomella* ATP synthase.

2.4. Cloning of the cDNAs encoding subunits of the algal ATP synthase in expression vectors

The cDNAs of subunits *a* (Atp6), *c* (Atp9), Asa6, Asa8 and Asa9 were PCR-amplified from a *Polytomella* sp. cDNA library cloned in λ-ZapII phages [23] using specific oligonucleotide primers: for subunit *a*, forward 5'-CCGCATATGTCCAGTGTAGGGATGTAAAGACTGGCAGC-3' and reverse 5'-CGCGGATCCTTAATGGATCTTCTTAACAATCTTAGC-3'; for subunit *c*, forward 5'-CGCCATATGATGTCTGTCCAGAGGCTTCTCTC-3' and reverse 5'-CGCGGATCCTTAAGCGAAGAGGATAAGGAAAAC-3'; for Asa6, forward 5'-CGCCATATGGAAGGCAACTCTGTTGCTGGCA-TTATT-3' and reverse 5'-CGCGGATCCTTAAAGGCTGATGGGCTGAAG-GT-3'; for Asa8, forward 5'-CGCCATATGGTCTCGGTGAGGTCTACCT-TAAG-3' and reverse 5'-CGCGGATCCTTAGTGACCACCAGCAGTGTAA-GG-3'; for Asa9 forward 5'-CCGCATATGGCTGTCACTAGTTTCTTGG-CAAG-3' and reverse 5'-CGCGGATCCTTAGTTGGACTTCTTCCACTCCT-T-3'. The amplification products of subunits *a* and *c* were cloned into yeast two-hybrid vectors using the restriction sites NdeI and BamHI, and those corresponding to the Asa subunits were cloned independently into both a pET3a and a pET28a vector using the same restriction sites. The pET28a vector adds a hexa-histidine tag (6His-tag) to the N-terminus of the expressed recombinant protein (Asa6_{6His}, Asa8_{6His} and Asa9_{6His}), while the pET3a vector yields the untagged version.

2.5. Overexpression of recombinant proteins

Competent *Escherichia coli* C41 (DE3) cells were transformed with the construct of interest as previously reported [24]. Cells were grown in LB medium containing 50 µg/mL of kanamycin for the pET28a vector or 100 µg/mL of ampicillin for the pET3a vector. The overexpression conditions were as follows: one liter of culture media was inoculated with bacteria and incubated at 37 °C until an absorbance value of 0.8–1.0 at 600 nm was reached. Then, isopropyl β-D-1-thiogalactopyr-

anide (IPTG, Sigma-Aldrich Co.) was added to a final concentration of 0.1 mM, and the cultures expressing Asa6_{6His}, Asa8_{6His} and Asa9_{6His} were grown for 6 h at 37 °C, while the untagged subunits were grown for 6 h at 30 °C for Asa6 and 37 °C for Asa8 and Asa9. The over-expressed polypeptides correspond to the mature version of the subunits Asa6 (GenBank: GU112182.1), Asa8 (GenBank: GQ443453.1), and Asa9 (GenBank: BK006898.1), or the mature histidine-tagged version of each subunit (Asa6_{6His}, Asa8_{6His} and Asa9_{6His}). All cultures were collected by centrifugation at 7000g for 15 min and cell pellets stored at –70 °C until used.

2.6. Isolation of inclusion bodies and purification of recombinant proteins

All steps were carried out at 4 °C except when indicated. Bacterial inclusion bodies (ICBs), retaining the overexpressed recombinant proteins, were isolated from the thawed pellet by resuspension in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 5.0% glycerol, 0.1 mM NaCl, 0.1 mM DTT, pH 7.9) and sonicated (Branson-250 sonifier) at 60.0% power for 4–6 intervals of 30 s each followed by cooling for 1 min on ice, and then washed with detergent as described [25]. The ICBs were solubilized in modified PBS buffer (20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 5.0% glycerol, pH 7.9) containing 1.0% Triton X-100 and 8.0 M urea with mild agitation during 18 h. The insoluble material was removed by centrifugation at 15,000g for 20 min. The resulting supernatant was diluted with the modified PBS buffer to a final concentration of 4.0 M urea; imidazole was added to a final concentration of 30 mM from a 0.5 M stock solution. Then, the sample was loaded on a 5 mL His-TrapFF column (GE Healthcare Life Sciences) equilibrated with the modified PBS buffer. The column was washed with 30 mM imidazole and the proteins were eluted with a 30–500 mM imidazole linear gradient in the same buffer. The fractions obtained from the elution were analyzed by Tricine-SDS-PAGE and Western blots, and those enriched with the recombinant protein of interest were pooled, concentrated and stored at –70 °C until use.

2.7. Antibody production and immunoblotting

To generate antibodies against the histidine-tagged subunits, the recombinant polypeptides of the algal ATP synthase were resolved by Tricine-SDS-PAGE (14.0% acrylamide) in the presence of Serva Blue G (SERVA Electrophoresis GmbH) as previously described [26]. Hist-tagged recombinant subunits of interest were excised from the gels and ground in a mortar in the presence of 20 mM Tris (pH 7.0) and used to immunize rabbits as described [27]. Western blot analysis [28] was used to ascertain the presence of antibodies in each serum. For Western blots, nitrocellulose membranes were washed, blocked, and incubated with the antibody raised against the corresponding 6His-tagged protein. An alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich Co.) was used as secondary antibody (1:10,000 dilution incubated for 2.0 h). Protein colorimetric detection was carried out with nitro tetrazolium blue chloride (NBT, Sigma-Aldrich Co.) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt (BCIP, Sigma-Aldrich Co.). Western blot images were captured in an HP Scanjet G4050.

2.8. Protein-protein interactions assayed by Far-Western analysis

Far-Westerns were carried out as described [29]. The histidine-tagged purified protein of interest was subjected to Tricine-SDS-PAGE in 14.0% acrylamide gels and then transferred to nitrocellulose membranes. The lanes containing the recombinant Asa subunit were blocked overnight with 3.0% gelatin suspended in TBS buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5), and then incubated for 4.0 h in the presence of the externally-added protein of interest (Asa6_{6His}, Asa8_{6His} or Asa9_{6His}) in increasing concentrations (from 0 to 5 nmoles in 5 mL) in TTBS buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) supplemented with 1.0% of gelatin. The membranes were

washed two times with the same buffer. The interacting protein of interest was recognized using a specific antibody incubated in TTBS buffer, followed by an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody in the same buffer. Finally, the membrane was immunochemically stained with antibodies as described above for Western blot analysis [28].

2.9. Protein-protein interactions assayed by affinity chromatography

All procedures were carried out at 4 °C unless otherwise stated. Experiments were carried out with the ICBs (1 L of bacterial culture) of the histidine-tagged proteins (Asa6_{6His}, Asa8_{6His} or Asa9_{6His}) and the corresponding recombinant polypeptides lacking the 6His-tag, previously washed with detergent and solubilized with 8.0 M urea. Each of the soluble fractions was recovered by centrifugation at 15,000g for 20 min. The resulting supernatants were dialyzed using a Spectra Pore membrane (cutoff 3.5–5.0 kDa) against 2 L of renaturing buffer during 36 h (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 5.0% glycerol, 0.5% Triton X-100, pH 7.9), replacing the buffer solution two times, and centrifuged at 15,000 g for 20 min to remove insoluble material. Subsequently, imidazole (0.5 M stock solution) was added to the His-tag subunits to a final concentration of 30 mM. Firstly, each sample was loaded separately onto a 1 mL His-TrapFF column (GE Healthcare Life Sciences) previously equilibrated with renaturing buffer, and washed with 30 mM imidazole. Secondly, each soluble dialyzed fraction containing the recombinant untagged protein was loaded onto the affinity column where one of the histidine-tagged subunits was bound. Afterwards, an imidazole gradient from 30 to 500 mM was applied in order to elute all the proteins that remained bound to the column. The fractions obtained from the elution were analyzed by Tricine-SDS-PAGE (14.0% acrylamide), and then transferred to a nitrocellulose membrane. The protein elution profiles were analyzed by Western blotting using specific antibodies. As a control of the interaction assay, each one of the samples containing the untagged polypeptide was separately loaded onto the His-Trap column, in order to assess any possible unspecific binding of the recombinant protein to the affinity column. When both the histidine-tagged and the untagged proteins were found to co-elute, a positive interaction was considered.

2.10. Protein-protein interactions assayed by the yeast-two hybrid assay

The yeast-two hybrid assay (Y2H) employed was the MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech Laboratories Inc.) and all procedures followed manufacturer protocols. Yeast strain AH109 (*MAT α* , *trp1-109*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL1_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) was co-transformed by the lithium acetate method [30] with all possible combinations of the sequences encoding the mature version of the *a* (GenBank: CBK55668.1), *c* (GenBank: ADE92942.1), Asa6, Asa8 and Asa9 subunits. This mini-library was used to screen protein-protein interactions *in vivo*; the reporters *ADE2* and *HIS3* under the control of the *GAL4* upstream activating sequences (UASs) and TATA boxes given by the commercial screening system were used in order to eliminate false positives. While the *ADE2* reporter provides strong nutrition selection, *HIS3* reduces false positive incidences. Vector pGBKT7 expressing proteins were fused with amino acids 1–147 of the GAL4 DNA binding domain (BD); and pGADT7 expressing proteins were fused with amino acids 768–881 of the GAL4 activation domain (AD). Besides, Murine p53 (BD) and SV 40 large T-antigen (AD), provided by the kit manufacturer, were used as a positive control, combination of empty pGBKT7 and pGADT7 vectors were used as a negative control. Plasmids pGBKT7 and pGADT7, encoding the *a*, *c*, Asa6, Asa8 and Asa9 subunits genes fused in frame with GAL4 BD and AD respectively, were constructed by inserting PCR-generated fragments into the NdeI and BamHI restriction sites of the respective pGBKT7 and pGADT7 plasmids. The transformants were assayed on SD/-Trp/-Leu selective, SD/-Leu/-Trp/-His low stringency

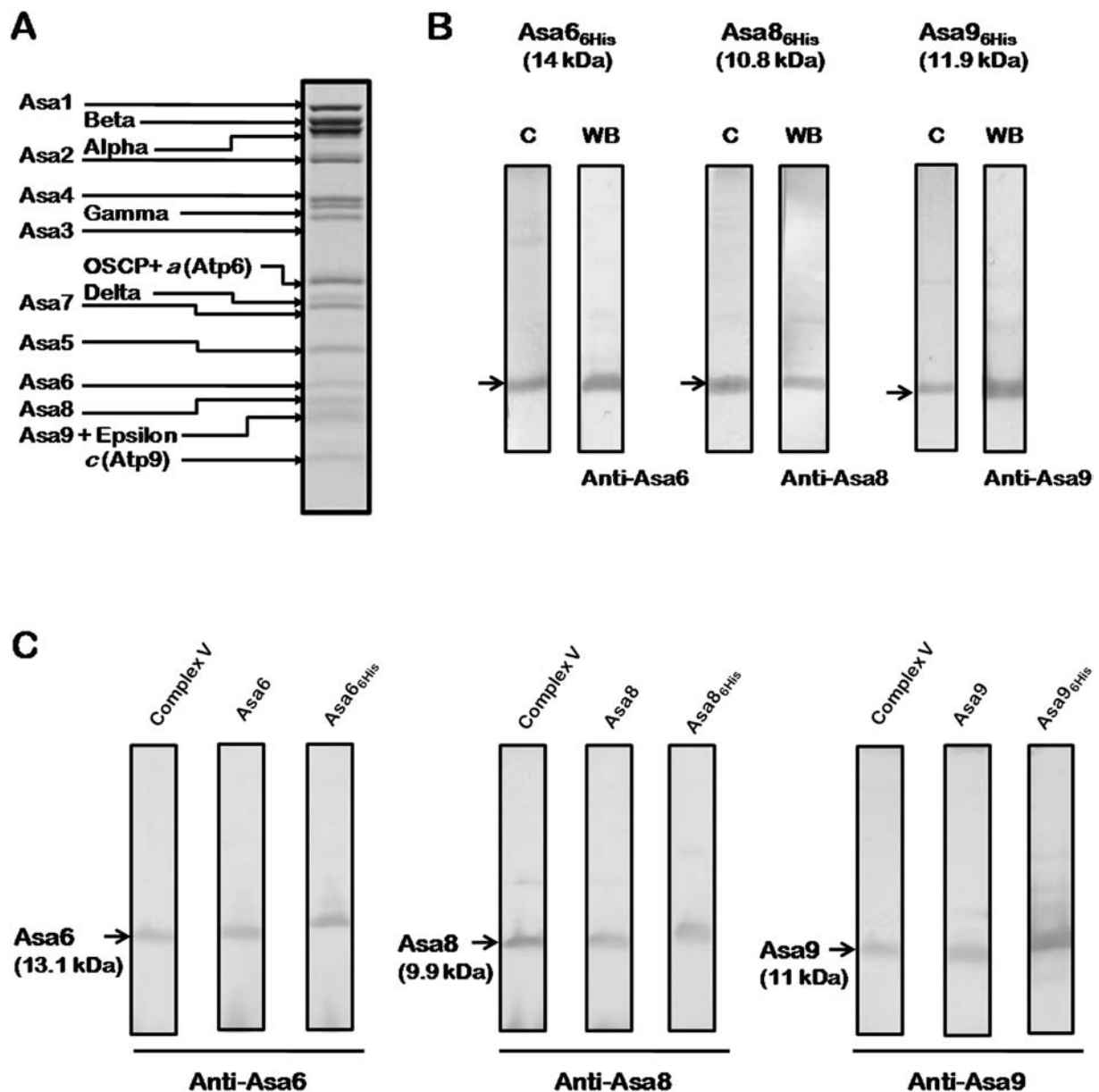


Fig. 1. Native enzyme and recombinant subunits used in this work. *Panel A.* Coomassie-stained polypeptide composition of the *Polytomella* ATP synthase complex (50 μ g) after Tricine-SDS-PAGE. The identity of each polypeptide band is indicated. *Panel B.* Left lanes (labeled C): SDS-PAGE and Coomassie Blue staining of independent gels with 50 μ g of protein per lane of the purified histidine-tagged Asa6, Asa8 and Asa9 subunits (indicated by arrows). Right lanes (labeled WB): Western blots of the recombinant proteins (30 μ g of each protein) decorated with their corresponding specific antibody. *Panel C.* Western-blots of the algal enzyme (Complex V, left lanes); recombinant untagged proteins (Asa6, Asa8 and Asa9 subunits, middle lanes) and histidine-tagged recombinant proteins (Asa6_{6His}, Asa8_{6His}, Asa9_{6His}, right lanes) decorated with the indicated specific antibodies.

and SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade high stringency media (Clontech Laboratories Inc.). The growth of yeast subjected to each interaction assay was compared to the controls through serial dilutions (1:10–1:10,000 dilutions), in order to obtain single cell colonies. Cell growth in at least the low stringency media suggested protein-protein interactions.

2.11. Protein structure prediction

Sequences used in the alignment analysis were obtained from TaxoBlast (https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/AlgoBLAST/algoBlast_mainpage.php) and carrying out a Blastp search in the database of Chlorophyceae (taxid: 3166) at NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hydropathy analyses for Asa1, Asa3 and Asa5 were performed with the program Membrane Protein Explorer (MPEx) (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>) considering the octanol scale under the guideline of the Wimley-White scale that describes the total energetics of transmem-

brane helix stability [31]. Hydropathy plots for subunit *a* of algal (*Polytomella*) and bacterial (*E. coli*) were performed using a window of 17-residues and the hydrophobicity scale specific for mitochondrial inner membrane proteins [32]. Coiled-coil domains were predicted with the online tool Marcoil (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil>) using the threshold 10.0 [33].

The structure of several *a* subunits have been revealed by cryo-microscopy or X-ray crystallography, those from *Bos taurus* [3], *Paracoccus denitrificans* [34], *Yarrowia lipolytica* [35] and *Pichia angusta* [36]. In the case of subunit *a* of *Polytomella parva*, no structural features could be assigned to the N-terminal region comprising the putative TMS [15,37]. For the hydrophobicity analysis, we considered two regions of subunit *a* (Atp6): one comprising the sequence from the N-terminus and the first transmembrane stretch (TMS) up to the beginning of the first hydrophobic, tilted alpha helix. The second region comprises the four tilted hydrophobic helices that surround the *c*-ring and form the proton

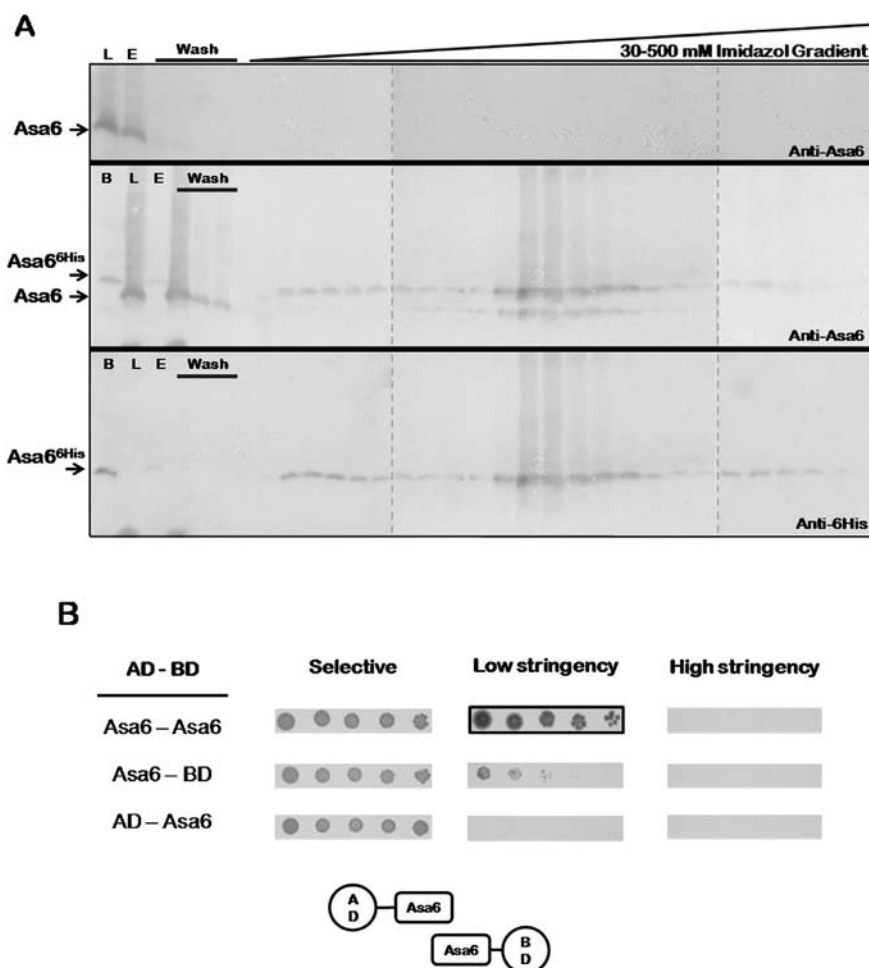


Fig. 2. Interaction of the Asa6 subunit with itself. *Panel A.* Interaction of the Asa6–Asa6_{6His} subunits assayed by affinity chromatography. Shown are the Western blots of the fractions obtained from the affinity column decorated with an anti-Asa6 antibody (upper and middle panels) or an anti-6His tag antibody (lower panel). The extract of the overexpressed Asa6 subunit was loaded on a 1 mL His-Trap column containing no bound protein (upper blot) or bound Asa6_{6His} (middle and bottom blots). Lane B: histidine-tagged subunit bound to the column. Lane L: untagged sample loaded on the column. Lane E: tagged-protein fraction excluded from the column. Wash: protein fractions excluded after washing with 30 mM imidazole. Fractions under the triangle at right: recombinant subunits that eluted from the affinity columns upon application of a 30–500 mM imidazole gradient. Dashed lines separate individual blot images used to assemble the panels. *Panel B.* *In vivo* Asa6–Asa6 interaction assay using Y2H. Subunits expressed from the activation domain (AD) or the binding domain (BD) is indicated. Second to fourth columns show yeast growth on solid media and the yeast growth medium used in each assay: selective (-Leu/-Trp), low stringency (-Leu/-Trp/-His) and high stringency (-Leu/-Trp/-His/-Ade). A graphic representation of the assay is shown at the bottom.

hemi-channels of subunit *a*. We analyzed these two regions separately comparing the average hydrophobicity against the maximal average hydrophobicity in a 17 residues window [38]. We used the hydrophobicity scale deduced from positions of each residue in a transmembrane peptide [32]. The lengths of the segments analyzed were 62 in *Bos taurus* (YP_209210.1), 89 in *Saccharomyces cerevisiae* (NP_009313.1), 85 in *Yarrowia lipolytica* (NP_075433.2), 91 in *Pichia angusta* (5LQX_Y) and 85 in *Paracoccus denitrificans* (5DN6_X). For other sequences from algae and plants, we carried out multiple sequence alignments using ClustalW. Looking for the beginning of the first horizontal alpha helix, we found the N-terminus containing the first transmembrane spanning region. For the analysis we considered the first 190 aa from *Hordeum vulgare* (BAV58098.1), 78 aa from *Ulva prolifera* (YP_009183719.1), 128 aa from *Helianthus annuus* (YP_008999577.1), 210 aa from *Arabidopsis thaliana* (NP_085503.1), 239 aa from *Zea mays* 1 (CAA77868.1), 220 aa from *Zea mays* 2 (ACZ65558.1), 79 aa from *Chlorella sorokiniana* (YP_009049975.1), 125 aa from *Tetrademus obliquus* (AAF72060.1) and 115 aa from *Bractea-coccus aerius* (YP_009054588.1). For the nucleus-encoded *a* subunits, which contain mitochondrial targeting sequences (MTS), the sequences of the mature proteins were considered. The N-terminus of subunit *a* from *Polytomella parva* and *Chlamydomonas reinhardtii* was previously

obtained by Edman degradation [8,9] and it was established that these subunits contain MTS of 94 and 107 residues, respectively. Thus, the fragments analyzed correspond to residues 95 to 142 of *Polytomella parva* (CBK55668.1), residues 108 to 155 of *Chlamydomonas reinhardtii* (AAN70986.1), 92 to 139 from *Gonium pectorale* (KXZ48726.1), 106 to 153 from *Volvox carteri* (XP_002956659.1), 101 to 148 from *Haematococcus pluvialis* (NCBI GEO accession number GSE71986) and 110 to 157 from *Dunaliella tertiolecta* (https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/AlgoBLAST/algoBlast_mainpage.php).

3. Results

3.1. Over-expression and purification of recombinant Asa subunits

The main objective of this work was to obtain insights on the topological vicinity of the membrane-embedded subunits of the *Polytomella* ATP synthase. To develop our experimental strategy, it was required to obtain the corresponding Asa6, Asa8 and Asa9 recombinant proteins. On account of its hydrophobic nature, over expression of the membrane-embedded Asa recombinant subunits were besieged by several problems, most probably related to aggregation and cytotoxicity [39]. In the early stages of this work, in order to enhance

the limited overproduction of the Asa proteins, several *E. coli* strains were tested: BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLyss, Origami (DE3), Rosetta (DE3), and Tuner (DE3). The recombinant subunits used in this work were produced in reasonable yields only with the *E. coli* C41 (DE3) strain, which was previously found to be suitable for membrane-protein overexpression [40].

Fig. 1A shows the Coomassie blue-stained polypeptide pattern after SDS-PAGE of the algal ATP synthase used in this work. Both the purified recombinant hexa-histidine tagged proteins and the crude extracts of the untagged versions of subunits Asa6, Asa8 and Asa9 (Fig. 1B and C), were also subjected to SDS-PAGE. All recombinant subunits exhibit a single, main polypeptide, although discrete bands that may represent either dimeric forms or small amounts of bacterial protein contamination were observed in some preparations. Antibodies raised against the Asa6_{6His}, Asa8_{6His} and Asa9_{6His} subunits recognized both the untagged and tagged recombinant proteins as well as the native subunits of the ATP synthase (Fig. 1C).

3.2. On the interaction of Asa6 with itself

Previous work suggested that Asa6 could have an important role in the dimerization of the algal mitochondrial ATP synthase. To explore the interaction of Asa6 with itself, the recombinant Asa6 protein containing a 6His-tag was bound to a His-Trap nickel column. Then, the untagged Asa6 recombinant protein was loaded on the column and washed with 30 mM imidazole. A second identical column, containing only the nickel matrix with no protein bound to it, was also loaded with the untagged Asa6 protein and run in parallel. This second column served to discard the presence of any spurious interaction of the untagged Asa6 with the nickel matrix. While Asa6 readily eluted in the first fractions of the column lacking bound Asa6_{6His} (Fig. 2A, upper panel), the untagged Asa6 was retained in the column containing the Asa6_{6His} version. A 30 to 500 mM imidazole gradient, released both the tagged and the untagged versions of the Asa6 recombinant protein (Fig. 2A, middle and lower panels). The tagged and untagged versions of the Asa6 subunit could be distinguished by their different migration in SDS-PAGE, and also by Western Blot analysis. While the anti-Asa6 antibody reacted against both polypeptides (Fig. 2A, middle panel), the anti-His tag antibody recognized only the hexa-histidine tagged version of Asa6 (Fig. 2A, lower panel).

An Asa6–Asa6 interaction was also assayed by the yeast-two hybrid (Y2H) assay. A more robust growth of yeast expressing the Asa6–Asa6 construct also suggested a possible Asa6 interaction with itself in this *in vivo* system (Fig. 2B).

3.3. On Asa6–Asa9 and Asa8–Asa9 interactions

A His-Trap nickel column containing the recombinant Asa9_{6His} protein was used to assay the binding of Asa6 and Asa8. Crude extracts containing the untagged Asa6 or the untagged Asa8 proteins were independently loaded on parallel columns with no protein bound to it (Fig. 3A and B, upper panels) or with bound recombinant subunit Asa9_{6His} (Fig. 3A and B, middle and lower panels). The Asa6 and the Asa8 subunits were only retained in the column containing the bound Asa9_{6His} protein and co-eluted from the columns only upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. The presence of the proteins was assayed by immunoblots, using antibodies specifically directed against each polypeptide. The Y2H assay also suggested a mild Asa8–Asa9 interaction (Fig. 3C) but provided a negative result for an Asa6–Asa9 interaction (data not shown). Far-Western blotting was also used to explore the Asa8_{6His}–Asa9_{6His} interaction. Several lanes of nitrocellulose membrane containing the same concentration of the Asa9_{6His} subunit were incubated with increasing concentrations of the isolated, recombinant Asa8_{6His} subunit and subsequently decorated with an anti-Asa8 antibody (Fig. 3D). At increasing concentrations of the externally added, recombinant Asa8_{6His}, a stronger immuno-decoration of the

Asa9_{6His} subunit was observed, also indicating an Asa8–Asa9 interaction.

3.4. Asa9 does not seem to form dimers

A His-Trap nickel column containing the Asa9_{6His} recombinant protein was also used to assay the binding of Asa9 itself. Following the same affinity column assay described above, the untagged Asa9 eluted in the exclusion volume of the columns notwithstanding whether the tagged Asa9 subunit was bound to the nickel matrix or not. This result suggested that there is probably no Asa9–Asa9 interaction (Supplementary Fig. 1). The Y2H assay also provided a negative result for an Asa9–Asa9 interaction, since all the results obtained were similar to the controls (data not shown).

3.5. On the interaction of Asa8 with itself

A His-Trap nickel column containing the Asa8_{6His} recombinant protein was used to assay the binding of the untagged Asa8 subunit. Following the affinity column assay described above, both the untagged Asa8 and the Asa8_{6His} subunits co-eluted from the column in the presence of a 30 to 500 mM imidazole gradient (Fig. 4A, middle and lower panels). Western blot analysis of the proteins present in the elution profile provided evidence for an Asa8–Asa8 interaction. In contrast, the Y2H assay exhibited no differences with the controls, and thus failed to reveal this interaction (data not shown).

3.6. On Asa6–Asa8 interaction

A His-Trap nickel column containing the recombinant Asa8_{6His} protein was also used to assay the binding of Asa6. Crude extracts containing the untagged Asa6 protein were independently loaded on parallel columns with no protein bound to it (Fig. 4B, upper panel) or with bound recombinant subunit Asa8_{6His} (Fig. 4B, middle and lower panels). The Asa6 subunit was only retained in the column containing the bound Asa8_{6His} protein and co-eluted from the column only upon application of a 30 to 500 mM imidazole gradient. The presence of the proteins was assayed by immunoblots, using antibodies specifically directed against each polypeptide. The Y2H assay failed to detect a Asa6–Asa8 interaction (not shown).

3.7. Cross-linking assays

In order to verify the close-neighbor relationships of the subunits of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* inferred in this work, we carried out cross-linking experiments with the intact algal enzyme using several non-cleavable and cleavable bifunctional reagents. The cross-linked products were analyzed by Tricine-SDS-PAGE followed by Western blots. The identified cross-linked products in the algal ATP synthase using non-cleavable agents are shown in Fig. 5. Cross-linked products were identified by their apparent molecular masses and because they were recognized by two different antibodies: Asa1–Asa8, Asa3–Asa8, Asa5–Asa8, Asa6–Asa8 and Asa8–Asa9. Similar results were obtained with the cleavable reagents, as shown in Supplementary Fig. 2.

4. Discussion

In canonical ATP synthases, the membrane-bound F₀ subcomplex contains the well-conserved subunits *a*, *b*, and the ring-shaped *c*-oligomer [41]. For instance, in *E. coli*, the polypeptide composition of the membrane domain comprises the *a*₁, *b*₂ and *c*₁₀ subunits (stoichiometry indicated by sub-indexes) [42]. Subunits *a*₁, *b*₁, *c*₁₀, *d*₁, *e*₁, *f*₁ and *g*₁ are common to the yeast and mammalian enzyme [43], while subunits *h*, *i* (also called *j*) and *k* are only found in yeast [44–46]. Subunits F₆, 8 or A₆L, AGP or DAPIT, MLQ [43,47], FactorB and the

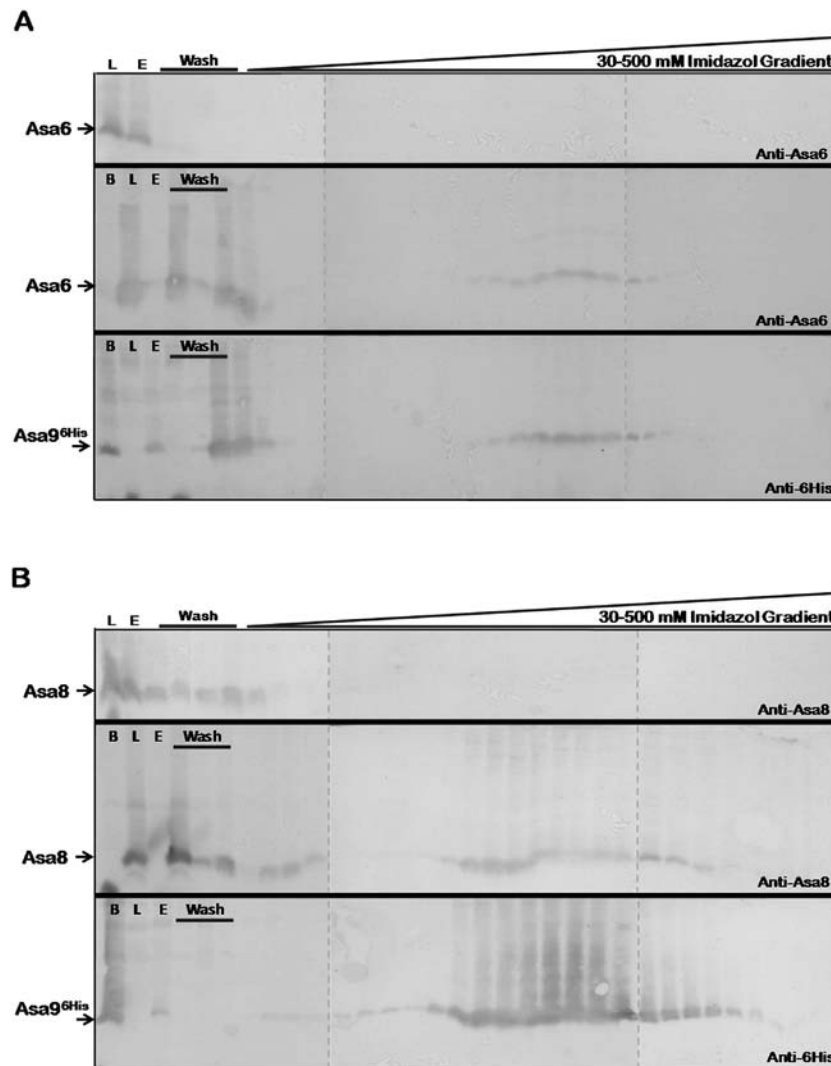


Fig. 3. Interactions of the recombinant Asa9 subunit with Asa6 and Asa8. *Panel A.* Asa6–Asa9_{6His} interaction assayed by affinity chromatography. Shown are the Western blots of the fractions obtained from the affinity column decorated with an anti-Asa6 antibody (upper and middle panels) or an anti-6His tag antibody (lower panel). The extract of the overexpressed Asa6 subunit was loaded on a 1 mL His-Trap column containing no bound protein (upper blot) or bound Asa9_{6His} (middle and bottom blots). Lane B: histidine-tagged subunit bound to the column. Lane L: untagged sample loaded on the column. Lane E: tagged-protein fraction excluded from the column. Wash: protein fractions excluded after washing with 30 mM imidazole. Fractions under the triangle at right: recombinant proteins that eluted from the affinity columns upon application of a 30–500 mM imidazole gradient. Dashed lines separate individual blot images used to assemble the shown image. *Panel B.* Interaction of the Asa8–Asa9_{6His} subunits assayed by affinity chromatography. Shown are the Western blots of the fractions obtained from the affinity column decorated with an anti-Asa8 antibody (upper and middle panels) or an anti-6His tag antibody (lower panel). The extract of the overexpressed Asa8 subunit was loaded on a 1 mL His-Trap column containing no bound protein (upper blot) or bound Asa9_{6His} (middle and bottom blots). Lane B: histidine-tagged subunit bound to the column. Lane L: untagged sample loaded on the column. Lane E: tagged-protein fraction excluded from the column. Fractions under the triangle at right: recombinant proteins that eluted from the affinity columns upon application of a 30–500 mM imidazole gradient. Dashed lines separate individual blot images used to assemble the shown image. *Panel C.* *In vivo* Asa8–Asa9 Y2H interaction assay. Subunits expressed from the activation domain (AD) or the binding domain (BD) is indicated. Second to fourth columns shows yeast growth on solid media and growth medium used in each assay: selective (-Leu/-Trp), low stringency (-Leu/-Trp/-His) and high stringency (-Leu/-Trp/-His/-Ade) and. A graphic representation of the assay is shown at the bottom. *Panel D.* Interaction of Asa8 and Asa9 subunits assayed by Far-Western blots. Two lanes at left: Western-blot of the purified histidine-tagged Asa8 and Asa9 subunits (lanes labeled WB), one nanomole of each protein was independently transferred and decorated with their respective antibody. Lanes under the triangle at right: Far-Western analysis of the recombinant Asa9_{6His} (1 nanomole per lane) incubated for 4 h with increasing amounts of recombinant Asa8_{6His} protein (the indicated nanomoles of protein in a 5 mL final volume) and then decorated with an anti-Asa8 antibody.

protein TMEM70 are exclusive of bovine [48]. All these subunits are called supernumerary because they have no known roles in the direct generation of ATP, but some of them have been found to contribute to the oligomerization of the enzyme and thus to the formation of mitochondrial cristae [49–51]. In contrast, the membrane-embedded domain of the algal enzyme has been poorly characterized and seems to be composed, besides subunit *a* and the *c*-ring, by the small molecular mass polypeptides Asa6, Asa8 and Asa9. Secondary structure and hydropathy analyses have led to propose that subunit Asa6 may contain either two TMS or one reentrant helix and one TMS, while Asa8 and Asa9 would exhibit one TMS each (Supplementary Fig. 3) [52].

In chlorophycean algae like *Polytomella parva* subunits Asa1 to Asa9 are the constituents of both the peripheral stalk and the dimerization domain of the F₁F₀-ATP synthase [18]; a recent electron microscopy analysis supports this idea [15]. Previous studies have addressed the arrangement of the Asa subunits in the peripheral stalk of the *Polytomella* ATP synthase. The Asa2, Asa4 and Asa7 are able to associate into a stable subcomplex with a 1:1:1 stoichiometry when their recombinant versions are mixed together. This subcomplex seems to somehow reinforce contacts between the Asa1 and OSCP subunits [19,20]. A subcomplex formed by subunits Asa1, Asa3, Asa5, Asa8, *a* and the *c*-ring has been previously characterized [8,52]; it is the only

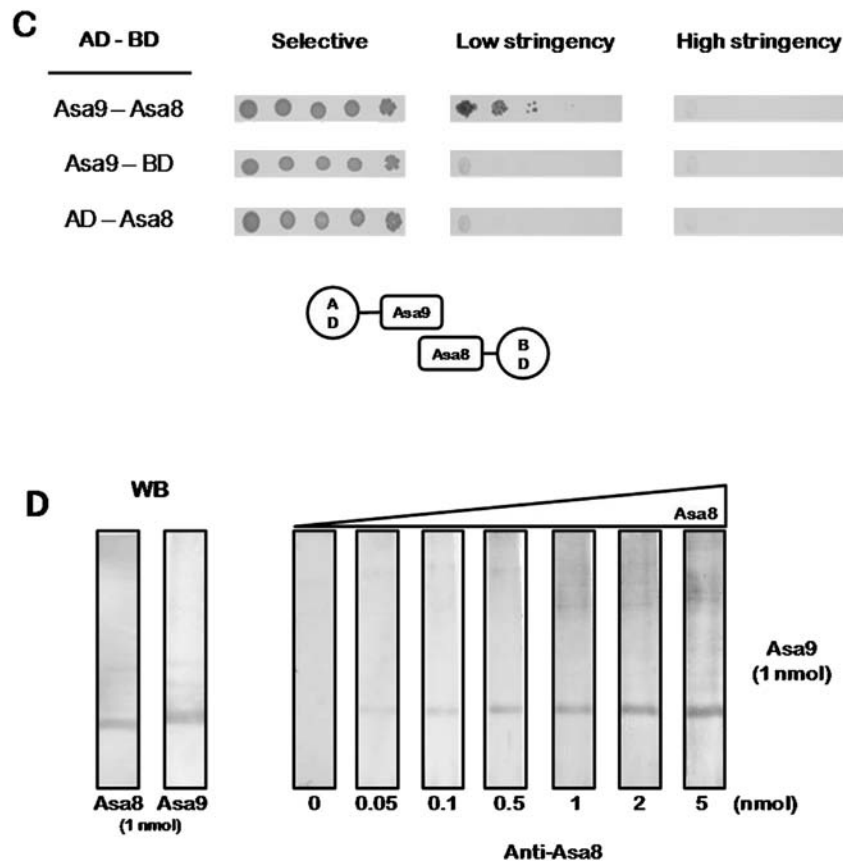


Fig. 3. (continued)

subcomplex that seems to contain both intrinsic and extrinsic membrane proteins. Since Asa1 seems to interact with membrane-bound subunits, in particular with the Asa8 subunit, it was suggested that Asa1 may be the main support of the peripheral stalk, reaching from a region close to the membrane all the way up to OSCP, and thus playing a scaffolding role similar to the one of subunit *b* in orthodox enzymes [20]. Sequence analysis of Asa1 reveals two regions (N₃₀₈–L₃₂₆ and L₅₂₀–I₅₃₈) with propensity to interact with hydrophobic surfaces probably via amphipathic stretches (Supplementary Fig. 4A). Also, the V₁₀₃–F₁₂₁, L₁₇₇–L₁₉₅ and T₂₆₀–I₂₇₈ residues of Asa3 (Supplementary Fig. 4B) and both the amino terminus (V₁₇–M₃₅) and carboxy terminus (A₁₀₅–F₁₂₃) of Asa5 exhibit this feature (Supplementary Fig. 4C).

Subunits Asa6, Asa8 and Asa9 are well represented in chlorophyte algae and their sequences exhibit high similarity as revealed by multiple sequence alignments (Supplementary Fig. 5). Subunits Asa6, Asa8 and Asa9 are predicted to be membrane bound, nevertheless, little is known about their arrangement in the hydrophobic domain of the enzyme. In Asa6, a possible coiled-coil could be involved in the dimerization of the ATP synthase [16] (Supplementary Table 1). Subunit Asa8 possesses a GxxxG motif, also present in the single TMS of the yeast *e* and *g* subunits that seems to play an important role in the dimerization of the enzyme [50,53].

This work provides a more detailed biochemical characterization of the Asa subunits associated to the membrane domain of the peripheral stalk of the algal ATP synthase, whose highly hydrophobic nature had limited their study in the past. Due to their inherent hydrophobic nature, over expression of membrane proteins is not straightforward and often results in the accumulation of aggregated miss-folded products or inclusion bodies (ICBs) [54]. One of the main difficulties in working with membrane proteins is to find conditions that favor refolding over aggregation [55], but there are several reports of refolding of membrane proteins recovered from inclusion bodies [56–58]. In our case, renaturing by dialysis in refolding buffer allowed

us to recover the solubilized protein with a very low percentage of aggregated forms. This insoluble problem was addressed by screening commonly used detergents and choosing the best option on the basis of solubility [59], further considering the ionic strength and pH. To gain insight into the interactions established by these membrane-bound subunits, three different approaches employing recombinant proteins were followed, e. g. Far-Western analysis, affinity chromatography and a Y2H assay. Most of the interactions observed were obtained with the affinity method, proving to be a classical but robust technique. Since enough detergent was present in the buffers used for these affinity assays, we believe we are observing real protein-protein interactions, not mere hydrophobic mediated aggregation. This was further substantiated by failure to observe recognition of Asa9 towards itself (Supplementary Fig. 1). By contrast, only Far-Western analyses suggested an Asa8–Asa9 interaction (Fig. 3D), while the two-hybrid system suggested Asa6–Asa6 and Asa8–Asa9 interactions (Figs. 2B and 3C respectively) and Asa6-*a* (Supplementary Fig. 6B), in addition to the well-known interaction of subunit *a* with subunit *c* (Supplementary Fig. 6A). Probably, the limitations of the last two methods are a consequence of the high hydrophobicity of membrane subunits, which tend to be insoluble and to aggregate, thus impairing the detection of protein interactions in overlay experiments and the activation of reporter genes in the Y2H assay [60].

The protein interaction assays suggest that Asa6 and Asa8 are independently capable of forming homodimers (Figs. 2A and 5), that there is an association Asa6–Asa9, and also a strong recognition Asa8–Asa9 (Fig. 3). Interaction couples Asa6–Asa6 and Asa6–Asa9, along with preceding results of detergent dissociation of the native complex and cross-linking experiments [13,17] support the idea that these subunits may be involved in the dimerization of the algal enzyme. Cross-linking experiments carried out on the purified, intact algal ATP synthase confirmed two of the interactions described in this work: Asa6–Asa8 and Asa6–Asa9. In addition, Asa8 was found to cross-link to

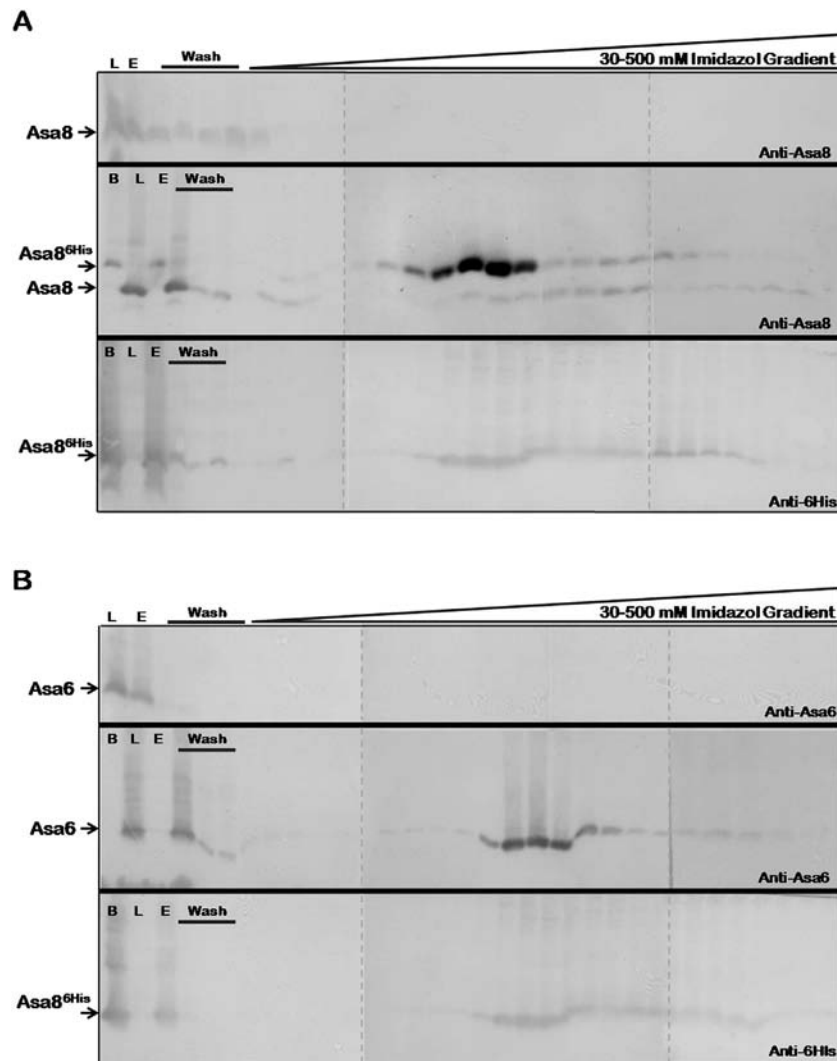


Fig. 4. The recombinant Asa8 subunit seems to interact with itself and with subunit Asa6 as judged by affinity chromatography. **Panel A.** Asa8–Asa8^{6His} protein interaction assayed by affinity chromatography. Shown are the Western blots of the fractions obtained from the affinity column decorated with an anti-Asa8 antibody (upper and middle panels) or an anti-6His tag antibody (lower panel). The extract of the overexpressed Asa8 subunit was loaded on a 1 mL His-Trap column containing no bound protein (upper blot) or bound Asa8^{6His} (middle and bottom blots). Lane B: histidine-tagged subunit bound to the column. Lane L: untagged sample loaded on the column. Lane E: tagged-protein fraction excluded from the column. Wash: protein fractions excluded after washing with 30 mM imidazole. Fractions under the triangle at right: recombinant proteins that eluted from the affinity columns upon application of a 30–500 mM imidazole gradient. Dashed lines separate individual blot images used to assemble the shown image. **Panel B.** Asa6–Asa8^{6His} interaction assayed by affinity chromatography. Shown are the Western blots of the fractions obtained from the affinity column decorated with an anti-Asa6 antibody (upper and middle panels) or an anti-6His tag antibody (lower panel) that recognizes the Asa8^{6His} recombinant protein. The extract of the overexpressed Asa6 subunit was loaded on a 1 mL His-Trap column containing no bound protein (upper blot) or bound Asa8^{6His} (middle and bottom blots). Lane B: histidine-tagged subunit bound to the column. Lane L: untagged sample loaded on the column. Lane E: tagged-protein fraction excluded from the column. Wash: protein fractions excluded after washing with 30 mM imidazole. Fractions under the triangle at right: recombinant proteins that eluted from the affinity columns upon application of a 30–500 mM imidazole gradient. Dashed lines separate individual blot images used to assemble the shown image.

three high molecular mass proteins of the peripheral stalk, Asa1, Asa3 and Asa5. The association of these subunits was not surprising, since it is known that these subunits form the subcomplex Asa1/Asa3/Asa5/Asa8/a/c-ring upon heat or amphipol-induced dissociation of the algal enzyme [8,52]. Concerning the Asa8 homodimer, it has been described that membrane-embedded ATP synthase subunits containing a GxxxG motif are instrumental in the formation of homo- or hetero-dimers [50,51,61,62]. However, the low sequence identity between Asa subunits and orthodox ATP synthase subunits does not allow to unambiguously establish algal equivalents for the yeast or beef subunits, or to predict reliable three-dimensional models.

Recently, the complete structure of dimeric mitochondrial ATP synthase of the colorless alga *Polytomella* sp. was reported at 6.2 Å resolution, revealing a four tilted-helix bundle in the a subunit of the F₀ sector [15]. The long horizontal helices of this subunit are conserved not only in the bacteria *Paracoccus denitrificans* [34], the yeast *Yarrowia*

lypolicita [35], the fungus *Pichia angusta* [36] and in mammalian mitochondria [3], but also in the more distantly related V-type and A-type ATPases [63,64]. It has thus become evident that in many organisms, subunit a exhibits one vertical, orthodox TMS1 and four tilted, hydrophobic alpha-helices (H1 to H4).

In the electron cryo-microscopy map of *Polytomella* (EMD-2852), cross-sections through the membrane domains clearly show the four horizontal embedded helices of subunit a, the c₁₀-ring and six additional transmembrane helices per monomer (Fig. 6A) [15]. Undoubtedly, subunit a and the c-ring are the best well-resolved structures, even though the amino terminal region of subunit a is of insufficient resolution to allow a conclusive assignment of the vertical TMS. A recent bioinformatics approach has predicted the position of subunit a with respect to the c-ring with more accuracy [37]. The proposed model is consistent with all the c-ring/subunit a contacts previously identified by cross-linking experiments in the *E. coli* system [65,66]. However,

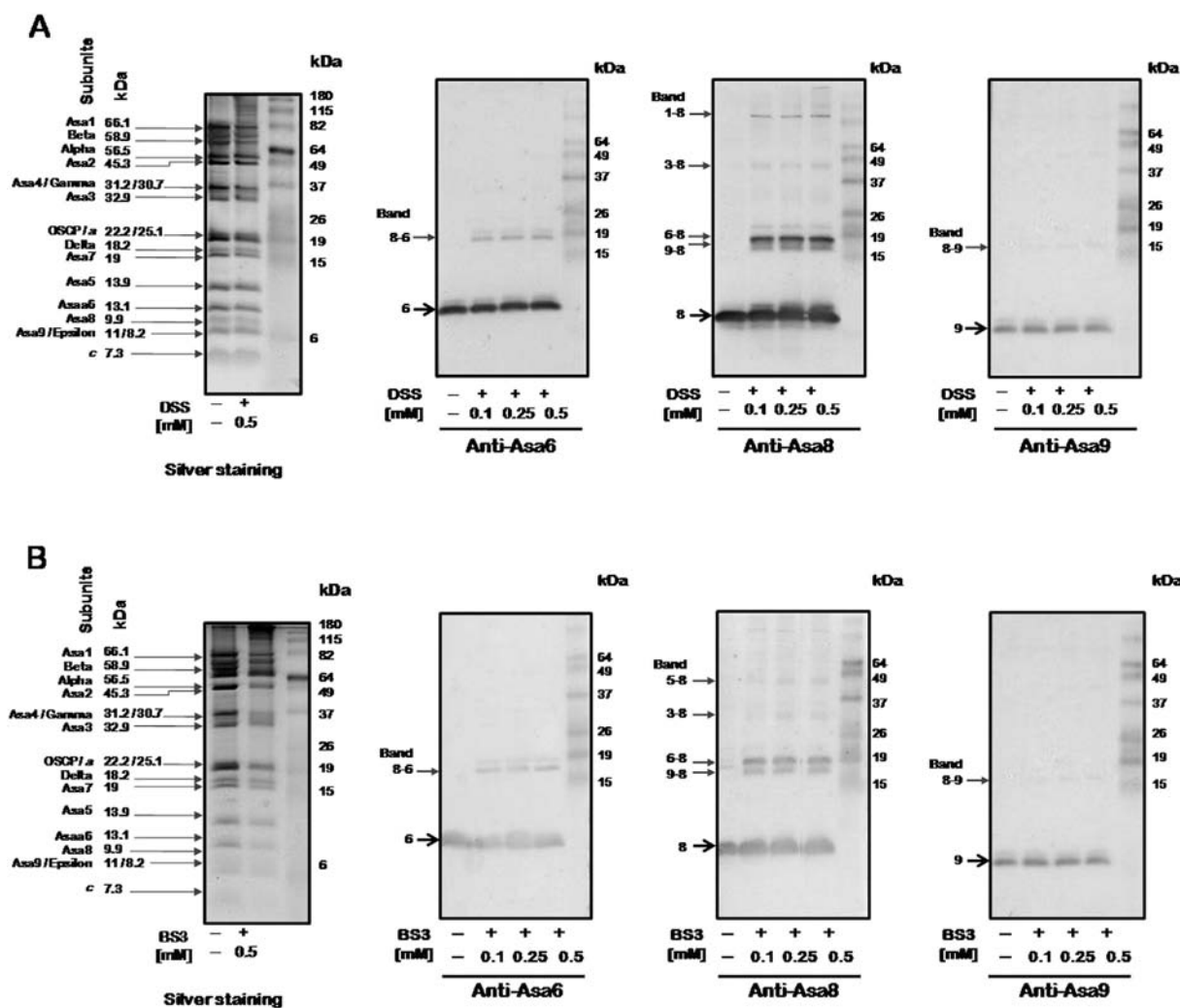


Fig. 5. Cross-linked products of the algal ATP synthase using non-cleavable bifunctional agents. Silver stained gels showing the polypeptide composition of the algal ATP synthase used in the cross-linking experiments. The apparent molecular masses of each subunit are indicated. Western blots of the algal ATP synthase complex (50 μ g of protein per lane) treated with the bifunctional reagent DSS (panel A) or BS³ (panel B) and decorated with the indicated specific anti-Asa subunits antibodies. The algal enzyme was incubated in the absence (minus signs) or in the presence (plus signs) of the indicated homo-bifunctional non-cleavable agent at the indicated increasing concentrations (0.10, 0.25 and 0.50 mM). The identified cross-linked products are indicated with the numbers of the subunits (i.e., 6–8 stands for Asa6–Asa8).

comparison of hydrophobicity profiles of the bacterial and algal sequences suggest that the putative TMS of the algal subunit *a* is not hydrophobic enough to be inserted into the membrane (Supplementary Fig. 7A and B). Notably, subunit *a* of chlorophycean algae is nucleus-encoded [67]; to date, it is the only known subunit *a* whose gene naturally resides in the nucleus, and thus, will exhibit a biogenesis pathway very different from its mitochondria-encoded counterparts. It has been reported previously that the algal subunit *a* exhibits lower hydrophobicity in several of its putative hydrophobic alpha-helices, and especially in the first putative TMS [67]. This diminished hydrophobicity should allow the full translocation of this first putative TMS during the biogenesis of this algal subunit. This idea is further substantiated by meso-hydrophobicity versus maximal hydrophobicity plots, where all the N-terminal regions of nucleus-encoded *a* subunits clearly exhibit a strongly diminished hydrophobic character (Supplementary Fig. 7C) as compared to its C-terminal region (Supplementary Fig. 7D). In this scenario, the putative first TMS is most probably not embedded in the membrane at all. We therefore suggest that the algal subunit *a* is unique in the sense that it may exhibit only the four tilted hydrophobic alpha-helices (H2 to H4) while lacking the orthodox, vertical TM1. The membrane extrinsic sequence H1 that replaces TM1 may interact with

other Asa subunits of the peripheral stalk (Supplementary Fig. 8).

Considering all the above mentioned results, we propose a model where, in accordance with multiple electron microscopy observations, the c-ring shaped oligomer is posed at the extreme of each monomer interacting closely with the four perpendicular helices of subunit *a*. The other six apparent TMS densities observed could be ascribed in the following way: two for the reentrant helix of Asa6, one for a classical TMS in Asa6 subunit, two TMS of a possibly dimeric Asa8, and one TMS for Asa9 (Fig. 6B). We cannot fully exclude the possibility that one of the observed TMS could be provided by a reentrant helix or a hydrophobic pocket of the Asa1, Asa3 or Asa5 subunits of the peripheral arm that would partially insert into the membrane (see Supplementary Fig. 4). If one would try to look for structural analogs of the algal subunits in the *Y. lipolytica* cryo-EM maps [35], Asa6 could substitute for yeast subunit *f*, dimeric Asa8 for subunits *e* and *g*, and Asa9 for either subunits *Atp8* or *i*. Furthermore, mitochondrial ATP synthases are arranged in mitochondrial cristae as oligomers. It has been previously proposed that upon detergent incubation these oligomers may break down into “true-dimers” or into “pseudo-dimers” [12,68]. Our model suggests that subunit Asa6 is instrumental for stabilizing the dimeric structure of the algal enzyme (a true-dimer

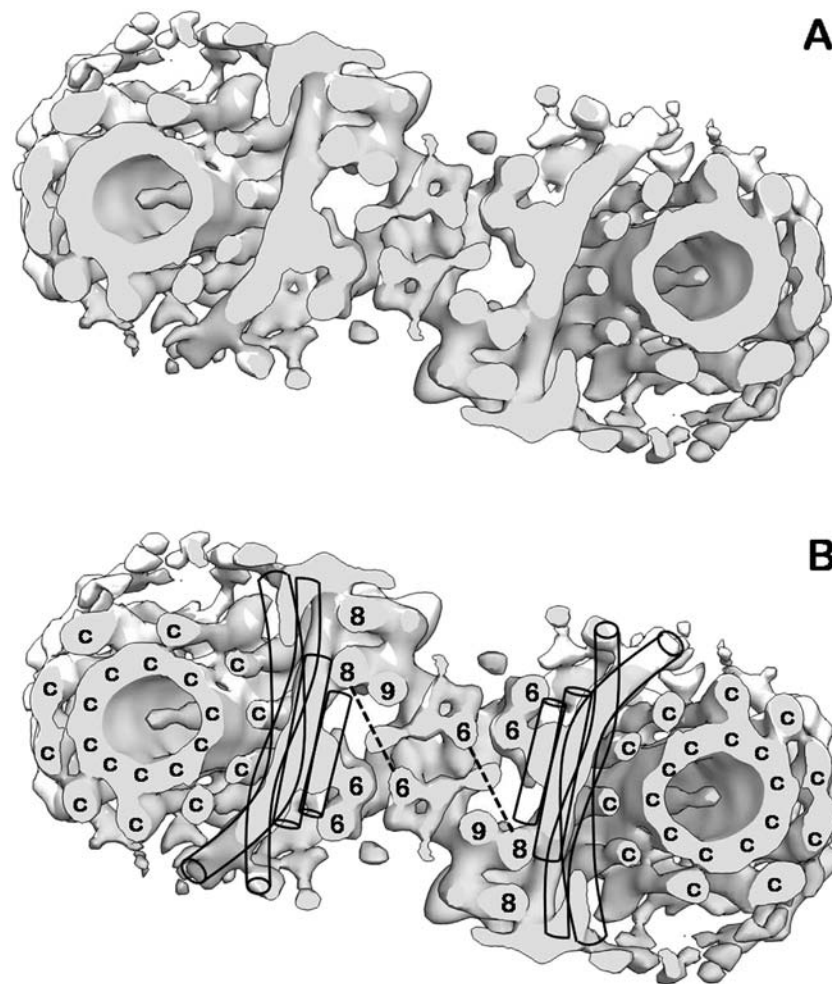


Fig. 6. Model of the arrangement of membrane-embedded subunits of the *Polytomella* ATP synthase. **Panel A.** Matrix view of a cross-section of the electron density map of the algal enzyme obtained by cryo-microscopy [“Electron cryo-microscopy of mitochondrial ATP synthase dimer” (EMD ID: 2852)] [15]. **Panel B.** Same cross-section of the electron density map as shown in panel A with the suggested arrangement of the membrane-embedded subunits of the algal ATP synthase. TMS are represented by circles and tilted hydrophobic alpha-helices as curved cylinders. The name of each of the subunits is indicated by its corresponding number or letter. Subunits Asa6 and Asa9 are proposed to participate in the dimerization of enzyme (true dimer formation), while Asa8 is shown as a homodimer that could participate in the oligomerization (pseudo-dimer formation) of the enzyme. Dotted lines represent that Asa6 and Asa8 subunits may interact in a different cross-section of the protein (not shown).

resistant to detergent solubilization), while subunit Asa8 could play a role similar to subunits *e* and *g*, participating in the oligomerization of the enzyme (pseudo-dimer formation).

Regardless of the source, it seems that in all rotatory ATPases the horizontal helices of subunit *a* together with the *c*-ring rotor create two torque generating aqueous ion-conducting half-channels required for ATP synthesis [15,35,64]. In general, with the exception of subunits *a* and the *c*-ring, the structure and disposition of the membrane-embedded subunits of the F_1F_0 -ATP synthases have been poorly detailed. In this work, we provide evidence of some of the interactions of the hydrophobic Asa subunits of the ATP synthase of the colorless alga *Polytomella*, and propose a model for the disposition of these membrane-embedded proteins in a cross-section of the density map obtained by cryo-microscopy. A higher resolution structure of the algal enzyme should provide more detail of the disposition of these membrane-embedded subunits.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.04.004>.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.04.004> associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

We are grateful to Laura Ongay Larios, Minerva Mora Cabrera and Guadalupe Códiz Huerta of the Molecular Biology Unit, IFC, UNAM for primer synthesis and sequencing. We thank Dr. Nuria Sánchez-Puig (Instituto de Química, UNAM) for donating the over expression *E. coli* C41 (DE3) strain. We thank Dr. Héctor Malagón (Bioterio, IFC, UNAM) for his technical help in managing animals for antibody production. This research was supported by grants 239219 (CONACyT, Mexico); 245486 CONACyT-FNRS, Mexico-Belgium) and IN203311 (DGAPA-UNAM, Mexico). Lorenzo Sánchez-Vásquez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the Ph.D. fellowship 128110 from CONACyT.

References

- [1] T. Xu, V. Pagadala, D.M. Mueller, Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase, *Microb. Cell* 2 (4) (2015) 105–125, <http://dx.doi.org/10.15698/mic2015.04.197>.
- [2] A. Wächter, Y. Bi, S.D. Dunn, B.D. Cain, H. Sielaff, F. Wintermann, S. Engelbrecht, W. Junge, Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (10) (2011) 3924–3929, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1011581108>.
- [3] A. Zhou, A. Rohou, D.G. Schep, J.V. Bason, M.G. Montgomery, J.E. Walker, N. Grigorieff, J.L. Rubinstein, Structure and conformational states of the bovine

- mitochondrial ATP synthase by cryo-EM, *elife* 4 (2015) e10180, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10180>.
- [4] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinoshita, Direct observation of the rotation of F₁-ATPase, *Nature* 386 (1997) 299–302, <http://dx.doi.org/10.1038/386299a0>.
- [5] P. Balabaskaran Nina, N.V. Dudkina, L.A. Kane, J.E. van Eyk, E.J. Boekema, M.W. Mather, A.B. Vaidya, Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*, *PLoS Biol.* 8 (7) (2010) e1000418, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000418>.
- [6] A. Ziková, A. Schnauffer, R.A. Dalley, A.K. Panigrahi, K.D. Stuart, The F₀(F)₁-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*, *PLoS Pathog.* 5 (5) (2009) e1000436, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000436>.
- [7] E. Perez, M. Lapaille, H. Degand, L. Cilibrasi, A. Villavicencio-Queijeiro, P. Morsomme, D. González-Halphen, M.C. Field, C. Remacle, D. Baurain, P. Cardol, The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic Trypanosomatidae, *Mitochondrion* 19 (Pt B) (2014) 338–349, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.001>.
- [8] M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle, D. González-Halphen, The mitochondrial ATP synthase of chlorophyte algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex, *J. Bioenerg. Biomembr.* 38 (5–6) (2006) 271–282, <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-006-9046-x>.
- [9] R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernández, D. González-Halphen, Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach, *Plant Physiol.* 132 (1) (2003) 318–330, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.018325>.
- [10] A. Atteia, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the F₀F₁-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (3) (1997) 275–284, [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00031-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00031-5).
- [11] N.V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, H.P. Braun, Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane, *FEBS Lett.* 579 (25) (2005) 5769–5772, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.065>.
- [12] N.V. Dudkina, S. Sunderhaus, H.P. Braun, E.J. Boekema, Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, *FEBS Lett.* 580 (14) (2006) 3427–3432, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.097>.
- [13] A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, A. Villavicencio-Queijeiro, F. Figueroa-Martínez, H. Miranda-Astudillo, Y. Cordeiro, J.A. Mignaco, D. Foguel, P. Cardol, M. Lapaille, C. Remacle, S. Wilkens, D. González-Halphen, Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (8) (2010) 1439–1448, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.024>.
- [14] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohann, H.P. Braun, E.J. Boekema, Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2) (2010) 272–277, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.11.004>.
- [15] M. Allegretti, N. Klusch, D.J. Mills, J. Vonck, W. Kühlbrandt, K.M. Davies, Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase, *Nature* 521 (7551) (2015) 237–240, <http://dx.doi.org/10.1038/nature14185>.
- [16] R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Atteia, New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad alga *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 144 (2) (2007) 1190–1199, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.094060>.
- [17] A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vázquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gómez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scofano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (1) (2009) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-009-9203-0>.
- [18] M. Lapaille, A. Escobar-Ramírez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodríguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. González-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, Atypical subunit composition of the chlorophyte mitochondrial F₀F₁-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme, *Mol. Biol. Evol.* 27 (7) (2010) 1630–1644, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msq049>.
- [19] H. Miranda-Astudillo, A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, L. Colina-Tenorio, A. Downie-Velasco, P. Cardol, C. Remacle, L. Domínguez-Ramírez, D. González-Halphen, Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophyte alga *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (1) (2014) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.08.001>.
- [20] L. Colina-Tenorio, H. Miranda-Astudillo, A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, Subunit Asa1 spans all the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophyte alga *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1857 (4) (2016) 359–369, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.012>.
- [21] H. Schägger, Denaturing electrophoretic techniques, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 59–79, <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-057172-0.50010-3>.
- [22] M.A.K. Markwell, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* 87 (1) (1978) 206–210, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90586-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9).
- [23] A. Atteia, R. van Lis, S.I. Beale, Enzymes of the heme biosynthetic pathway in the non photosynthetic alga *Polytomella* sp, *Eukaryot. Cell* 4 (12) (2005) 2087–2097, <http://dx.doi.org/10.1128/EC.4.12.2087-2097.2005>.
- [24] J. Sambrook, D.W. Russel, *The Hanahan Method for preparation and Transformation of Competent E. coli: High-efficiency Transformation*, in: J. Sambrook, D.W. Russel (Eds.), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, pp. 1.105–1.111, <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot3942>.
- [25] R.R. Burgess, Refolding solubilized inclusion body proteins, *Methods Enzymol.* 463 (2009) 259–282, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63017-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2).
- [26] H. Schägger, H. Aquila, G. Von Jagow, Coomassie blue–sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis, *Anal. Biochem.* 173 (1) (1988) 201–205.
- [27] D. González-Halphen, M. Vázquez-Acevedo, B. García-Ponce, On the interaction of mitochondrial complex III with the Rieske iron-sulfur protein (subunit V), *J. Biol. Chem.* 266 (6) (1991) 3870–3876.
- [28] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (9) (1979) 4350–4354, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- [29] R.A. Hall, Studying protein–protein interactions via blot overlay or Far Western blot, in: H. Fu (Ed.), *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*, Humana Press, New Jersey, 2004, pp. 167–174, <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-762-9-167>.
- [30] R.D. Gietz, R.H. Schiestl, Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PGEI method, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 35–37, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.14>.
- [31] C. Snider, S. Jayasinghe, K. Hristova, S.H. White, MPEX: a tool for exploring membrane proteins, *Protein Sci.* 18 (12) (2009) 2624–2628, <http://dx.doi.org/10.1002/pro.256>.
- [32] S.C. Botelho, M. Osterberg, A.S. Reichert, K. Yamano, P. Björkholm, T. Endo, G. von Heijne, H. Kim, TIM23-mediated insertion of transmembrane α -helices into the mitochondrial inner membrane, *EMBO J.* 30 (6) (2011) 1003–1011, <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.29>.
- [33] M. Delorenzi, T. Speed, An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions, *Bioinformatics* 18 (4) (2002) 617–625, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/18.4.617>.
- [34] E. Morales-Rios, M.G. Montgomery, A.G. Leslie, J.E. Walker, Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (43) (2015) 13231–13236, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1517542112>.
- [35] A. Hahn, K. Parey, M. Bublitz, D.J. Mills, V. Zickermann, J. Vonck, W. Kühlbrandt, T. Meier, Structure of a complete ATP synthase dimer reveals the molecular basis of inner mitochondrial membrane morphology, *Mol. Cell* 63 (3) (2016) 445–456, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.037>.
- [36] K.R. Vinothkumar, M.G. Montgomery, S. Liu, J.E. Walker, Structure of the mitochondrial ATP synthase from *Pichia angusta* determined by electron cryo-microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (45) (2016) 12709–12714, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1615902113>.
- [37] V. Leone, J.D. Faraldo-Gómez, Structure and mechanism of the ATP synthase membrane motor inferred from quantitative integrative modeling, *J. Gen. Physiol.* 148 (6) (2016) 441–457, <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201611679>.
- [38] M.G. Claros, J. Perea, Y. Shu, F.A. Samatey, J.L. Popot, C. Jacq, Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria: the case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b, *Eur. J. Biochem.* 228 (3) (1995) 762–771, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0762m.x>.
- [39] S. Rajesh, T. Knowles, M. Overduin, Production of membrane proteins without cells or detergents, *New Biotechnol.* 28 (3) (2011) 250–254, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.011>.
- [40] B. Miroux, J.E. Walker, Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J. Mol. Biol.* 260 (3) (1996) 289–298, <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>.
- [41] J.E. Walker, The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.* 41 (1) (2013) 1–16, <http://dx.doi.org/10.1042/BST20110773>.
- [42] D.L. Foster, R.H. Fillingame, Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATP synthase complex of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2009–2015.
- [43] I. Wittig, H. Schägger, Structural organization of mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (7–8) (2008) 592–598, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.027>.
- [44] G. Arselin, J. Vaillier, P.V. Graves, J. Velours, ATP synthase of yeast mitochondria, isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene, *J. Biol. Chem.* 271 (34) (1996) 20284–20290, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.34.20284>.
- [45] P. Paumard, J. Vaillier, C. Napias, G. Arselin, D. Brèthes, P.V. Graves, J. Velours, Environmental study of subunit i, a F(O) component of the yeast ATP synthase, *Biochemistry* 39 (14) (2000) 4199–4205, <http://dx.doi.org/10.1021/bi992438l>.
- [46] S. Liu, T.J. Charlesworth, J.V. Bason, M.G. Montgomery, M.E. Harbour, I.M. Fearnley, J.E. Walker, The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species, *Biochem. J.* 468 (1) (2015) 167–175, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20150197>.
- [47] B. Meyer, I. Wittig, E. Trifilieff, M. Karas, H. Schägger, Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (10) (2007) 1690–1699, <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M700097-MCP200>.
- [48] A.I. Jonckheere, J.A. Smeitink, R.J. Rodenburg, Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology, *J. Inher. Metab. Dis.* 35 (2) (2012) 211–225, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>.

- [49] P. Paumard, J. Vaillier, B. Coulary, J. Schaeffer, V. Soubannier, D.M. Mueller, D. Brèthes, J.P. di Rago, J. Velours, The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology, *EMBO J.* 21 (3) (2002) 221–230, <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>.
- [50] G. Arselin, M.F. Giraud, A. Dautant, J. Vaillier, D. Brèthes, B. Coulary-Salin, J. Schaeffer, J. Velours, The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane, *Eur. J. Biochem.* 270 (8) (2003) 1875–1884, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03557.x>.
- [51] G. Arselin, J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M.F. Giraud, A. Dautant, D. Brèthes, J. Velours, The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology, *J. Biol. Chem.* 279 (39) (2004) 40392–40399, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M404316200>.
- [52] M. Vázquez-Acevedo, F. Vega-deLuna, L. Sánchez-Vásquez, L. Colina-Tenorio, C. Remacle, P. Cardol, H. Miranda-Astudillo, D. González-Halphen, Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae, *Biochim. Biophys. Acta* 1857 (8) (2016) 1183–1190, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.003>.
- [53] V. Everard-Gigot, C.D. Dunn, B.M. Dolan, S. Brunner, R.E. Jensen, R.A. Stuart, Functional analysis of subunit e of the F₁F₀-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region, *Eukaryot. Cell* 4 (2) (2005) 346–355, <http://dx.doi.org/10.1128/EC.4.2.346-355.2005>.
- [54] Practical aspects in expression and purification of membrane proteins for structural analysis, in: K.R. Vinothkumar, P.C. Edwards, J. Standfuss, I. Schmidt-Krey, Y. Cheng (Eds.), *Electron Crystallography of Soluble and Membrane Proteins: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 2013, pp. 17–30, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-176-9_2.
- [55] J.L. Banères, Refolding of G-protein-coupled receptors, in: R. Grishamer, S.K. Buchanan (Eds.), *Structural Biology of Membrane Proteins*, RCS Publishing, 2006, pp. 3–14, <http://dx.doi.org/10.1039/9781847552563>.
- [56] J.K. Nagy, W.L. Lonzer, C.R. Sanders, Kinetic study of folding and misfolding of diacylglycerol kinase in model membranes, *Biochemistry* 40 (2001) 8971–8980, <http://dx.doi.org/10.1021/bi010202n>.
- [57] F.I. Valiyaveetil, R. MacKinnon, T.W. Muir, Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 9113–9120, <http://dx.doi.org/10.1021/ja0266722>.
- [58] N.J. Harris, H.E. Findlay, J. Simms, X. Liu, P.J. Booth, Relative domain folding and stability of a membrane transport protein, *J. Mol. Biol.* 426 (2014) 1812–1825, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.01.012>.
- [59] Strategies for the purification of membrane proteins, in: S.M. Smith, Dermot Walls, Sinéad T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, Methods in Mol. Biol., Humana Press, New York, 2017, pp. 389–400, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_21.
- [60] J. Petschnigg, O.W. Moe, I. Stagljar, Using yeast as a model to study membrane proteins, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20 (4) (2011) 425–432, <http://dx.doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283478611>.
- [61] D.M. Bustos, J. Velours, The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 280 (32) (2005) 29004–29010, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M502140200>.
- [62] S. Saddar, R.A. Stuart, The yeast F(1)F(0)-ATP synthase: analysis of the molecular organization of subunit g and the importance of a conserved GXXXG motif, *J. Biol. Chem.* 280 (26) (2005) 24435–24442, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M502804200>.
- [63] J. Zhao, S. Benlekhir, J.L. Rubinstein, Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase, *Nature* 521 (7551) (2015) 241–245, <http://dx.doi.org/10.1038/nature14365>.
- [64] W. Kühlbrandt, K.M. Davies, Rotary ATPases: a new twist to an ancient machine, *Trends Biochem. Sci.* 41 (1) (2016) 106–116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.006>.
- [65] W. Jiang, R.H. Fillingame, Interacting helical faces of subunits a and c in the F₁F₀ ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (12) (1998) 6607–6612, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.12.6607>.
- [66] S.B. Vik, R.R. Ishmukhametov, Structure and function of subunit a of the ATP synthase of *Escherichia coli*, *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (6) (2005) 445–449, <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-005-9488-6>.
- [67] S. Funes, E. Davidson, M.G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M.P. King, D. González-Halphen, The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277 (8) (2002) 6051–6058, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109993200>.
- [68] D. Thomas, P. Bron, T. Weimann, A. Dautant, M.F. Giraud, P. Paumard, B. Salin, A. Cavalier, J. Velours, D. Brèthes, Supramolecular organization of the yeast F1F0-ATP synthase, *Biol. Cell.* 100 (10) (2008) 591–601, <http://dx.doi.org/10.1042/BC20080022>.



Review

Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae☆☆☆



Miriam Vázquez-Acevedo^a, Félix Vega-deLuna^a, Lorenzo Sánchez-Vásquez^a, Lilia Colina-Tenorio^a, Claire Remacle^b, Pierre Cardol^b, Héctor Miranda-Astudillo^b, Diego González-Halphen^{a,*}

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

^b Genetics and Physiology of Microalgae, Department of Life Sciences, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form 25 January 2016

Accepted 5 February 2016

Available online 10 February 2016

Keywords:

F₁F₀-ATP synthase peripheral-stalk

Dimeric mitochondrial complex V

Amphipol A8-35

Chlamydomonas reinhardtii

Polytomella sp.

Asa subunits

ABSTRACT

The algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp., a green and a colorless member of the chlorophycean lineage respectively, exhibit a highly-stable dimeric mitochondrial F₁F₀-ATP synthase (complex V), with a molecular mass of 1600 kDa. *Polytomella*, lacking both chloroplasts and a cell wall, has greatly facilitated the purification of the algal ATP-synthase. Each monomer of the enzyme has 17 polypeptides, eight of which are the conserved, main functional components, and nine polypeptides (Asa1 to Asa9) unique to chlorophycean algae. These atypical subunits form the two robust peripheral stalks observed in the highly-stable dimer of the algal ATP synthase in several electron-microscopy studies. The topological disposition of the components of the enzyme has been addressed with cross-linking experiments in the isolated complex; generation of subcomplexes by limited dissociation of complex V; detection of subunit-subunit interactions using recombinant subunits; *in vitro* reconstitution of subcomplexes; silencing of the expression of Asa subunits; and modeling of the overall structural features of the complex by EM image reconstruction. Here, we report that the amphipathic polymer Amphipol A8-35 partially dissociates the enzyme, giving rise to two discrete dimeric subcomplexes, whose compositions were characterized. An updated model for the topological disposition of the 17 polypeptides that constitute the algal enzyme is suggested. This article is part of a Special Issue entitled 'EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference, Riva del Garda, Italy, July 2-6, 2016', edited by Prof. Paolo Bernardi.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. The mitochondrial ATP synthase

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase (complex V) is a key participant of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and the main ATP producing enzyme in non-photosynthetic eukaryotes. Classic dissociation experiments characterized two oligomeric domains in the enzyme, an extrinsic moiety (F₁ factor) and the membrane bound sector Fo [1]. F₁F₀-ATP synthase is also a molecular motor [2] in which a central rotor-stalk [$\gamma/\delta/\epsilon/c$ -ring] rotates around an axis perpendicular to the plane of the membrane, while the fixed elements (stator components) are subunit *a*, the catalytic core (α_3/β_3), the peripheral stalk (OSCP/*b*/*d*/F₆), and the dimerization module (A6L/*e*/*f*/*g*) [3,4]. Proton-flux through the two hemi-channels of subunit *a*, formed by membrane-embedded α -helices, causes the rotary movement of a *c*-subunit ring with a

species-dependent variable stoichiometry (*c*_{8–14}) and concomitantly, the rotation of the central-stalk ($\gamma/\delta/\epsilon$) [5]. Three sequential 120° movements of subunit γ induce conformational changes in the three catalytic β subunits leading to successive substrate binding (ADP + Pi), ATP synthesis, and ATP release [6]. Other subunits play a regulatory role, such as the inhibitory protein IF₁ [7] that prevents futile ATP hydrolysis. The peripheral stator-stalk counteracts the torque generated by the rotation of the central stalk during the function of the enzyme [8]. In the yeast and beef enzymes, the main axis of the peripheral stalk is formed by subunit *b*, that contains two transmembrane stretches near its N-terminal region and extends towards OSCP at the top of the F₁ sector associating also with subunits *d* and F₆ (*h* in yeast) [9].

In the inner mitochondrial membrane, the ATP synthase forms oligomeric associations [10–12] that are responsible for the overall architecture of the mitochondrial cristae [13]. In yeast, dimerization is mediated by the small subunits *e*, *g*, *h* and *i* [14,15]. Subunits *b* (Atp4), *d*, F₆, A6L, *e*, *f* and *g*, present in the bovine enzyme, are not common to all mitochondrial ATP synthases; atypical subunit compositions have been identified in trypanosomatids [16], euglenoids [17], chlorophycean algae [18] and ciliates [19]. Also, electron microscopy studies have shown stark structural differences in the enzymes of ciliates [19] and algae [18] as compared to the orthodox enzymes isolated from beef and yeast [11,20].

* This article is part of a Special Issue entitled 'EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference, Riva del Garda, Italy, July 2-6, 2016', edited by Prof. Paolo Bernardi.

☆☆ Peripheral stalk of algal ATP synthases

* Corresponding author at: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, Delegación Coyoacán, 04510 México D.F., Mexico.

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

2. The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae

2.1. Subunit composition

Chlorophycean algae originated approximately 600 million years ago [21]. Some characteristics of this lineage are the drastic reduction of its mitochondrial genomes in size and in gene content [22], the fragmentation of the mitochondrial *cox2* gene and its migration to the nucleus [23], and the appearance of nucleus-encoded atypical subunits of ATP synthase (Asa subunits) [24,25]. Genes encoding homologs of Asa subunits were identified in several other chlorophycean algae including *Volvox carteri*, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorococum ellipsoideum* [25]. The list can be updated to include the green unicellular algae *Chlamydomonas chlamydogama*, *Chlamydomonas leiostraca*, *Chlamydomonas* sp. and *Dunaliella tertiolecta* and the colorless algae *Polytomella capuana*, *Polytomella magna*, *Polytomella piriformis* and *Polytomella parva* [26].

The biochemical characterization of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae has been carried out mainly with two organisms, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. Early works identified immunologically the β -subunit of mitochondrial ATP synthase in preparations of thylakoid and mitochondria membranes of *C. reinhardtii* [27]. A fraction enriched in the green algal complex V was obtained after sucrose gradient centrifugation in the presence of Triton X-100 [28]. The cDNA of the β -subunit of *C. reinhardtii* mitochondrial ATP synthase was sequenced and the corresponding protein was found to contain a unique C-terminal extension of 70 residues not present in the β -subunits of plant enzymes [29]. A pure and active mitochondrial ATP synthase preparation from the green alga was obtained by extraction with lauryl maltoside followed by ion exchange and gel permeation chromatography and found to be composed of at least 14 polypeptides [30]. Also, the cDNA encoding the α -subunit of the enzyme was sequenced and the mature subunit was found to exhibit an 18-residues extension not present in other organisms.

Subsequently, a mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase was isolated by gel permeation chromatography from *Polytomella* sp., that lacks both chloroplasts and cell wall, and thus facilitates the isolation of mitochondria and purification of the OXPHOS complexes without the interference of thylakoid components [31]. The enzyme from this colorless alga exhibited at least 10 polypeptides with apparent molecular masses that ranged from 6 to 63 kDa [32] and its α and β subunits exhibited high sequence similarities with the ones of *Chlamydomonas* [see also Ref. 33]. Here, the *Polytomella* α and β subunits were modeled on the crystallographic structure of the bovine enzyme to visualize the location of these extensions in the F_1 sector. Fig. 1 shows two of the possible conformations for each of the algal extensions. The α subunit extensions could have a role in stabilizing contacts with the peripheral stalk, while the β subunit extensions were proposed to act as the IF₁ ATPase inhibitor based on sequence similarities [32]. When the extension of the β subunit was overexpressed, partially purified, and added to the algal ATPase at relatively high concentrations, the hydrolytic activity of the enzyme diminished less than 20% [Villavicencio-Queijeiro and González-Halphen, unpublished results]. Although this result suggests a null or very limited inhibitory effect of the C-terminal extension of the beta subunit, it would be necessary to delete this extremity using site-directed mutagenesis to ascertain its role.

In order to assess if subunit *a* (Atp6) was present in the mitochondrial ATP synthase of *C. reinhardtii*, isolated mitochondria from the green alga were subjected to blue native electrophoresis (BN-PAGE), a technique that uses the charge shift generated by the binding of Coomassie Blue to detergent-solubilized membrane complexes to separate them under native conditions [34]. The first dimensional BN-PAGE gel was then subjected to 2D-denaturing SDS-PAGE to identify the polypeptide composition of complex V [35]. At least 13 different polypeptides were found to be associated to the complex, five of which were unambiguously

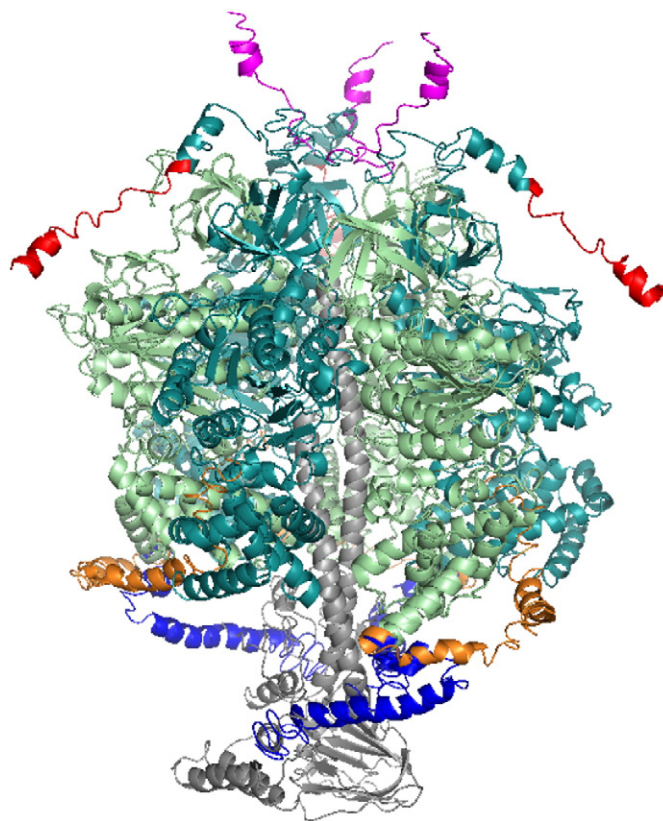


Fig. 1. Model of the *Polytomella* sp. ATP synthase subunits α and β and their corresponding extensions. The *Polytomella* sp. sequences of the mature α subunit with its C-terminal extension of 67 residues, and the β subunit with its N-terminal extension of 21 residues were modeled *in silico* using the I-TASSER server [71]. Two of the obtained models that showed no steric hindrances were selected for each subunit. The algal F_1 sector was modeled on the bovine crystallographic structure (PDB Id: 2WSS) [72]. Subunits in the complex are colored: α subunits (dark green), β subunits (light green), γ subunit (gray), algal α subunit extensions (one possible conformation in red, the other in magenta), algal β subunit extensions (one possible conformation in orange, the other in dark blue).

identified as subunits α , β , γ , δ and *a*. Nevertheless, eight polypeptides of the ATP synthase showed no evident similarity with other ATPase subunits nor with other proteins in the databases, so their identities remained obscure at that time. These results prompted a detailed analysis of mitochondrial protein components of *C. reinhardtii* by BN-PAGE, followed by 2D-SDS-PAGE and Edman degradation of selected bands [36]. Complex V was found to migrate exclusively as a dimer that resolved into at least 13 polypeptides in 2D-SDS-PAGE. In addition, a novel 60-kDa protein with no known counterpart in any other organism, named MASAP for mitochondrial ATP synthase-associated protein and later on renamed Asa1, was described and its corresponding cDNA sequence was obtained [36]. It was put forth that this novel polypeptide was extrinsic to the membrane, probably not a chaperone and that it could play a structural role in stabilizing the chlorophycean ATP synthase dimer.

Mitochondrial F_1F_0 -ATP synthases of *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. migrated in BN-PAGE in the presence of lauryl-maltoside as stable dimers of 1600 kDa [36,37] while the monomeric F_1F_0 or free F_1 moieties could not be detected. This suggested the presence of a highly stable, detergent-resistant dimeric enzyme and contrasted starkly with the behavior of other complex V from different sources, including mammals, fungi and land plants that usually migrate in BN-PAGE in the presence of lauryl-maltoside as monomers of 550–600 kDa [14,20,38,39]. Also, conventional enzymes tend to partially dissociate during electrophoresis, releasing the F_1 sector [38]. In order to obtain dimers from these latter biological sources, milder solubilization conditions, usually with digitonin, are required [20].

The completion of the *C. reinhardtii* genome [40] allowed the identification of the ATP synthase subunits whose N-terminal sequences had been obtained previously [35]. Thus, the mitochondrial ATP synthase from *C. reinhardtii* was now found to contain 14 subunits of 7 to 60 kDa [41]. Seven polypeptides were identified as the classical subunits α , β , γ , δ , a (ATP6), c (ATP9), and OSCP. Besides Asa1, several other polypeptides with no counterparts in the databases were identified and named Asa2 to Asa7 (this last one previously known as Nuop6) in accordance with the *C. reinhardtii* genome project nomenclature. In addition, no homologs of the ϵ , b , d , e , f , g , IF₁, A6L, and F6 subunits were found encoded in the algal genome. This reinforced the idea that unique proteins were associated with chlorophycean mitochondrial ATP synthases [24] and pin-pointed the Asa subunits as the main constituents of the peripheral stalk of the enzyme. The mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. was isolated; its polypeptide composition was characterized and found to be similar to that of the *C. reinhardtii* enzyme [18,33]. Furthermore, small-angle X-ray scattering analysis estimated a molecular mass of the complex of 1696 kDa [42]. In addition, the presence of two additional low molecular mass subunits, Asa8 and Asa9, was described. Asa subunits were found associated to the algal ATP synthase even when the complex was isolated following different purification procedures; thus, the possibility that they were only contaminants of the preparations was discarded [18]. It seems that in the chlorophycean lineage, all the orthodox structural components of the peripheral arm were substituted by polypeptides from a completely different origin, probably proteins that already had a structural role in some other cell compartment.

2.2. Hydrolytic activity of the purified algal enzyme

When isolated, the *Polytomella* sp. enzyme exhibits a very low ATPase activity that increases either with heat treatment (due to the release of the F₁ sector) or when being unmasked by the presence of non-ionic detergents in an activity assay [43]. The biochemical state of the enzyme in the absence of externally added detergent is however not known; it could be partially aggregated and therefore inactive, or it could be fully restrained by an inhibitor that is released upon detergent addition. The algal dimer hydrolyzes ATP on a wide range of pH's and temperatures and shows sensitivity to the classical inhibitors oligomycin and DCCD [44], the dimeric ATPase exhibited and apparent Km for Mg-ATP of 0.19 mM and a V_{max} of 0.065 U/mg in the absence of detergent. The V_{max} increased 60-fold in the presence of detergent (Km of 0.24 mM and a V_{max} of 3.8 U/mg). Independent measurements of the hydrolytic activity of the *Polytomella* mitochondrial ATPase have reported activities up to 8.0 U/mg, full DCCD sensitivity, and more than 90% inhibition by oligomycin [45]. These specific activity values are comparable to those of purified ATPases from the green alga *C. reinhardtii* (2.9 U/mg) [30] or from the fungi *Yarrowia lipolytica* (8.4 U/mg) and *Pichia pastoris* (9.3 U/mg), but considerably lower than the enzymes from *Pichia angusta* (21.8 U/mg) and *Saccharomyces cerevisiae* (35.8 U/mg) [46]. Overall, the enzyme does not exhibit strong differences in its hydrolytic activity as compared with the enzymes obtained from many other sources. Oligomycin seems to bind loosely to the algal enzyme, probably due to structural differences in its subunit c [44] that may affect the antibiotic binding site [47]. It is therefore necessary both to pre-incubate the enzyme in the presence of the inhibitor and to add an equal concentration of oligomycin in the assay medium. Incidentally, growth, respiration, and ATP levels in Chlorophycean algae were also barely affected by oligomycin concentrations that affect representatives of the other classes of Chlorophytes [25].

2.3. Three dimensional structure of the enzyme

The stable dimeric nature of the algal ATP synthase prompted a series of electron-microscopy studies. The *Polytomella* enzyme, obtained by digitonin solubilization of mitochondria and sucrose gradient centrifugation,

was subjected to electron microscopy and single particle analysis. Projection maps with a resolution of about 17 Å showed a dimeric enzyme stabilized by interactions between the membrane-bound Fo sectors that formed an angle of 70° [37]. This implied that the enzyme could induce a strong local bending of the inner mitochondrial membrane [13]. Also, the peripheral stalks of the algal dimeric enzyme were noted to be much more robust than their counterparts in other F-type ATPases, including the ones from bovine [48], yeast [49], spinach chloroplasts [50], and *Escherichia coli* [51].

Polytomella sp. mitochondria were subjected to ultrathin sectioning, and cristae membranes were found to fold into lamellae and tubuli. The ATP synthase oligomers seem to make helical arrangements along these tubular membranes, confirming the role of complex V in determining the shape of the inner mitochondrial membrane [52]. This has been further substantiated by RNA interference silencing of the *Atp2* gene encoding subunit β of the *C. reinhardtii* ATP synthase: ATP synthesis was fully impaired, the enzyme failed to assemble, and the algal mitochondria were deprived of cristae [53].

Dual-axis cryo-electron tomography confirmed a supramolecular organization of dimeric ATP synthase in the cristae membranes of *Polytomella* sp. mitochondria that exhibited rows of dimers at 12 nm intervals [54]. In addition, averaged 3D subvolumes of the algal oligomeric enzyme were obtained at 5.7 nm resolution. These 3D tomography data were the first indicators that contacts existed between the peripheral stalks of the monomers [54] suggesting their very rigid architecture. An additional EM analysis of the *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase complex supported the dimeric nature of the enzyme and presence of robust peripheral stalks [42].

More recently, an electron cryo-microscopy map at 6.2 Å resolution of the *Polytomella* sp. dimeric ATP synthase was obtained [45]. Fig. 2A shows the electron density map of the dimer and the principal domains that constitute the oligomeric complex. The model has several salient features: i) subunit a exhibits horizontally membrane-embedded α -helices that seem to embrace the c -ring and that form the two proton-translocating hemi-channels; the presence of these horizontal helices has been subsequently observed in the bacterial [55] and in the beef heart mitochondrial enzymes [56], ii) the robust peripheral stalks are constituted by several entwined α -helices that form a very solid scaffold as compared to the one from other enzymes (Fig. 2B); this is in accordance with the high propensity of several Asa subunits (Asa1, Asa2, Asa4 and Asa7) to form coiled-coils [57], iii) local resolution estimates indicated that the peripheral stalk is more ordered than the catalytic F₁ sector; furthermore, these peripheral stalks are united in their middle region by protein-protein contacts; the Asa subunit responsible for forming this extra-membranous bridge between the monomers is unknown, but could be either Asa4 as suggested previously [33] or Asa7 (see below), iv) the peripheral stalk, besides its substantial mass, seems to make several contacts with the F₁ sector; these contacts may be, among others, the interactions Asa2- α [57] and Asa1-OSCP [26], and v) the c -ring is formed by 10 monomers and seems to be SDS-resistant [26], as those observed in yeast [58], in Na⁺-dependent ATP synthases of bacteria [59] and in the A₁Ao-ATP synthases of archaea [60].

3. Addressing the topology of the components of the peripheral arm of algal mitochondrial ATP synthase

The neighboring interactions of Asa subunits in the ATP synthase of the colorless chlorophycean alga *Polytomella* sp. have been addressed using a variety of experimental approaches: defining near-neighbor relationships of subunits after treating the whole enzyme with cross-linking agents; characterizing protein-protein interactions *in vitro* with recombinant subunits; and dissociating the enzyme into subcomplexes by heat or high detergent concentrations. Thus, models for the topological disposition of the Asa polypeptides in the peripheral arm of the enzyme have been successively refined [18,26,33,42,57].

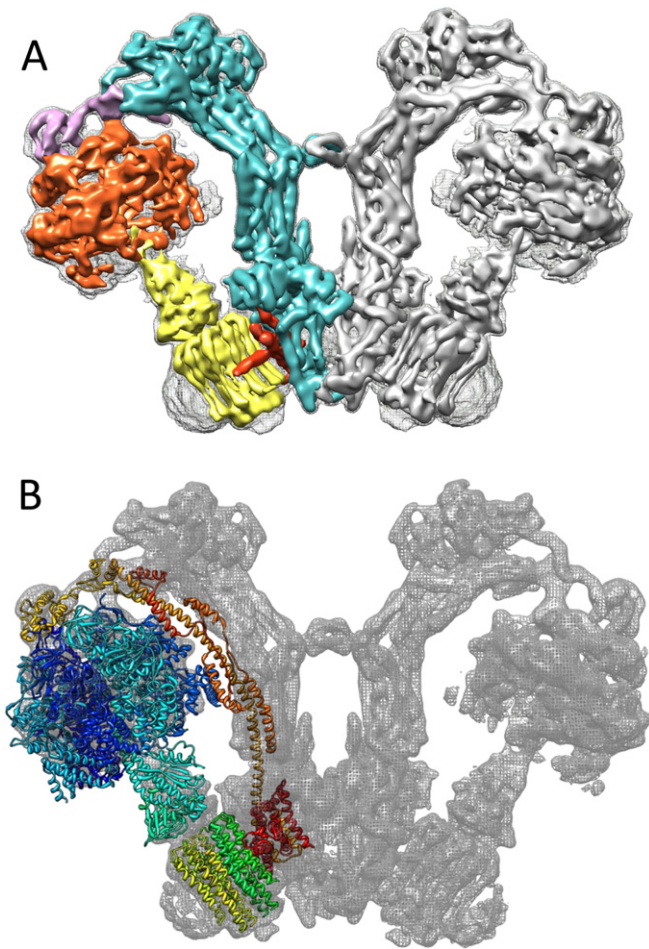


Fig. 2. Electron cryo-microscopy map of the algal *Polytomella* sp. ATP synthase. A) The model shown corresponds to EMDB accession number EMD-2852 [45]. The main domains of the complex were visualized and colored with the UCSF Chimera package [73]: rotor in yellow (subunits $\gamma/\delta/\epsilon/c$ -ring), subunit *a* in red, the catalytic domain (α_3/β_3) in orange, OSCP in violet, and the peripheral stalk (Asa1 to 5 and Asa7) plus the membrane dimerization domain (Asa6, Asa8 and Asa9) in cyan. B) The model of the algal dimeric enzyme (EMD-2852 [45]) and the model of the bovine enzyme obtained by single particle electron cryomicroscopy (PDB Id: 5ARA) [74] were superimposed. The sturdiness of the peripheral stalk of the algal dimer as compared to the one of the bovine enzyme is evident.

3.1. Neighboring interactions between Asa subunits as revealed by cross-linking agents

To assess neighboring interactions between subunits in the algal ATP synthase subunits, cross-linking experiments with several water-soluble and water-insoluble homo-bifunctional and hetero-bifunctional reagents were carried out. Besides some expected cross-link products between the orthodox subunits (*i.e.*, α - β or α -OSCP), the cross-link products that were reproducibly obtained with the atypical subunits were (Asa1–Asa4), (Asa1–Asa7), (Asa2–Asa4), (Asa2–Asa7), (Asa3–Asa8), (Asa6–Asa6) and the triple cross-link product (Asa2–Asa4–Asa7) [42]. The inferred close vicinities between polypeptides were used to predict an overall topology of the algal ATP synthase.

3.2. Silencing and overexpression of subunits

The Asa7 subunit of the green algae *C. reinhardtii* was knocked-down using RNA interference. The absence of this polypeptide neither affected growth nor the OXPHOS of the alga [25]. Nevertheless, attempts to purify the ATP synthase from the Asa7-silenced mutant invariably failed,

because lauryl maltoside solubilization dissociated the complex and released its F₁ sector. Subunit Asa7 is known to bind to at least three other subunits (Asa1, Asa2 and Asa4); it therefore must play a pivotal role in stabilizing the overall architecture of the peripheral stalk.

In order to gain more insights on how Asa proteins interact, recombinant subunits were over-expressed and purified and their interactions *in vitro* explored. It was shown that Asa2, Asa4 and Asa7 interact, and furthermore, that the interaction Asa4–Asa7 is mediated by the C-terminal halves of both proteins [57]. Asa2 can bind Asa7 and the C-terminal half of Asa4. An interaction Asa2- α was also observed, suggesting the proximity of Asa2 with the catalytic head of the enzyme. In addition, subunits Asa2, Asa4 and Asa7 formed a subcomplex with a 1:1:1 stoichiometry that could be reconstituted *in vitro*. This subcomplex was proposed to establish additional contacts with Asa1 and with OSCP.

Subunit Asa1 was shown to be a membrane-extrinsic subunit using sodium carbonate treatment on mitochondrial membranes. It was proposed to represent the bulky structure observed near the F₁ sector in EM studies, and therefore to interact with OSCP [33]. Indeed, subunit Asa1 seems to be one of the main components of the peripheral stalk of the algal enzyme, probably forming the main column that unites the extrinsic subunit OSCP with other components of the enzyme in close contact with the membrane (Asa3, Asa5, Asa8, *a* and *c*₁₀-ring). Thus, Asa1 may be the main support of the peripheral stalk and may have a scaffolding role similar to the one of subunit *b* in orthodox enzymes [26]. Sequence alignment analysis shows that OSCP subunits can be separated into two clearly distinct groups based on their amino acid sequences: one pertaining to the Chlorophycean algae (where OSCP binds an Asa1 subunit), and another that belongs to land plants and other green algae like Prasinophyceae, Ulvophyceae, and Trebouxiophyceae (where OSCP binds an orthodox *b* subunit) [26].

3.3. Dissociation of the enzyme into subcomplexes

Work carried out with the *Polytomella* ATP synthase established other subunit–subunit interactions, mainly through the identification of subcomplexes formed by heat dissociation [18,43]. Upon heat treatment, the ATPase is dissociated into its monomers and immediately afterwards it releases its F₁ sector and disassembles [18,33]. Subunits Asa2, Asa4 and Asa7 and OSCP seem to dissociate concomitantly with the liberation of the F₁ sector. In addition, a subcomplex that contained subunits Asa1/Asa3/Asa5/Asa8/*a/c* appeared transiently [18]. A stable Asa1/Asa3/Asa5/Asa8/*a/c*₁₀ subcomplex could be obtained by treating the enzyme with relatively high lauryl maltoside concentrations [26]. Furthermore, heat denaturation or taurodeoxycholate treatment of the dimeric enzyme leads to a monomeric form with substoichiometric amounts of Asa6 and Asa9 subunits [43]; thus these two proteins seem to promote enzyme dimerization. In addition, the monomeric form of the complex is less active than the dimer, exhibits diminished oligomycin sensitivity, and is more labile to heat treatment, high hydrostatic pressures, and protease digestion [43].

Amphipols, the short amphipathic polymers that can substitute detergents, help the folding and stability of several integral membrane proteins [61]. To find whether Amphipol A8-35 would also help stabilize the algal ATP synthase, the purified enzyme was incubated with the polymer. As judged by BN–PAGE, in the presence of increasing concentrations of Amphipol A8-35 the dimeric enzyme (V₂) partially dissociated into free F₁ sector, comprising at least α , β , γ , and δ subunits, and a subcomplex named SC1 that is composed of Fo and the peripheral stalk (Fig. 3A). Another sample of the purified enzyme was incubated with 3.5% Amphipol A8-35 for 40 min (Fig. 3B, lane 1) and subjected to 2D-SDS–PAGE, where the polypeptides of subcomplex SC1 were resolved (Fig. 3C). Subunit OSCP was found to readily dissociate, migrating towards the front of the BN–PAGE gel. In parallel, a second sample of the purified enzyme was incubated with 3.5% Amphipol A8-35 for 24 h (Fig. 3B, lane 2) and then resolved in 2D-SDS–PAGE. In these conditions, a second subcomplex (SC2), with higher mobility in BN–PAGE than SC1,

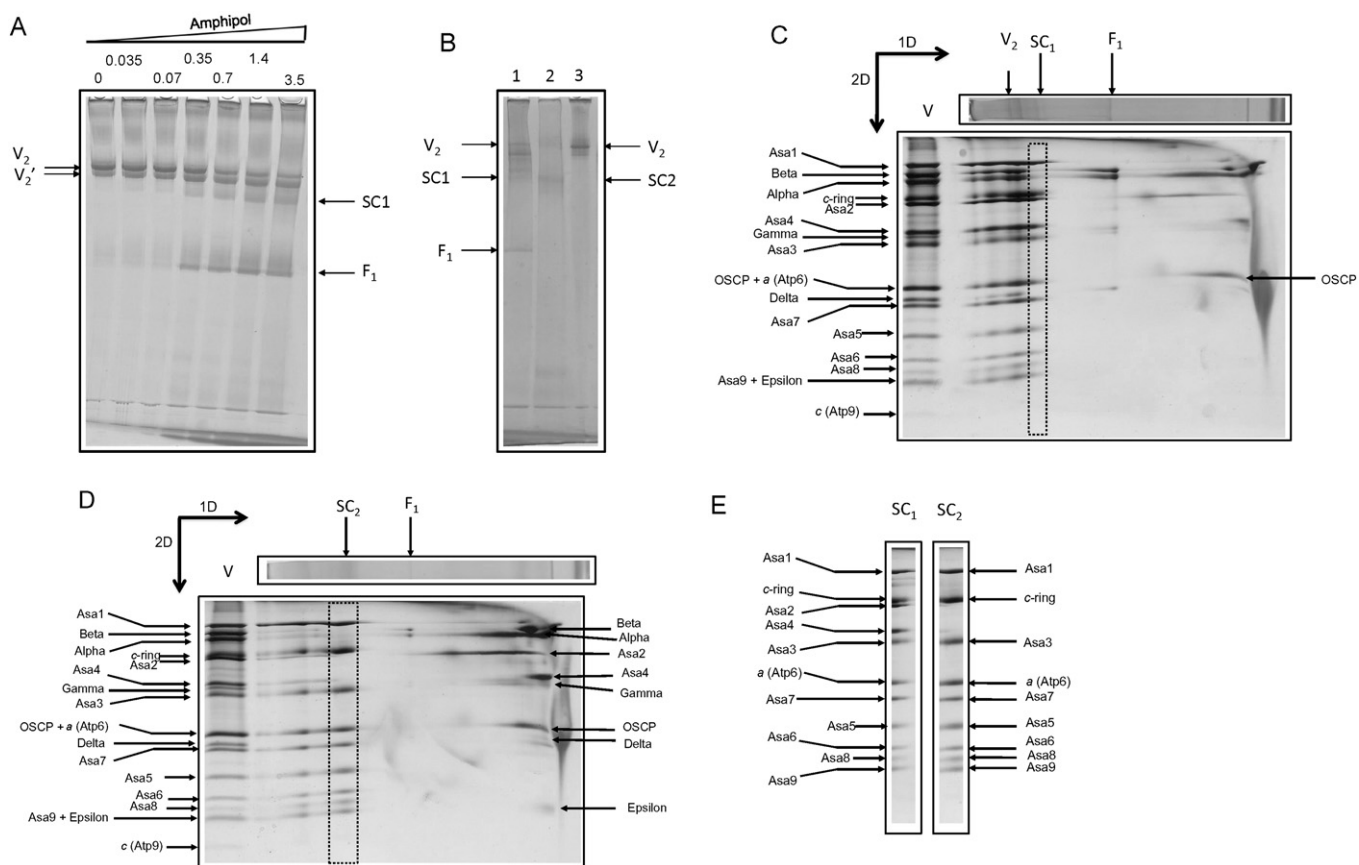


Fig. 3. Amphipol A8-35 dissociates the dimeric algal ATP synthase into discrete subcomplexes. A) BN-PAGE of purified ATP synthase samples [18] incubated for 40 min at 4 °C under mild agitation in the presence of Amphipol A8-35 (Anatrace) at the indicated increasing concentrations (% w/v). One hundred micrograms of protein was loaded in each lane. The control lane in the absence of the detergent is labeled 0. Dimer (V_2), F_1 sector (F_1), and subcomplex (SC1) are indicated. V_2' denotes an isoform of the algal ATP synthase with a different electrophoretic migration, whose subunit composition is identical to the one of V_2 . B) BN-PAGE of purified ATP synthase samples (50 μ g of protein in each lane) incubated with or without Amphipol A8-35. Lane 1: sample incubated in the presence of 3.5% Amphipol A8-35 for 40 min; lane 2: sample incubated in the presence of 3.5% Amphipol A8-35 for 24 h; lane 3: control ATP synthase without treatment. Dimer (V_2), F_1 sector (F_1), and subcomplexes SC1 and SC2 are indicated. C) Silver-stained 2D gel of an ATP synthase sample incubated for 40 min in the presence of 3.5% Amphipol A8-35. D) Silver-stained 2D gel of an ATP synthase sample incubated for 24 h in the presence of 3.5% Amphipol A8-35. E) Identity of the subunits that form the SC1 and SC2 subcomplexes. Gels were taken from the 2D polypeptide patterns shown in panels C and D.

was formed (Fig. 3D). The population of free F_1 was much smaller, and the dissociated subunits α , β , γ , δ , ϵ , Asa2, Asa4 and OSCP were found to migrate towards the front of the BN-PAGE polypeptide pattern. The subunit composition of the two Amphipol A8-35-generated subcomplexes SC1 and SC2 is shown in Fig. 3E. Their identities were assigned by their apparent molecular masses as Asa1 (66.1 kDa),

c-ring (45.5 kDa), Asa2 (45.3 kDa), Asa3 (32.9 kDa), subunit a (25.1 kDa), Asa7 (19.0 kDa), Asa5 (13.9 kDa), Asa6 (13.1 kDa), Asa8 (9.9 kDa) and Asa9 (11.0 kDa). The apparent molecular masses of the SC1 and SC2 subcomplexes are of 681 and 528 kDa respectively, suggesting that these subcomplexes are dimeric. Upon Amphipol A8-35 treatment, the dimeric enzyme liberates OSCP and its F_1 sectors to

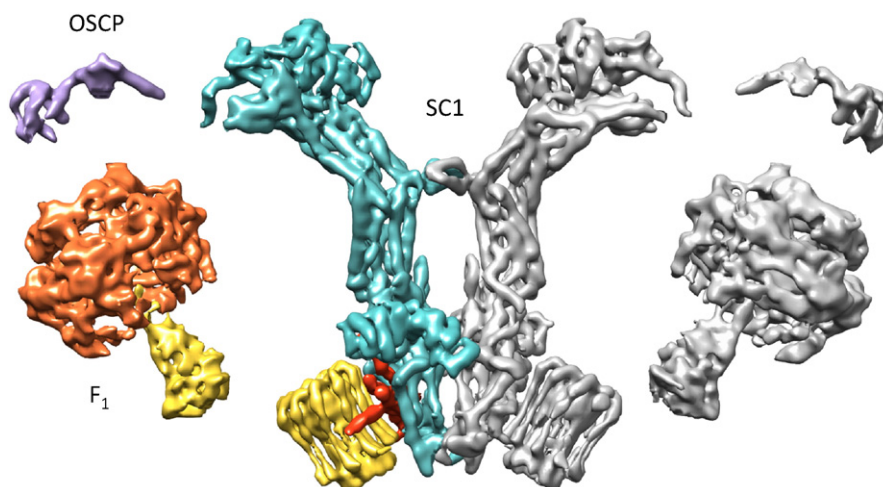


Fig. 4. Model showing the dissociation of the ATP synthase induced by Amphipol A8-35. The model illustrates the dissociation of the algal ATP synthase by Amphipol A8-35 (40 min incubation) to form the dimeric SC1 subcomplex after the dissociation of the F_1 sector and subunit OSCP.

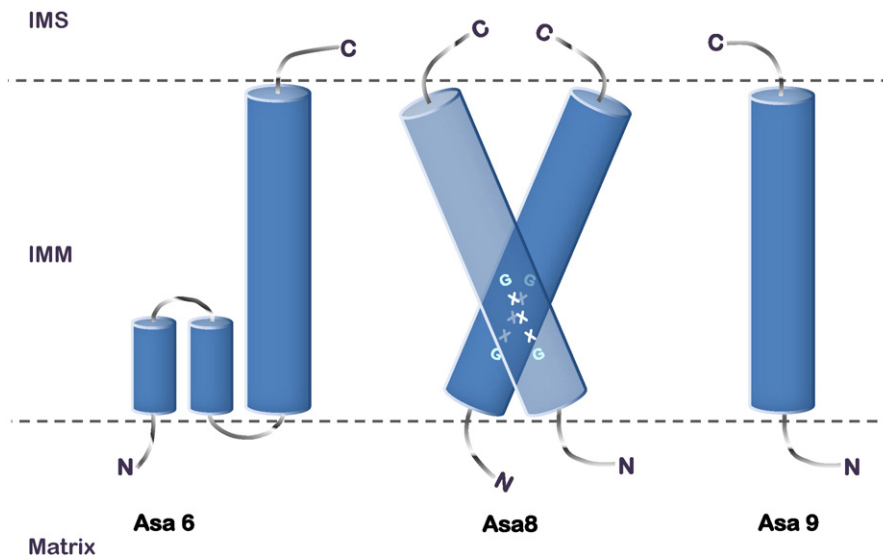


Fig. 5. Hydrophobicity-based models of the individual subunits involved in the membrane-embedded dimerization domain. Several algorithms predict the Asa8 and Asa9 subunits with a single TMS. The GxxxG motif in the Asa8 subunit could prompt its dimerization. The predicted models for Asa6 vary with the different programs used: one TMS, two TMS, or one TMS with a reentrant helix (depicted).

form the SC1 subcomplex (illustrated in Fig. 4), while longer polymer treatment additionally releases the Asa2 and Asa4 subunits and forms the SC2 subcomplex (not shown). Thus, it seems that Amphipol A8-35 does not destabilize the membrane-embedded subunits of complex V, but destabilizes other extrinsic components, mainly OSCP, Asa2 and Asa4. It is notable that subunit Asa7 remains bound to the dimeric SC2 subcomplex even after the dissociation of the Asa2 and Asa4 subunits, most probably attaching to Asa1. It is therefore tempting to speculate that Asa7 is the extrinsic protein bridge that unites the peripheral stalks of the algal model observed in the 3-D model of the *Polytomella* sp. ATP synthase [45].

3.4. The dimerization domain of the algal mitochondrial ATP synthase

Only small-molecular mass polypeptides of the algal ATP synthase seem to be embedded in the membrane: subunits Asa6, Asa8 and Asa9 are predicted to have transmembrane stretches (TMS), two, one and one, respectively [33].

The stoichiometry of all the Asa subunits in the algal ATP synthase has not been established yet. An estimated stoichiometry based on cysteine-labeling fluorescent probes revealed a 1:1:1 stoichiometry for subunits Asa3:Asa4:Asa5 per monomer [42], although this assessment was limited to those subunits that contain at least one cysteine residue.

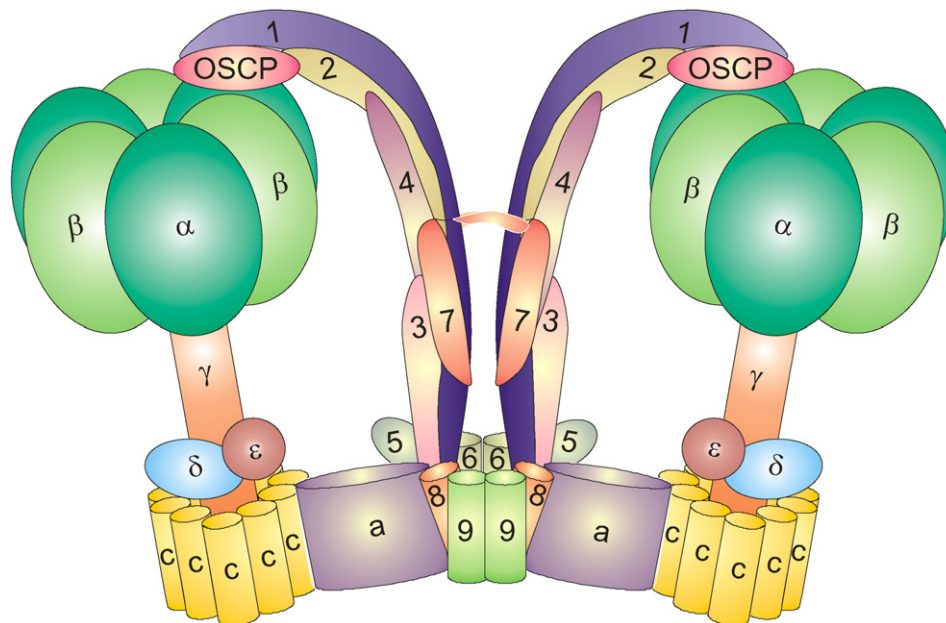


Fig. 6. Arrangement of subunits in the algal mitochondrial ATP synthase. The model is consistent with the data summarized in this article and illustrates the dimeric enzyme with a colored subunit composition. Letters denote the conserved ATP synthase subunits, while numbers refer to Asa subunits (Asa1–Asa9). Subunits Asa6, 8 and 9 form the dimerization module, while the rest of them are constituents of the peripheral stalks.

Cross-sections through the membrane domains of the electron cryo-microscopy map of the algal enzyme show the four horizontal-embedded helices of subunit *a*, the c_{10} -ring and six additional trans-membrane helices per monomer [45]. These six TMS could be ascribed, in principle, to the fifth vertical α -helix of subunit *a* [56], the two reentrant helices and one TMS of subunit *Asa6*, one TMS of *Asa8*, and one TMS of *Asa9* (Fig. 5). *Asa8* may be instrumental for the dimerization of the enzyme, since it contains a GxxxG domain, which is a weak predictor of membrane protein dimerization [62]. The presence of GxxxG domains in subunits *e* and *g* is known to play an important role in dimerizing the yeast ATP synthase [63–65].

All the above mentioned data can be summarized in an updated model for the topological disposition of the 17 polypeptides that constitute the algal enzyme (Fig. 6).

4. Perspectives

A regulatory protein that may control the ATPase activity of the algal enzyme has not been characterized yet. Nevertheless, one of its subunits is expected to have a regulatory role similar to subunit IF_1 in mitochondrial enzymes [66], to the γ -proteobacterial ϵ subunit [67] or to the α -proteobacterial ζ subunit [68].

Many biochemical data have been obtained on the *Asa* subunits arrangement in the peripheral stalk, but to elaborate a more precise model of organization and to validate or invalidate the model in Fig. 6, high resolution structural data is needed. In the model available to date [45], it is still not possible to pin-point unambiguously the individual *Asa* subunits.

All the subunits of the chlorophycean mitochondrial ATP synthases are nucleus-encoded, since no gene encoding any complex V polypeptide has been found in the mitochondrial genomes of these algae [69,70]. It is of interest to learn how all the nucleus-encoded subunits, especially the *Asa* subunits, are imported into mitochondria and how they assemble to form the very large, 1600 kDa algal complex V.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This paper is dedicated to our Emeritus Professor Marietta Tuena-Sangri (IFC, UNAM), for always providing us unfading encouragement and support. Research in our group is being supported by the grant 245486 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique (F.R.S.–FNRS) (Mexico-Belgium). Additional support was received from grants 239219 and 239487 (CONACyT, Mexico), IN203311-3 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA–UNAM, Mexico) and from the Belgian F.R.S.–FNRS (MIS F.4520, FRFC 2.4597, CDR J.0032). CONACyT also supports the Ph.D. studies of LC.-T. and LS.-V. (fellowships 599282 and 290733 respectively, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) and the Masters studies of F.V.D. (fellowship 660082, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM).

References

- [1] M. Alfonso, M.A. Kandrach, E. Racker, Isolation, characterization, and reconstitution of a solubilized fraction containing the hydrophobic sector of the mitochondrial proton pump, *J. Bioenerg. Biomembr.* 13 (1981) 375–391.
- [2] G. Oster, H. Wang, Rotary protein motors, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 114–121.
- [3] G. Arselin, J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M.F. Giraud, A. Dautant, D. Brèthes, J. Velours, The modulation in subunits *e* and *g* amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40392–40399.
- [4] J.E. Walker, V.K. Dickson, The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 286–296.
- [5] A. Wächter, Y. Bi, S.D. Dunn, B.D. Cain, H. Sielaff, F. Wintermann, S. Engelbrecht, W. Junge, Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 3924–3929.
- [6] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps, *Cell* 93 (1998) 1117–1124.
- [7] J.R. Gledhill, J.E. Walker, Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Biochem. J.* 386 (2005) 591–598.
- [8] A.G. Stewart, L.K. Lee, M. Donohoe, J.J. Chaston, D. Stock, The dynamic stator stalk of rotary ATPases, *Nat. Commun.* 3 (2012) 687.
- [9] V.K. Dickson, J.A. Silvester, I.M. Fearnley, A.G. Leslie, J.E. Walker, On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase, *EMBO J.* 25 (2006) 2911–2918.
- [10] H. Seelert, N.A. Dencher, ATP synthase superassemblies in animals and plants: two or more are better, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 1185–1197.
- [11] D. Thomas, P. Bron, T. Weimann, A. Dautant, M.F. Giraud, P. Paumard, B. Salin, A. Cavalier, J. Velours, D. Brèthes, Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase, *Biol. Cell.* 100 (2008) 591–601.
- [12] M. Strauss, G. Hofhaus, R.R. Schröder, W. Kühlbrandt, Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane, *EMBO J.* 27 (2008) 1154–1160.
- [13] P. Paumard, J. Vaillier, B. Coulary, J. Schaeffer, V. Soubannier, D.M. Mueller, D. Brèthes, J.P. di Rago, J. Velours, The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology, *EMBO J.* 21 (2002) 221–230.
- [14] I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert, R.A. Stuart, H. Schagger, Yeast mitochondrial F1Fo-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits, *EMBO J.* 17 (1998) 7170–7178.
- [15] R. Fronzes, T. Weimann, J. Vaillier, J. Velours, D. Brèthes, The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of *e* and *g* subunits, *Biochemistry* 45 (2006) 6715–6723.
- [16] A. Zikova, A. Schnauffer, R.A. Dalley, A.K. Panigrahi, K.D. Stuart, The F(0)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000436.
- [17] E. Perez, M. Lapaille, H. Degand, L. Cilibrasi, A. Villavicencio-Quejjeiro, P. Morsomme, D. González-Halphen, M.C. Field, C. Remacle, D. Baurain, P. Cardol, The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic *Trypanosomatidae*, *Mitochondrion* 19 (Pt B) (2014) 338–349.
- [18] M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle, D. González-Halphen, The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex, *J. Bioenerg. Biomembr.* 38 (2006) 271–282.
- [19] N.P. Balabakaran, N.V. Dudkina, L.A. Kane, J.E. van Eyk, E.J. Boekema, M.W. Mather, A.B. Vaidya, Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*, *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000418.
- [20] S.J. Couoh-Cardel, S. Uribe-Carvajal, S. Wilkens, J.J. García-Trejo, Structure of dimeric F1Fo-ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 36447–36455.
- [21] M.D. Herron, J.D. Hackett, F.O. Aylward, R.E. Michod, Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 3254–3258.
- [22] E. Rodríguez-Salinas, C. Remacle, D. González-Halphen, Green Algae Genomics: A Mitochondrial Perspective, in: L. Maréchal-Drouard (Ed.), *Mitochondrial Genome Evolution, Advances in Botanical Research*, Volume 63, Elsevier Inc., San Diego 2012, pp. 187–214.
- [23] E. Rodríguez-Salinas, H. Riveros-Rosas, Z. Li, K. Fucíková, J.J. Brand, L.A. Lewis, D. González-Halphen, Lineage-specific fragmentation and nuclear relocation of the mitochondrial *cox2* gene in chlorophycean green algae (Chlorophyta), *Mol. Phylogenet. Evol.* 64 (2012) 166–176.
- [24] P. Cardol, D. González-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R.F. Matagne, C. Remacle, The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project, *Plant Physiol.* 137 (2005) 447–459.
- [25] M. Lapaille, A. Escobar-Ramírez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodríguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. González-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F1Fo-ATP synthase and role of *Asa7* protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 1630–1644.
- [26] L. Colina-Tenorio, H. Miranda-Astudillo, A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, Subunit *Asa1* spans all the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* (2015 Nov 30), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.11.012> [pii: S0005-2728(15)00244-3, Epub ahead of print].
- [27] A. Atteia, C. de Vitry, Y. Pierre, J.L. Popot, Identification of mitochondrial proteins in membrane preparations from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 226–234.
- [28] A. Atteia, Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *C. R. Acad. Sci. III.* 317 (1994) 11–19.
- [29] L.G. Franzén, G. Falk, Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension, *Plant Mol. Biol.* 19 (1992) 771–780.
- [30] G. Nurani, L.-G. Franzén, Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit, *Plant Mol. Biol.* 31 (1996) 1105–1116.
- [31] E.B. Gutiérrez-Cirlos, A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, R. Coria, D. González-Halphen, A highly active ubiquinol-cytochrome c reductase (bc1 complex) from the

- colorless alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas*. Characterization of the heme binding site of cytochrome *c*₁, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9147–9154.
- [32] A. Attea, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the F₁F₀-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 275–284.
- [33] R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Attea, New insights into the unique structure of the F₁F₀-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1190–1199.
- [34] H. Schagger, Native Gel Electrophoresis, in: G. von Jagow, H. Schagger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego 1994, pp. 81–104.
- [35] S. Funes, E. Davidson, M.G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M.P. King, D. González-Halphen, The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F₁F₀-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6051–6058.
- [36] R. van Lis, A. Attea, G. Mendoza-Hernández, D. González-Halphen, Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach, *Plant Physiol.* 132 (2003) 318–330.
- [37] N.V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, H.P. Braun, Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5769–5772.
- [38] L. Jansch, V. Kruft, U.K. Schmitz, H.P. Braun, New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria, *Plant J.* 9 (1996) 357–368.
- [39] S. Guerrero-Castillo, M. Vázquez-Acevedo, D. González-Halphen, S. Uribe-Carvajal, In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 75–85.
- [40] S.S. Merchant, S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, S.J. Karpowicz, G.B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L.K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W.F. Marshall, L.H. Qu, D.R. Nelson, A.A. Sanderfoot, M.H. Spalding, V.V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S.M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.L. Chen, V. Cognat, M.T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P.A. Lefebvre, S.D. Lemaire, A.V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J.V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A.M. Nedelcu, K. Niyogi, S.V. Novoselov, I.T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.P. Ral, D.M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroder, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S.L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M.R. Lamb, H. Ledford, J.C. Long, J. Minagawa, M.D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A.M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C.L. Dieckmann, V.N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R.T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y.W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez, W.C. Ngau, B. Otiliar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I.V. Grigoriev, D.S. Rokhsar, A.R. Grossman, The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions, *Science* 318 (2007) 245–250.
- [41] P. Cardol, F. Figueroa, C. Remacle, L.-G. Franzén, D. González-Halphen, Oxidative phosphorylation: building blocks and related components, in: David B. Stern (Ed.) *The Chlamydomonas Sourcebook*, Organellar and Metabolic Processes, Volume 2, Elsevier Inc., San Diego 2009, pp. 469–502.
- [42] A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, A. Villavicencio-Queijeiro, F. Figueroa-Martínez, H. Miranda-Astudillo, Y. Cordeiro, J.A. Mignaco, D. Foguel, P. Cardol, M. Lapaille, C. Remacle, S. Wilkens, D. González-Halphen, Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1439–1448.
- [43] A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vázquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gómez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scofano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 1–13.
- [44] A. Villavicencio-Queijeiro, J.P. Pardo, D. González-Halphen, Kinetic and hysteretic behavior of ATP hydrolysis of the highly stable dimeric ATP synthase of *Polytomella* sp, *Arch. Biochem. Biophys.* 575 (2015) 30–37.
- [45] M. Allegretti, N. Klusch, D.J. Mills, J. Vonck, W. Kühlbrandt, K.M. Davies, Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a -subunit of an F-type ATP synthase, *Nature* 521 (2015) 237–240.
- [46] S. Liu, T.J. Charlesworth, J.V. Bason, M.G. Montgomery, M.E. Harbour, I.M. Fearnley, J.E. Walker, The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species, *Biochem. J.* 468 (2015) 167–175.
- [47] J. Symersky, D. Osowski, D.E. Walters, D.M. Mueller, Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 13961–13965.
- [48] L.A. Baker, I.N. Watt, M.J. Runswick, J.E. Walker, J.L. Rubinstein, Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 11675–11680.
- [49] W.C. Lau, L.A. Baker, J.L. Rubinstein, Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase, *J. Mol. Biol.* 382 (2008) 1256–1264.
- [50] C. Mellwig, B. Böttcher, A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18544–18549.
- [51] I. Ogilvie, S. Wilkens, A.J. Rodgers, R. Aggeler, R.A. Capaldi, The second stalk: the delta-b subunit connection in ECF1F₀, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643 (1988) 169–175.
- [52] N.V. Dudkina, S. Sunderhaus, H.P. Braun, E.J. Boekema, Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3427–3432.
- [53] M. Lapaille, M. Thiry, E. Perez, D. González-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, Loss of mitochondrial ATP synthase subunit beta (Atp2) alters mitochondrial and chloroplastic function and morphology in *Chlamydomonas*, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1533–1539.
- [54] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohann, H.P. Braun, E.J. Boekema, Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 272–277.
- [55] E. Morales-Ríos, M.G. Montgomery, A.G. Leslie, J.E. Walker, Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 13231–13236.
- [56] A. Zhou, A. Rohou, D.G. Schep, J.V. Bason, M.G. Montgomery, J.E. Walker, N. Grigoriev, J.L. Rubinstein, Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM, *Elife* (2015), <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10180>.
- [57] H. Miranda-Astudillo, A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, L. Colina-Tenorio, L.A. Downie-Velasco, P. Cardol, C. Remacle, L. Domínguez-Ramírez, D. González-Halphen, Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (2014) 1–13.
- [58] J. Velours, G. Arselin, The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase, *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 (2000) 383–390.
- [59] M. Fritz, V. Müller, An intermediate step in the evolution of ATPases—the F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis, *FEBS J.* 274 (2007) 3421–3428.
- [60] F. Mayer, J.K. Lim, J.D. Langer, S.G. Kang, V. Müller, Na⁺ transport by the A1AO-ATP synthase purified from *Thermococcus onnurineus* and reconstituted into liposomes, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 6994–7002.
- [61] J.L. Popot, Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions, *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 737–775.
- [62] M.G. Teese, D. Langosch, Role of GxxxG motifs in transmembrane domain interactions, *Biochemistry* 54 (2015) 5125–5135.
- [63] G. Arselin, M.F. Giraud, A. Dautant, J. Vaillier, D. Brèthes, B. Couly-Salin, J. Schaeffer, J. Velours, The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1875–1884.
- [64] D.M. Bustos, J. Velours, The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 29004–29010.
- [65] S. Saddar, R.A. Stuart, The yeast F₁F₀(O)-ATP synthase: analysis of the molecular organization of subunit g and the importance of a conserved GXXXG motif, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24435–24442.
- [66] M.J. Van Raaij, G.L. Orriss, M.G. Montgomery, M.J. Runswick, I.M. Fearnley, J.M. Skehel, J.E. Walker, The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence, *Biochemistry* 35 (1996) 15618–15625.
- [67] R. Iino, R. Hasegawa, K.V. Tabata, H. Noji, Mechanism of inhibition by C-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of *Escherichia coli* FoF₁-ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 17457–17464.
- [68] M. Zarco-Zavala, E. Morales-Ríos, G. Mendoza-Hernández, L. Ramírez-Silva, G. Pérez-Hernández, J.J. García-Trejo, The ζ subunit of the F₁F₀-ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure, *FASEB J.* 28 (2014) 2146–2157.
- [69] C. Vahrenholz, G. Riemen, E. Pratje, B. Dujon, G. Michaelis, Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication, *Curr. Genet.* 24 (1993) 241–247.
- [70] D.R. Smith, J. Hua, R.W. Lee, Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*, *Curr. Genet.* 56 (2010) 427–438.
- [71] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER suite: protein structure and function prediction, *Nat. Methods* 12 (2015) 7–8.
- [72] D.M. Rees, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 21597–21601.
- [73] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [74] A. Zhou, A. Rohou, D.G. Schep, J.V. Bason, M.G. Montgomery, J.E. Walker, N. Grigoriev, J.L. Rubinstein, Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM, *Elife* 4 (2015), <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10180> (pii: e10180).

© 2017 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 20(2): 29-47, 2017.

DOI: 10.1016/j.recqb.2017.04.004

TOPOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LAS SUBUNIDADES INTRÍNSECAS DE LA MEMBRANA DE LAS F_1F_0 -ATP SINTASA MITOCONDRIALES

Lorenzo Sánchez-Vásquez¹ y Diego González-Halphen²

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Apartado Postal 70-600, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

E-mails: ¹lsanchez@ifc.unam.mx, ²dhalphen@ifc.unam.mx

RESUMEN

La F_1F_0 -ATP sintasa es un complejo enzimático que se encuentra ampliamente distribuido en las membranas transductoras de energía. Todas las ATPasas, incluidas las mitocondriales, cloroplastídicas y bacterianas, comparten similitudes estructurales y funcionales. Sin embargo, hay diferencias en su composición que dependen de la especie, siendo más compleja en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* o *Bos taurus*. Es por ello que una mejor comprensión de la estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa contribuirá a un mayor conocimiento a nivel molecular tanto de la función como de la regulación de este complejo enzimático. En la actualidad, se sabe muy poco acerca de la organización estructural de las subunidades de la región F_0 . Considerando lo anterior, en este trabajo se presenta información concerniente a las proteínas intrínsecas del dominio F_0 de las ATP sintasas más investigadas a la fecha, así como de algunas otras subunidades de membrana que se encuentran presentes en organismos menos estudiados.

Palabras Clave: algas clorofíceas, estructura, F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial, proteínas membranales, subunidades atípicas.

Topology and function of the membrane-embedded proteins of the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase

ABSTRACT

The F_1F_0 -ATP synthase is a complex widely distributed in energy-transducing membranes. All ATPases, including the mitochondrial, chloroplastic and bacterial, share structural and functional similarities. However, there are differences in their composition that depend on the species, being more complex in organisms such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Bos taurus*. This is why, a better understanding of the F_1F_0 -ATP synthase structure will contribute to a greater knowledge at a molecular level, both of the function, and the regulation of this enzymatic complex. At present, very little is known about the structural organization of the subunits from the F_0 domain. Considering the former, this paper presents information concerning the intrinsic membrane proteins from the most researched F_1F_0 -ATP synthases to date, as well as some other membrane subunits present in less studied organisms.

Key Words: chlorophycean algae, structure, mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase, membrane proteins, atypical subunits.

INTRODUCCIÓN

La F_1F_0 -ATP sintasa, F_1F_0 -ATPasa o complejo V (EC 3.6.3.14) produce la mayoría del ATP celular en los eucariontes y en las bacterias. Este complejo enzimático se encuentra en las membranas transductoras de energía, como la membrana interna mitocondrial, la membrana tilacoidal del cloroplasto, y la membrana plasmática bacteriana (Domínguez-Ramírez & Tuena de Gómez-Poyou, 2003) (Figura 1). En eucariontes, la ATP sintasa utiliza el potencial electroquímico generado por los complejos de la cadena respiratoria o fotosintética para sintetizar ATP (Leyva *et al.*, 2003). En bacterias, esta enzima puede aprovechar como fuerza impulsora tanto el gradiente de protones como el de iones sodio, como en *Propionigenium modestum* y *Acetobacterium woodii* (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996).

Por otra parte, según las condiciones de la fuerza protón-motriz, la F_1F_0 puede funcionar como ATP sintasa (síntesis de ATP) o ATPasa (hidrólisis de ATP), dicha regulación está determinada por la disponibilidad de los sustratos ADP y Pi, así como por el potencial electroquímico (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996). Otro regulador importante de la ATP sintasa mitocondrial, exclusivo de eucariontes, es la proteína inhibidora (IF_1). En bovino, la IF_1 es una proteína básica de 84 aminoácidos capaz de inhibir la actividad del complejo enzimático en condiciones que favorecerían la hidrólisis de ATP, previniendo así el abatimiento de la función mitocondrial en ausencia del potencial electroquímico (Domínguez-Ramírez & Tuena de Gómez-Poyou, 2003). En este sentido, la ATP sintasa bacteriana posee un mecanismo similar, a través de un cambio conformacional de la subunidad ϵ , que impide la rotación del complejo enzimático y de esta forma auto inhibe la rotación de la enzima en el sentido de la hidrólisis de ATP (García-Trejo *et al.*, 2012).

Las F_1F_0 -ATPasas, incluidas las mitocondriales, las cloroplastídicas y las bacterianas, se organizan en dos regiones estructural y funcionalmente distintas: a) un dominio membranal (F_0), que participa en la translocación de iones (protones o sodio) y está compuesto básicamente por dos subunidades (a y c); y b) un dominio extrínseco de membrana (F_1), que contiene los sitios catalíticos (subunidades α y β) (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1992); estos dominios se encuentran unidos a través de un tallo central (subunidades γ y ϵ) y un brazo periférico (subunidad b en la ATPasa de *Escherichia coli*, subunidad b y b' en las bacterias fotosintéticas, así como en la del cloroplasto; subunidad b , d , y F_6 en la enzima mitocondrial; subunidad δ en la ATP sintasa bacteriana y cloroplastídica; subunidad *OSCP* en la ATPasa mitocondrial, mientras que el resto de las subunidades varía de acuerdo a la especie) (Figura 1) (Soubannier *et al.*, 1999; Walker, 2013; Claggett *et al.*, 2007).

En cuanto a la síntesis de ATP, estudios funcionales y estructurales han mostrado que el canal de protones F_0 y la parte catalítica F_1 se acoplan estructural y funcionalmente, en donde los protones atraviesan la membrana por un hemicanal formado entre las subunidades a y la subunidad c , los residuos funcionalmente importantes son la arginina o glutamina 239 de la subunidad a y el aspártico o glutámico 61 del anillo de subunidades de c , provocando el giro del anillo de proteolípidos formado por la subunidad c (Figura 2). Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades γ y ϵ) en movimientos sucesivos de 120° , provocando cambios conformacionales alternados consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades α y β) e induciendo la unión de los sustratos (ADP y Pi), así como la síntesis y la liberación del ATP de acuerdo al mecanismo de cambio de unión propuesto por Boyer (Itoh *et al.*, 2004).

El complejo enzimático de *E. coli*, la ATP sintasa estructuralmente más sencilla que se conoce, contiene ocho subunidades: las subunidades α , β , γ , δ y ϵ que constituyen el dominio F_1 , mientras que las subunidades a , b_2 y c_{10-12} conforman el dominio F_0 (Foster & Fillingame, 1982). En contraste al número de proteínas que constituyen a la ATP sintasa bacteriana, la composición polipeptídica de la enzima de otros organismos, como *Saccharomyces cerevisiae* o *Bos taurus*, es más compleja, presentando por lo menos 13 y 16 subunidades respectivamente (Tabla I) (Walker, 2013). En lo que respecta a la composición del brazo periférico, la ATPasa mitocondrial está compuesta por cuatro subunidades: b , d , F_6 y *OSCP* (homólogo a la subunidad δ bacteriana). En el caso de la levadura, una sola subunidad b interactúa con las subunidades: 4 , 8 , d , f y h . Adicionalmente, en el dominio membranal de la enzima de bovino y en el de la levadura se encuentran las proteínas: e , g , i (conocida también como j y k), las cuales se han llamado supernumerarias, debido a que parecen no estar involucradas directamente en la síntesis de ATP, ya que no están presentes en la enzima bacteriana (Figura 1) (Fronzes *et al.*, 2006).

Estudios sobre la resolución de la estructura cristalina de la F_1 -ATPasa intacta, se han frenado por la tendencia del complejo enzimático a disociarse cuando se extrae de la membrana. Sin embargo, un número de modelos atómicos se han obtenido para diversas regiones de la enzima de bovino y levadura (Jiko *et al.*, 2015), incluyendo el dominio F_1 (Abrahams *et al.*, 1994), el subcomplejo F_1 -anillo de subunidad c (Stock *et al.*, 1999), y la región del brazo periférico (Dickson *et al.*, 2006; Rees *et al.*, 2009). También hay información estructural de las enzimas de *E. coli* (Cingolani & Duncan, 2011; Roy *et al.*, 2012), *Caldalkalibacillus thermarum* (Stocker *et al.*, 2007), *Geobacillus stearothermophilus* (anteriormente *Bacillus* PS3) (Shirakihara *et al.*, 2015) y de la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans* (Figuras 3 y 4) (Morales-Ríos *et al.*, 2015).

En la actualidad, se sabe muy poco acerca de la organización estructural de las subunidades de la región F_0 . Hasta ahora, no

Subunidad	<i>E. coli</i> ^(1,2)	<i>S. cerevisiae</i> ⁽³⁾	<i>B. taurus</i> ⁽³⁾	Sector
α	<i>atpA</i> (55.4)	<i>ATP1</i> (54.9)	<i>ATP5A1</i> (55.2)	F ₁
β	<i>atpD</i> (50.4)	<i>ATP2</i> (51.1)	<i>ATP5B</i> (51.7)	
γ	<i>atpG</i> (31.5)	<i>ATP3</i> (30.6)	<i>ATP5C1</i> (30.2)	
δ	<i>atpH</i> (19.3)	<i>ATP16</i> (14.5)	<i>ATP5D</i> (15)	
ϵ	<i>atpC</i> (14.3)	<i>ATP15</i> (6.6)	<i>ATP5E</i> (5.6)	
OSCP		<i>ATP5</i> (20.8)	<i>ATP5O</i> (20.9)	
IF ₁		<i>INH1</i> (7.3)	<i>ATP1F₁</i> (9.5)	
<i>a</i>	<i>atpB</i> (30.1)	<i>ATP6</i> (27.8)	<i>MT-ATP6</i> (24.7)	F ₀
<i>b</i>	<i>atpF</i> (17.2)	<i>ATP4</i> (23.2)	<i>ATP5F1</i> (24.6)	
<i>c</i>	<i>atpE</i> (8.2)	<i>ATP9</i> (7.7)	<i>ATP5G1-3</i> (7.6)	
<i>d</i>		<i>ATP7</i> (19.6)	<i>ATP5H</i> (18.5)	
<i>e</i>		<i>ATP21</i> (10.7)	<i>ATP5I</i> (8.1)	
<i>f</i>		<i>ATP17</i> (10.5)	<i>ATP5J2</i> (10.1)	
<i>g</i>		<i>ATP20</i> (12.9)	<i>ATP5L</i> (11.2)	
<i>h</i>		<i>ATP14</i> (10.4)		
<i>i (j)</i>		<i>ATP18</i> (6.6)		
<i>k</i>		<i>ATP19</i> (7.5)		
F ₆			<i>ATP5J</i> (8.9)	
δ (A6L)		<i>ATP8</i> (5.8)	<i>MT-ATP8</i> (7.9)	
AGP o DAPIT			<i>USMG5</i> (6.3)	
Proteína MLQ			<i>MP68</i> (6.8)	
Factor B			<i>ATP5S</i> (20.3)	
<i>Stf1</i>		<i>STF1</i> (7.2)		
<i>Stf2</i>		<i>STF2</i> (9.4)		
<i>Sfl2</i>		<i>TMA10</i> (9.7)		

En la Tabla se describe la composición polipeptídica y la distribución de las subunidades de la ATP sintasa de diferentes organismos, en donde se indica su nomenclatura y el gen que la codifica, así como su peso molecular estimado (kDa). ¹Foster & Fillingame, 1982; ²Godinot & Di Pietro, 1986; ³Wittig & Schägger, 2008.

Tabla I. Proteínas y subunidades asociadas a la F₁F₀-ATP sintasa de bacteria, levadura y bovino.

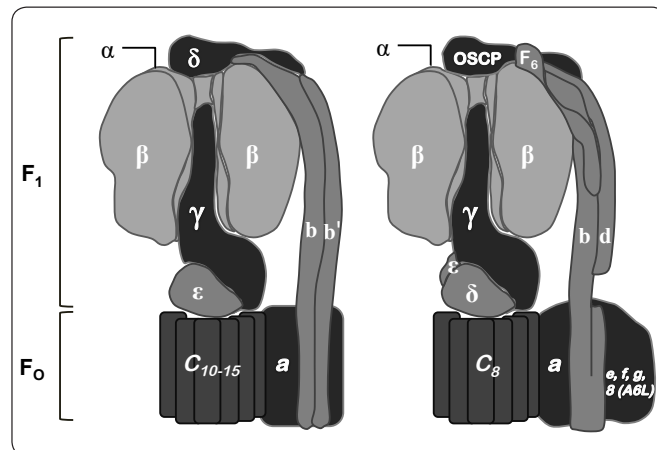


Figura 1. Organización polipeptídica de las F₁F₀-ATP sintasas. Las F-ATPasas bacterianas y cloroplastídicas se muestran a la izquierda, mientras que la mitocondrial se encuentra a la derecha. La parte superior de cada modelo contiene a las subunidades catalíticas (α, β, γ) del dominio F₁. Una de las tres subunidades α ha sido removida para exponer a la subunidad γ , cabe resaltar que ésta abarca desde el eje central del dominio catalítico hasta el anillo de subunidad *c* y la subunidad *a*. De igual forma, el brazo periférico de cada modelo se muestra a la derecha. En algunas bacterias está compuesto por la subunidad δ y el dímero de subunidad *b*. Mientras que en otras especies bacterianas, así como en la enzima cloroplastídica, las dos subunidades *b* son copias homólogas, pero no idénticas (subunidad *b* y *b'*). En la enzima mitocondrial, el brazo periférico lo componen una copia de las subunidades *b*, *d* y *F₆*. El dominio membranal de la enzima mitocondrial contiene subunidades con una hélice transmembranal (*e*, *f*, *g*, *h* (A6L)), entre otras descritas en la Tabla I), las cuales no se encuentran en las ATPasas bacterianas y cloroplastídicas. Modificado de Walker, 2013.

se ha purificado a homogeneidad el dominio membranal de la ATPasa, ni su composición polipeptídica y tampoco establecido con certeza (Collinson *et al.*, 1994). Considerando lo anterior, en este trabajo se presenta información concerniente a las proteínas intrínsecas del dominio F₀ de las ATP sintasas más investigadas a la fecha, así como de algunas otras subunidades de membrana que se encuentran presentes en organismos menos estudiados.

Dominio membranal de la F₁F₀-ATP sintasa

Como se mencionó, en contraste con el detallado modelo estructural para el dominio F₁ de la ATPasa de diferentes especies, la composición de subunidades y la información estructural del sector F₀ no es claro, en particular para la enzima mitocondrial. No obstante, todas las especies estudiadas a la fecha presentan tres subunidades comunes conocidas como *a*, *b* y *c* (Stock *et al.*, 1999). Por este motivo, en principio se describirá la información estructural de estas subunidades, y posteriormente se abordarán las otras subunidades intrínsecas de membrana de la enzima. Hasta el momento, uno de los complejos enzimáticos más estudiados, gracias al empleo de agentes entrecruzadores y a

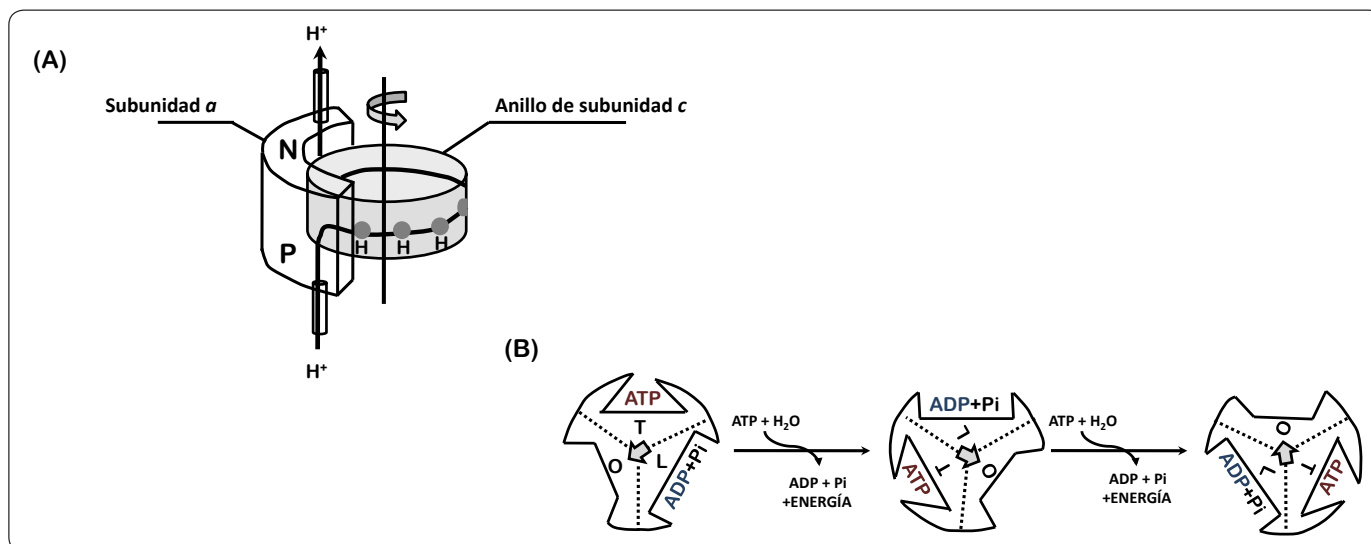


Figura 2. Mecanismo de la síntesis de ATP. (A) Los protones atraviesan la membrana del lado positivo (P) hacia el lado negativo (N) a favor del gradiente electroquímico a través de un hemicanal formado entre las subunidades α y el anillo de subunidades c generando una rotación en la dirección indicada (flecha). Cada subunidad c contiene un residuo de aspártico o glutámico (círculo gris), el cual es importante para la translocación de iones. (B) Las tres subunidades catalíticas β adquieren diferentes estados conformacionales durante la síntesis de ATP: abierta (O), semiabierto (L) y cerrado (T). Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP y a su vez se capta ADP y fosfato. Con la unión de los sustratos, la subunidad cambia a una conformación semiabierto, posteriormente en este sitio se lleva a cabo la reacción de formación del ATP y uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite alternadamente en cada una de las subunidades β que componen el dominio catalítico de la enzima. Modificado de Walker, 2013; Stewart *et al.*, 2013.

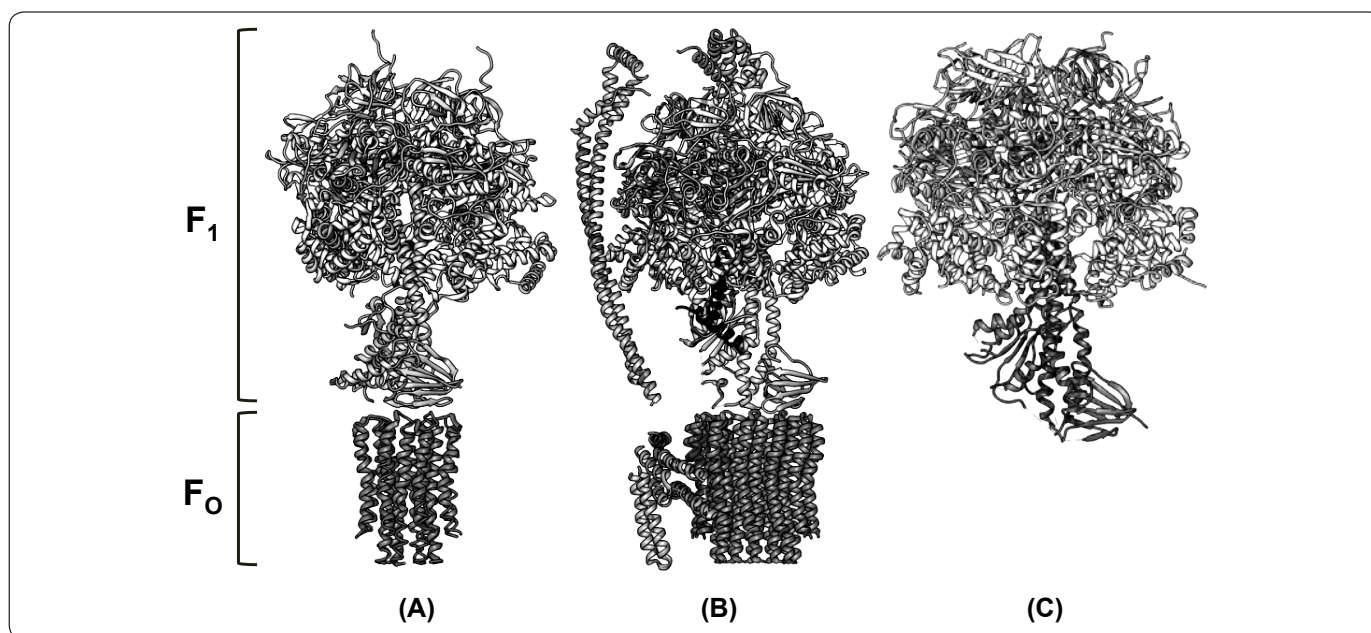


Figura 3. Comparación estructural de la ATP sintasa de diferentes organismos. A la izquierda de la figura se indica la región correspondiente al dominio F_1 y F_0 para cada modelo presentado como una estructura de tipo listón. (A) Estructura cristalográfica del subcomplejo F_1 -subunidad c_2 de la ATPasa de bovino (3.5 Å de resolución, No. PDB 2XND). (Modificado de Rees *et al.*, 2009). (B) Estructura de la ATP sintasa de *P. denitrificans* obtenida por difracción de rayos X (3.98 Å de resolución, No. PDB 5DN6). (Morales-Ríos *et al.*, 2015). (C) Estructura cristalográfica de la F_1 -ATPasa de *Bacillus PS3* (TF_1) (3.9 Å de resolución, No. PDB 4XD7). (Modificada de Shirakihara *et al.*, 2015). Cada uno de los modelos comprende a las subunidades del dominio catalítico (α_3 , β_3) y el rotor central (γ , ϵ). Adicionalmente, en el modelo estructural de (A) se representa a la subunidad δ y el anillo de subunidades c . Mientras que en (B), la estructura cristalográfica comprende el brazo periférico (δ , b_1b_2), el inhibidor (ζ) y el anillo de subunidades c .

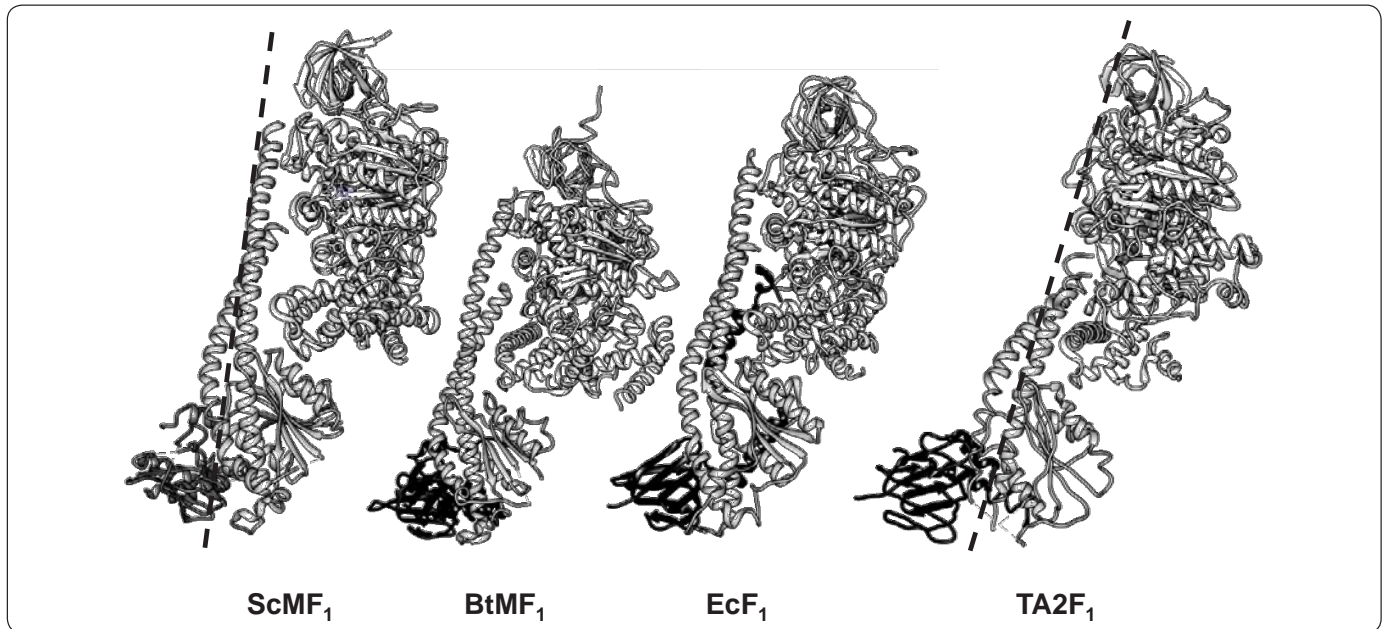


Figura 4. Comparación estructural de la F₁-ATPasa de diferentes organismos. Modelos tridimensionales atómicos representados como diagramas de listón. Estructuras cristalográficas de los sub-complejos F₁-c₈ de la ATP sintasa de *S. cerevisiae* (ScMF₁, 6.5 Å, No. PDB 3ZYR) y el sub-complejo F₁-c₈ de *B. taurus* (BtMF₁, 3.5 Å, No. PDB 2XND); así como del sector F₁ de la ATPasa de las especies bacterianas *E. coli* (EcF₁, 3.26 Å, No. PDB 3OAA) y *Bacillus* sp. TA2.A1 (TA2F₁, 3 Å, No. PDB 2QE7). En cada modelo se muestra a las subunidades α , β , γ y ϵ . Asimismo, se compara el grado de torsión (línea punteada) del ScMF₁ con respecto al de la bacteria termófila (TA2F₁). Modificado de Stocker *et al.*, 2007.

las técnicas de ingeniería genética, es el de *E. coli* (EF₁EF₀-ATP sintasa). Los genes que codifican para las subunidades del dominio F₁ y F₀ se encuentran en un único operón, el operón *atp* o *unc* (Godinot & Di Pietro, 1986). El complejo enzimático está compuesto por ocho subunidades: cinco en la región F₁ con una estequiometría de $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ y una masa molecular de ~382 kDa, y tres subunidades en F₀ con la estequiometría de ab_2c_{10-12} con una masa molecular de ~148 kDa (Tabla I). Los ocho genes estructurales de este operón están precedidos por un noveno gen, denominado *atpI*, que se ha encontrado en todos los operones que codifican a las ATPasas bacterianas secuenciados hasta el momento y codifica para una proteína básica hidrofóbica, identificada como Vma21p, que quizá participe en el correcto ensamblaje de la enzima (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996).

Topología y función de las subunidades del complejo F₀

Subunidad c

La subunidad c, también conocida como proteolípido, se ha secuenciado a partir de diversas fuentes y posee una serie de características comunes: tiene una masa molecular de 8.3 kDa, y debido a su carácter hidrofóbico es soluble en disolventes orgánicos. Forma un oligómero dispuesto como un anillo embebido en la membrana, en donde cada una de las subunidades que lo componen se pliega como una horquilla con dos alfa hélices unidas por una región polar tipo bucle, expuesta hacia el lado citoplásmico de las bacterias o de la matriz mitocondrial

y encima de esta estructura se ubican las subunidades γ/ϵ (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996).

Existen varias líneas de evidencia que sugieren la interacción de la subunidad c con estas últimas subunidades. Una de ellas se basa en las mutaciones realizadas en la región tipo bucle, en donde se observó que el acoplamiento entre la subunidad c y la región F₁ se ve afectado principalmente en las posiciones Arg41, Asn42 y Pro43 de la subunidad c. Por otra parte, estudios de entrecruzamiento con sustituciones dobles de cisteína en la posición 31 de la subunidad ϵ y en los residuos Ala40, Asn42 y Pro43 de la subunidad c han revelado una posible interacción de estas subunidades. Además, se demostró que en una región que va de la Thr26 a la Gly33 los residuos de cisteína presentes en la subunidad ϵ interactúan con los residuos de cisteína introducidos en las posiciones Ala40, Gln42 y Asp44 de la subunidad c. De igual forma, se determinó una posible interacción de la subunidad γ mediada por su residuo Tyr205 y los aminoácidos Gln42, Pro43 y Asp44 de la región tipo bucle de la subunidad c. Estos resultados sugieren que probablemente la subunidad γ y ϵ interactúan con un conjunto diferente de subunidades del anillo de c, lo que indica que los residuos de esta región se encuentran lo suficientemente expuestos al dominio F₁, como se propone en los estudios con agentes entrecruzadores, así como en los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) (Figuras 5 y 6) (Fillingame & Dmitriev, 2002; Altendorf *et al.*, 2000).

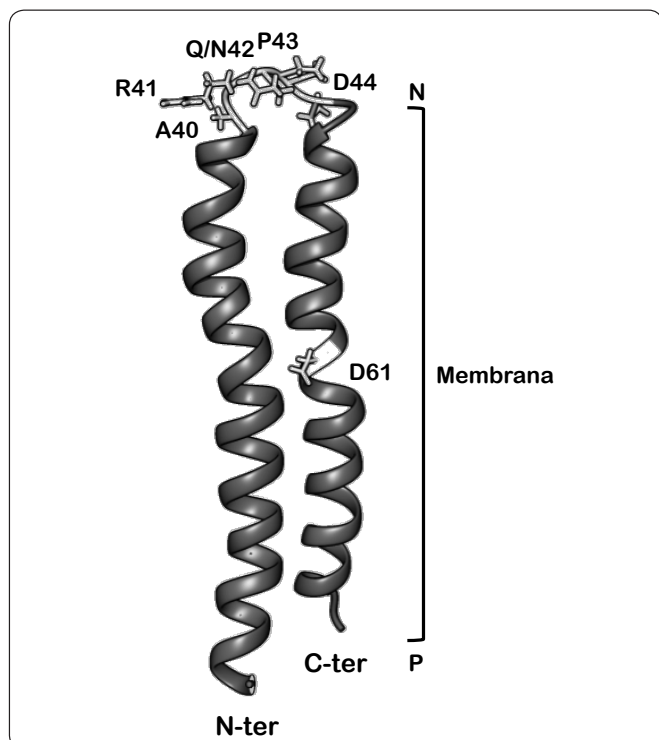


Figura 5. Representación de la estructura tipo horquilla de la subunidad *c* bacteriana sugerido por estudios de RMN a pH 5. Se indica la orientación de la estructura en la membrana, lado positivo (P) y lado negativo (N), así como del extremo amino (N-ter, proyectado al frente) y carboxilo terminal (C-ter, proyectado hacia el fondo). Asimismo, se muestran las posiciones de los residuos clave discutidos en el texto. Las coordenadas PDB de la estructura son 1C0V. Modificada de Girvin *et al.*, 1998; Fillingame & Dmitriev, 2002.

En la región carboxilo terminal se encuentra el aminoácido Asp61, el cual desempeña un papel preponderante al protonarse aprovechando los iones que fluyen a través del hemicanal de la subunidad *a*. Esta idea es apoyada por la observación de que la translocación de protones se inhibe al modificar químicamente este residuo con dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) o al mutarlo por glicina o asparagina. Asimismo, se ha observado que los aminoácidos de la región tipo bucle, Ala40, Arg41, Gln/Asn42 y Pro43, se encuentran altamente conservados en las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos (Figura 5) (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1992).

A partir de imágenes cristalográficas del anillo de subunidades de *c* de la ATP sintasa de la levadura, así como de imágenes de microscopía de fuerza atómica y de microscopía electrónica de la enzima cloroplastídica y bacteriana, se ha visto que el oligómero de *c* está compuesto por 10, 14 y 11 subunidades respectivamente. Además, se ha observado que en *E. coli* dependiendo de las condiciones de crecimiento, la subunidad *c* puede presentar una estequiometría de 10-12 copias (Yoshida *et al.*, 2001).

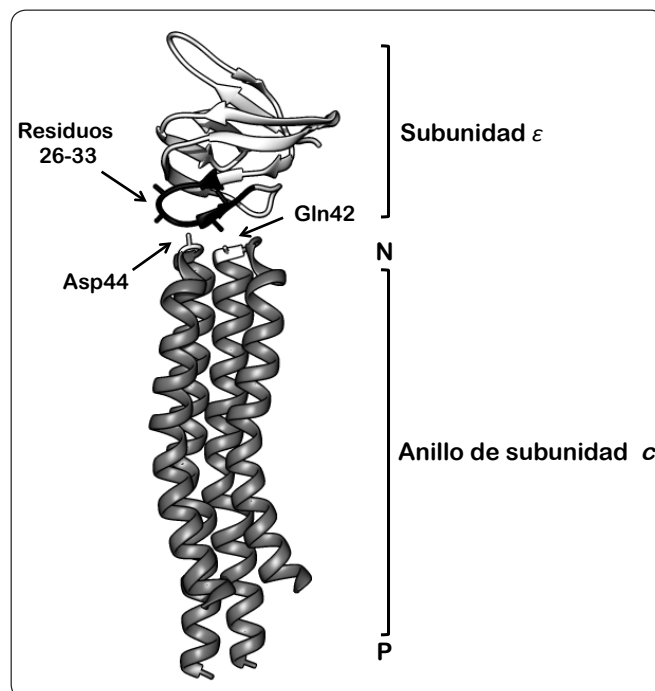


Figura 6. Modelo de la interacción entre el dominio tipo hoja beta de la subunidad ϵ y la región tipo bucle del anillo de subunidades de *c*. Esta representación se basa en los estudios de entrecruzamiento de ambas subunidades, discutidas en el texto, así como en los estudios de RMN. El aminoácido Gln42 de la subunidad *c* se encuentra proyectado al fondo, mientras que hacia el frente se muestra el residuo Asp44 (ambos residuos resaltados en color blanco). La región tipo bucle de la subunidad ϵ (residuos 26-33 en color negro), sugiere una posible interacción, ya sea con Gln42 o Asp44 de la subunidad *c*. P = lado positivo, N = lado negativo. Las coordenadas PDB de la estructura son 5T4O. Modificado de Fillingame & Dmitriev, 2002.

De modo que el número de subunidades que conforman el anillo de *c* puede ser de entre ocho a quince copias de la subunidad *c*, y en consecuencia este oligómero puede variar de acuerdo a la especie. Por ejemplo, se ha observado que las ATP sintasas de los eucariotas tienen anillos pequeños, mientras que las enzimas de los procariotas y los cloroplastos generalmente presentan anillos grandes, como en las cianobacterias que presentan un oligómero de 15 subunidades (Figura 7) (Nesci *et al.*, 2016).

Las estructuras cristalográficas del anillo de subunidades de *c* sugieren que la estequiometría del anillo es una adaptación para funcionar de manera óptima bajo las condiciones bioenergéticas predominantes. En consecuencia, cuando el potencial eléctrico de la membrana ($\Delta\phi$, gradiente eléctrico) es la fuerza dominante de conducción, por ejemplo en las mitocondrias, el tamaño del anillo es pequeño. Por el contrario, en los cloroplastos, en donde una gran diferencia en la concentración de protones (ΔpH , gradiente químico) se acompaña de una baja magnitud del valor $\Delta\phi$ la ATPasa presenta un anillo formado por un gran

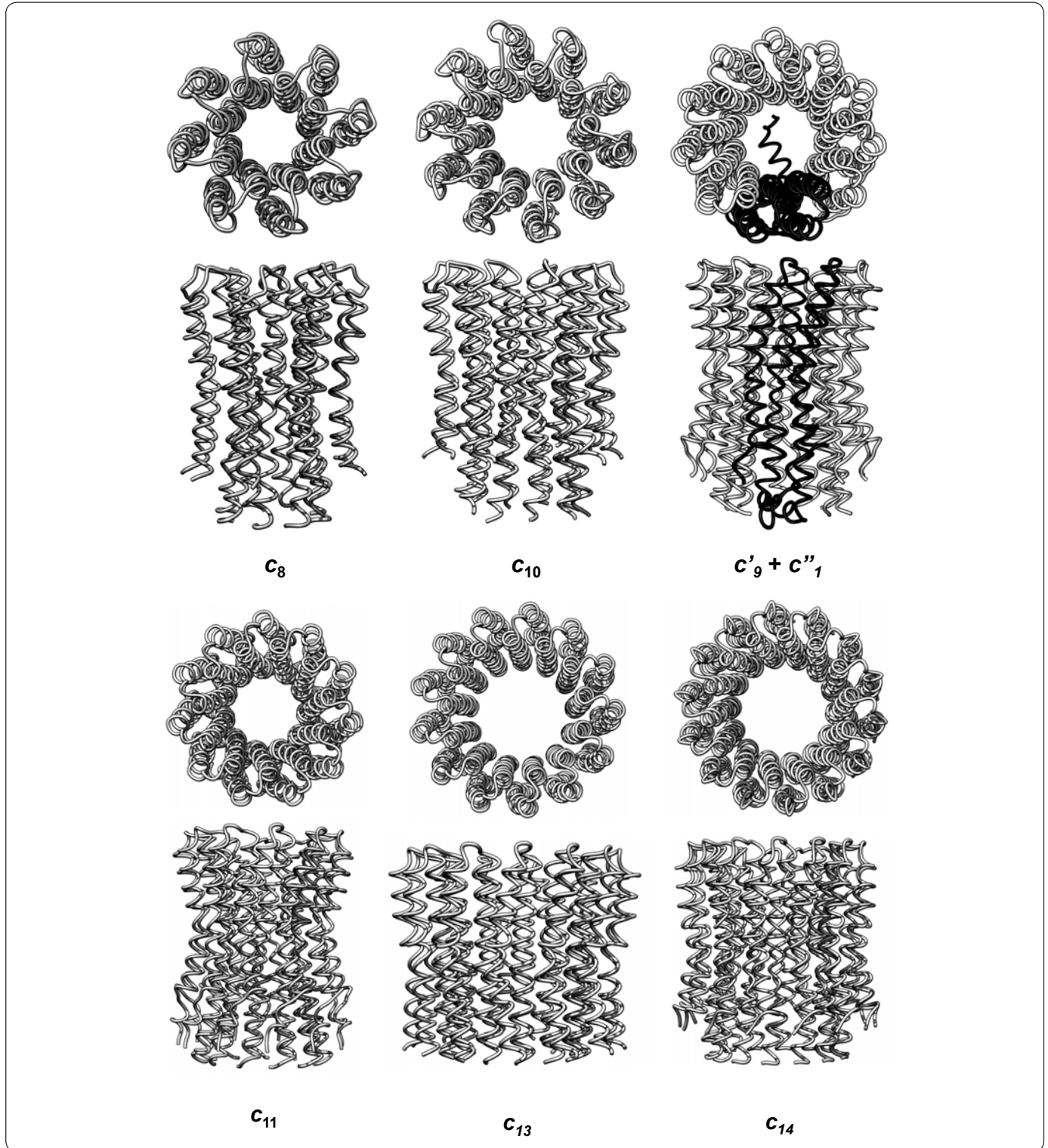


Figura 7. Comparación de la estructura del anillo de subunidades de c de diferentes organismos. Se muestra la vista superior y lateral de cada estructura oligomérica con su disposición espacial y el número de subunidades que componen a cada oligómero. Las imágenes de cristalografía de rayos X corresponden a: *Bos taurus* (2XND) [c₈], *Saccharomyces cerevisiae* (2XOK) [c₁₀], *Acetobacter woodii* (no homomérica, la subunidad c doble se resalta en negro, 4BEM) [c'₉+c''₁], *Ilyobacter tartaricus* (1YCE) [c₁₁], *Bacillus pseudofirmus* (2X2V) [c₁₃], y la cloroplastídica de *Spinacia oleracea* (2W5J) [c₁₄]. Los anillos de subunidad c de *I. tartaricus* y *A. woodii* unen iones Na⁺, mientras que los de *B. taurus*, *S. cerevisiae*, *B. pseudofirmus*, y *S. oleracea* unen iones H⁺ (número de acceso PDB entre paréntesis). Modificado de Nesci et al., 2016.

número de subunidades *c*, como en las cianobacterias con estequiometrías de hasta 15 copias. Al parecer esta diferencia en el número de subunidades *c* compensa la baja magnitud del valor $\Delta\phi$ (Nesci *et al.*, 2016).

Dado que una rotación completa del rotor de la ATP sintasa (360°) produce tres moléculas de ATP y que en cada rotación del anillo de *c* se translocan igual número de iones (protones o sodio) que subunidades que lo componen, el costo bioenergético para la ATP sintasa equivale al número de subunidades *c* dividido entre tres. Entonces, para la ATP sintasa mitocondrial de bovino, con un anillo de *c* de ocho subunidades es $8/3$ ó 2.7 protones por molécula de ATP. Siguiendo esta misma lógica, en otros organismos como las bacterias o los cloroplastos de plantas verdes, en donde se han observado tamaños de anillo de 10, 11, 13, 14 y 15 subunidades *c* (Figura 7), el costo bioenergético para la ATP sintasa sería de 4.3, 4.7, 5.3 y 6 protones por ATP producido respectivamente (incluyendo el H^+ extra que se requiere para la salida del ATP) (Walker, 2013).

Subunidad *b* bacteriana

En *E. coli* la subunidad *b* (17.3 kDa) es una proteína anfipática que se ha dividido en dominios funcionales. El primero de ellos es un dominio que atraviesa la membrana, formado por los 33 aminoácidos del extremo amino terminal, cuya función es anclar esta proteína a la bicapa lipídica. Otro dominio está compuesto por los residuos 53-122, el cual se ha mostrado que es el responsable de la interacción de las subunidades *b* para formar el dímero a través de los aminoácidos hidrofóbicos situados en esta región. Además, este segmento de la subunidad *b* se ha asociado a la formación de los dímeros de la ATP sintasa. Asimismo, en el extremo carboxilo se encuentra el dominio de unión a la región F_1 y la interacción se lleva a cabo por una de las subunidades *b* del dímero con la subunidad δ , mientras que el otro monómero lo hace con un par de subunidades α/β , apoyando la idea de que la subunidad *b* es el componente principal del estator del complejo enzimático. En este sentido, se ha observado que la presencia de la subunidad *b* es importante para el correcto ensamblaje de los dominios F_1 y F_0 . De igual forma, se ha determinado que el dímero de subunidades *b* es capaz de interactuar con las subunidades del sector F_0 y de esta forma los segmentos transmembranales de la subunidad *b*, aunado a la subunidad *a* y el anillo de subunidad *c*, son suficientes para que se forme el canal que permite la translocación de protones (Dmitriev *et al.*, 1999; Welch *et al.*, 2008; Aris *et al.*, 1985).

Considerando lo anterior, se ha propuesto un modelo de interacción del dominio membranar de la subunidad *b*, el cual se basa en los resultados obtenidos mediante el uso de entrecruzadores y estudios de RMN (Dmitriev *et al.*, 1999). Este modelo propone que las interacciones de los segmentos transmembranales se da entre los anillos aromáticos de los aminoácidos Phe14-Phe17', en donde cada residuo corresponde a un monómero de subunidad *b*, así como entre Phe17-Phe14'

con una distancia de interacción de 5 y 5.8 Å, respectivamente. Además, las hélices transmembranales están dispuestas en un ángulo de 23° y las interacciones de la interfaz de cada monómero principalmente son contactos de tipo Van der Waals, puesto que se compone por las cadenas laterales de los residuos Asn2, Thr6, Gln10, Phe14 y Phe17 (Figura 8) (Dmitriev *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que el residuo Arg36 se encuentra altamente conservado en las ATP sintasas bacterianas, lo que sugiere su probable participación en la interacción a nivel membranar (Welch *et al.*, 2008).

Subunidad *b* mitocondrial

En la levadura, la subunidad 4 está formada por 209 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 23.25 kDa. Esta proteína es homóloga a la subunidad *b* de la enzima bacteriana y a la subunidad *b* de la mitocondria de bovino (Tabla I). De acuerdo con métodos de predicción de la estructura secundaria, esta subunidad está compuesta por dos segmentos altamente hidrofóbicos en la región amino terminal y un sector carboxilo terminal con carácter anfipático. A partir de ensayos de proteólisis controlada con partículas submitocondriales, se concluyó que la

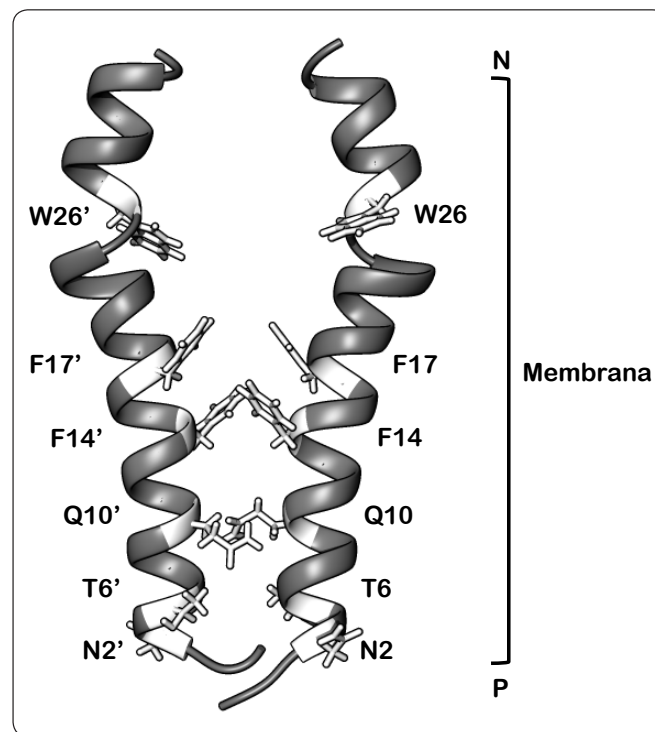


Figura 8. Modelo de interacción de los dominios transmembranales de la subunidad *b*. Las cadenas laterales de los aminoácidos tratados en el texto se muestran en color. Las cadenas laterales de los residuos de Phe14, Phe17, y Phe14', Phe17 interactúan en un grupo hidrofóbico. De igual forma, los residuos Asn2, Thr6, Gln10 y Asn2', Thr6', Gln10' establecen contactos tipo Van der Waals. Los anillos aromáticos de Trp26 y Trp26' se proyectan hacia la parte delantera y trasera de la estructura, respectivamente. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificado de Dmitriev *et al.*, 1999.

subunidad 4, al igual que su homólogo en bacteria, se localiza en la interfaz entre los dominios F_1 y F_0 (Paul *et al.*, 1989).

Por otra parte, se ha propuesto que la subunidad 4 desempeña una función importante durante la biogénesis del complejo V. Se ha visto que la interrupción del gen *ATP4* afecta la organización de los supercomplejos mitocondriales, así como la actividad de la citocromo oxidasa, disminuyendo su actividad aproximadamente una quinta parte en comparación con la cepa silvestre de la levadura (Paul *et al.*, 1989). En este sentido, estudios previos con mutantes en las cuales se eliminó el primer segmento transmembranal, muestran un fenotipo mutante nulo, al igual que como sucede con las mutantes de los genes *TIM11* o *ATP20*, es decir, un aumento en el tiempo de duplicación, carencia de formas diméricas de la ATP sintasa y una morfología mitocondrial alterada, aunado a la carencia de la subunidad *g*. Por el contrario, cuando se realizaron ensayos con mutantes que cuentan con los primeros 18 aminoácidos del N terminal lo anterior se revirtió. Estos resultados sugieren que al eliminar el primer cruce transmembranal de la subunidad 4 se pierde la interacción con la subunidad *g*, dando lugar al efecto observado (Soubannier *et al.*, 2002).

A partir de la información obtenida con las mutantes y los entrecruzadores, se ha sugerido un modelo topológico de la subunidad 4 (Figura 9), en donde se muestran los contactos entre la alfa hélice membranal de la subunidad 6, los dos segmentos

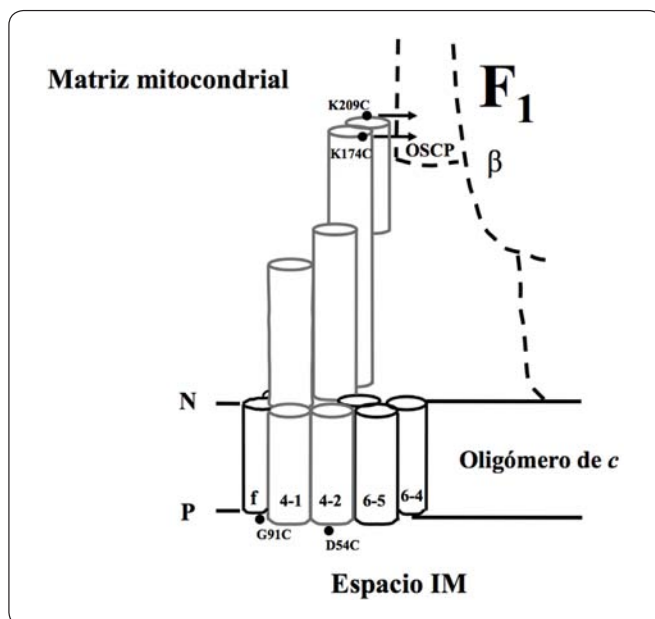


Figura 9. Modelo de topología de la subunidad 4 de levadura. Los cilindros representan alfa hélices. De estos, los grises representan a la subunidad 4. Los círculos negros son los residuos de cisteína que fueron introducidos por mutagénesis sitio dirigida. El residuo 209 es el último de la subunidad 4. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificado de Velours *et al.*, 2000.

hidrofóbicos de la subunidad 4 y el único cruce transmembranal de las subunidades *f*, *i* y *g* (estas dos últimas ubicadas detrás de la subunidad *f*). En la parte superior, se pueden observar las interacciones de la subunidad 4 con *OSCP* y la subunidad *beta* (Velours *et al.*, 2000).

Subunidad *a*

La subunidad *a* es una proteína extremadamente hidrofóbica con una masa molecular de 30.132 kDa, la cual se ha explorado por más de un centenar de sustituciones de monocisteína. Estudios previos de esta subunidad han mostrado que presenta cinco segmentos transmembranales, con el extremo amino y carboxilo terminal orientados hacia el lado citoplásmico bacteriano (lado negativo). De igual forma, se determinaron los aminoácidos clave en la translocación de protones y que están altamente conservados, como la Arg210 que se encuentra cercana al centro de la bicapa lipídica, algunos otros aminoácidos como la His245 y el Glu219, presentes en el lado periplásmico (lado positivo), y el Glu196 expuesto hacia el citoplasma. Por otra parte, se observó que los últimos diez residuos del carboxilo terminal son prescindibles para la función de la proteína. La subunidad *a* tiene dos bucles citoplásmicos, el primero de ellos contiene alrededor de 40 aminoácidos (60-103), mientras que el segundo presenta aproximadamente 35 aminoácidos (160-206). Adicionalmente, se ha propuesto que probablemente el primero de estos bucles interacciona con una o dos de las subunidades *b*, asimismo los segmentos transmembranales cuarto y quinto de la subunidad *a* están en contacto con dos subunidades *c* (Figura 10, panel A) (Vik & Ishmukhametov, 2005). Estudios recientes sugieren que la subunidad *a* presenta cuatro segmentos helicoidales horizontales y un cruce transmembranal vertical, formando dos hemicanales a través de los cuales se translocan los iones (Figura 10, panel B) (Nesci *et al.*, 2015; Allegretti *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015).

Este último hallazgo, la disposición casi horizontal de los segmentos alfa helicoidales hidrofóbicos de la subunidad *a* con respecto a la membrana, fue una sorpresa, ya que la evidencia experimental obtenida en las últimas dos décadas sugería que estas hélices se encontrarían dispuestas de manera perpendicular a la membrana, similar a las alfa hélices que componen el anillo de subunidades de *c*. Como se puede apreciar en el mapa de densidad electrónica para la F-ATPasa de *Polytomella* sp. (Figura 10), el hemicanal está formado por una interfaz entre la subunidad *a* y el oligómero de subunidades de *c* compuesta en su mayor parte por los residuos polares conservados, dando lugar a un canal acuoso a través del cual se translocan los protones (Kühlbrandt & Davies, 2016).

Mecanismo de la translocación de los protones

Las dos funciones opuestas de la F_1F_0 -ATP sintasa, síntesis (ATP sintasa) e hidrólisis de ATP (ATPasa), se basan en la capacidad del rotor, embebido en la membrana, de girar en dos direcciones contrarias. En condiciones fisiológicas, el

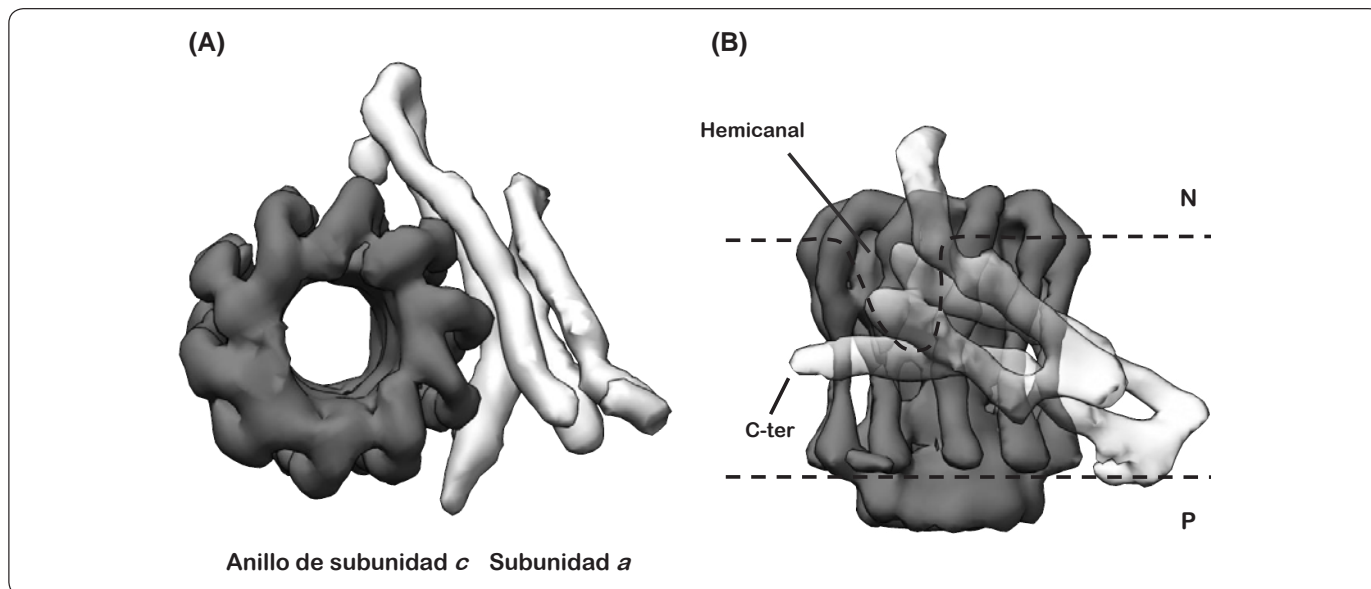


Figura 10. Modelo estructural del anillo de subunidades *c*-subunidad *a*. (A) Imágenes obtenidas por crió-microscopía electrónica (7.0 Å de resolución, no. de acceso EMD 2852) de un corte transversal a nivel de membrana del dominio F_0 de la ATP sintasa de *Polytomella* sp., en donde se muestra a la izquierda el anillo de subunidad *c* (negro) y a la derecha la densidad electrónica de las hélices horizontales membranales de la subunidad *a* (gris). En este modelo no se representa al amino terminal. (B) Vista lateral de (A), en donde se muestra al anillo de subunidad *c* al fondo (negro), y hacia el frente los segmentos alfa-helicoidales atravesando la membrana de manera horizontal (cuatro segmentos en gris). Se señala tanto el hemicanal formado por la interacción de ambas subunidades, así como la región carboxilo (C-ter) de la subunidad *a*. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificado de Allegretti *et al.*, 2015; Kühlbrandt & Davies, 2016.

mecanismo enzimático del complejo es la síntesis de ATP, este proceso se da a través de un acoplamiento quimio-mecánico que implica un movimiento de rotación del motor (F_0) impulsado por la fuerza protón motriz (Δp), dando lugar a la translocación de protones del lado positivo (P) de la membrana hacia el lado negativo (N) de la misma. Por el contrario, bajo condiciones anaerobias, bajo Δp , la enzima hidroliza el ATP para mover los protones en el sentido opuesto, sentido anti horario visto desde el dominio F_1 , restableciendo así el gradiente electroquímico de protones. El equilibrio termodinámico entre el potencial de fosforilación (ΔG_p) del ADP y el Δp determina cuál de estas dos actividades enzimáticas, síntesis o hidrólisis de ATP, se lleva a cabo por la ATP sintasa/ATPasa (Nesci *et al.*, 2015).

Los constituyentes fundamentales en la generación de la fuerza de torque son la subunidad *a* y el anillo de subunidades *c*. Estas subunidades cuentan con elementos que permiten la translocación de iones: la carga positiva de un grupo guanidinio de la Arg (altamente conservado) en la subunidad *a* y los grupos carboxilo de los residuos de Asp o Glu (dependiendo de la especie) del anillo de *c*, que permiten la unión de los protones gracias a su carga negativa. Estos sitios de protonación se encuentran cercanos a los hemicanales y son accesibles tanto del lado N como del P de la bicapa lipídica. En la dinámica de rotación del motor F_0 , cuando el Δp es lo suficientemente alto, el hemicanal que se encuentra expuesto en el lado P de

la membrana constituye la vía de entrada de los protones a los grupos carboxilo del oligómero de *c*. Una vez protonados, la subunidad *c* se vuelve menos polar y por lo tanto es capaz de entrar a la bicapa lipídica, manteniendo el residuo orientado hacia el centro del anillo del rotor, es decir, pasa de una conformación abierta a una cerrada, lo cual es favorecido energéticamente. Al mismo tiempo, una subunidad *c* con un grupo carboxilo neutralizado está expuesta en la cara del hemicanal que mira hacia el lado negativo de la membrana. Este entorno más hidrofílico favorece que el grupo carboxilo cambie a una conformación abierta que apunta hacia la subunidad *a*. En estas condiciones, el pH básico en el lado N de la membrana y la carga positiva de la Arg, dan lugar a reordenamientos estructurales que disminuyen el pKa de este grupo permitiendo el desprendimiento de protones. En consecuencia, el carboxilato desprotonado se estabiliza en la conformación abierta a través de puentes salinos con el aminoácido Arg, cuyo pKa mantiene al grupo guanidinio protonado con carga positiva. De esta forma, cuando un nuevo protón se enfrenta al hemicanal en el lado P, el sitio de unión carboxilato nuevamente cambia a la forma protonada, acompañado de un cambio en la conformación para iniciar un nuevo ciclo de rotación (Figura 11) (Nesci *et al.*, 2015).

Con respecto al mecanismo de translocación de iones, se ha observado un retraso en el movimiento de rotación de 50-175 μ s en la F-ATPasa de *E. coli*. Se ha propuesto que esta pausa es

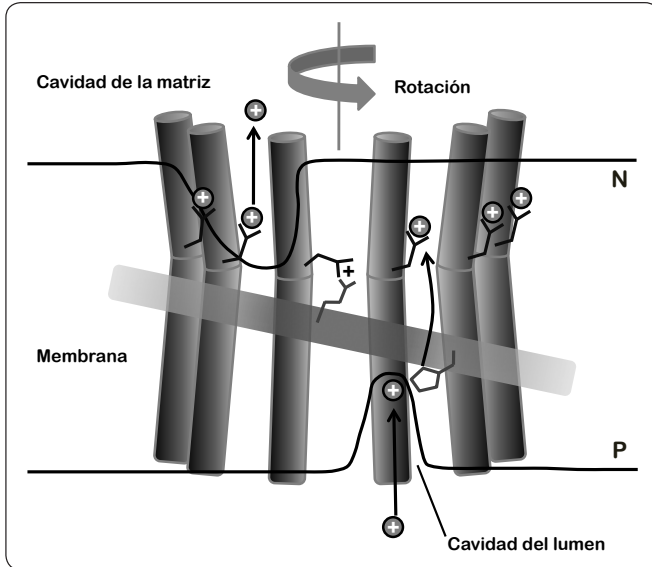


Figura 11. Modelo del proceso de translocación de los protones. Los protones, representados como un círculo negro con carga positiva, acceden al hemicanal al interactuar con el residuo de histidina (residuo ubicado en la parte inferior derecha del rectángulo) de la hélice horizontal membranal de la subunidad *a* (rectángulo horizontal) expuesta al lado de la cavidad luminal. Las flechas indican el canal propuesto mediante el cual los protones se abren paso a través de la bicapa lipídica. Los iones H^+ se unen a la conformación abierta del glutamato cargado (negro) de la subunidad *c* (cilindros en color oscuro). El mecanismo de protonación (cavidad del lumen), y desprotonación (cavidad de la matriz) dan lugar a la rotación del anillo de subunidad *c* (la flecha superior gris indica el sentido del giro). Este movimiento en sentido opuesto se evita por la presencia de arginina (residuo ubicado en la parte superior izquierda del rectángulo), ésta se encuentra a 2.5 vueltas de hélice (13.5 Å) por debajo del aminoácido glutámico. Esta distancia coincide con el espacio entre los sitios de protonación adyacentes en el anillo de subunidades de *c* de cualquier estequiometría conocida. De este modo, los residuos de arginina e histidina pueden interactuar al mismo tiempo con dos hélices adyacentes de subunidad *c* como se requiere para la translocación de protones. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificado de Kühlbrandt & Davies, 2016.

resultado de la interposición de las subunidades *c* adyacentes. Sin embargo, estudios recientes sugieren que este movimiento se debe a la formación de un puente salino, entre los residuos Glu196 de la subunidad *a* y Arg50 de la subunidad *c*. Asimismo, esta pausa podría ser determinante en la dirección del giro del anillo de subunidades *c* en el sentido de la síntesis o de la hidrólisis de ATP (Martin *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015).

Otras subunidades del dominio membranal de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial

Sin considerar su origen, la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial también se compone de dos grandes dominios funcionales, el sector hidrofílico F_1 y un dominio membranal F_0 , unidos por un tallo rotor central y un brazo periférico. Las ATPasas mitocondriales del bovino y la levadura son las más estudiadas

y las mejor caracterizadas en términos de estructura y función. La mayoría de las subunidades del complejo enzimático de la levadura son proteínas homólogas a la enzima de bovino, mientras que algunas otras son especie específicas (Lee *et al.*, 2015).

Con respecto a lo anterior, la ATP sintasa monómerica de levadura presenta 14 subunidades: $\alpha(3)$, $\beta(3)$, $\gamma(1)$, $\delta(1)$, $\epsilon(1)$, la subunidad 6 ó $a(1)$, $b(1)$, subunidad 9 ó $c(10)$, $d(1)$, $f(1)$, $h(1)$, i ó $k(1)$, subunidad $8(1)$, y $OSCP(1)$ con la estequiometría asignada (Tabla I). El peso molecular estimado de este complejo enzimático es de entre 572.759 kDa a 573.067 kDa considerando la formilación del amino terminal de las subunidades 8 y 9. En la ATPasa dimérica se encuentran tres proteínas adicionales, subunidades $i(k)$, e y g , conocidas también como subunidades específicas de dimerización, puesto que sólo se han observado en el dímero de la ATP sintasa. El peso molecular aproximado de la forma dimérica es de 1,207.916 kDa, asumiendo una estequiometría 1:1 para las subunidades de dimerización, o de 1,208.616 kDa tomando en cuenta nuevamente, la formilación de las subunidades 8 y 9, así como la acetilación de la subunidad e (Tabla I) (Wittig & Schägger, 2008).

Por el contrario, en la enzima de bovino las subunidades e y g se encuentran asociadas fuertemente a la ATPasa y se han podido aislar del monómero de la enzima. La forma monómerica está compuesta por 15 proteínas, subunidad $\alpha(3)$, $\beta(3)$, $\gamma(1)$, $\delta(1)$, $\epsilon(1)$, subunidad 6 ó $a(1)$, $b(1)$, subunidad 9 ó $c(10)$, $d(1)$, $e(1)$, $f(1)$, $g(1)$, $F_6(1)$, subunidad 8 ó $A6L(1)$, y $OSCP(1)$. Considerando la estequiometría asignada, la masa molecular de este complejo es de 583.422 kDa ó 583.573 kDa incluyendo las modificaciones postraduccionales del amino terminal. Recientemente, se han encontrado dos proteínas asociadas a la F-ATPasa mitocondrial de bovino y rata, la subunidad MLQ y la proteína AGP (Tabla I) (Wittig & Schägger, 2008).

Topología y función de las subunidades del complejo F_0 Subunidad 8

También llamada proteína A6L en bovino, es considerada un proteolípido debido a su solubilidad en disolventes orgánicos (cloroformo/metanol). Se ha dividido en tres dominios estructurales y funcionales: un dominio amino terminal conservado, una región hidrofóbica central y un extremo carboxilo terminal que presenta tres aminoácidos con carga positiva altamente conservados. Se ha descrito que los residuos 15-35 del dominio amino terminal se localizan en la membrana, orientados hacia el espacio intermembranal y debido a la conservación de esta región, se ha propuesto que estos aminoácidos son importantes para la correcta importación de la proteína. Por otro lado, estudios previos sugieren que los tres residuos con carga positiva del dominio carboxilo terminal son necesarios para el correcto ensamblaje de esta subunidad en el sector F_0 . La eliminación de los aminoácidos Arg37, Arg42 y Lys47 tiene un impacto severo tanto en el

ensamblaje de esta proteína, como en su importación *in vitro* y actividad de ATPasa *in vivo* (Devenish *et al.*, 1992; Grasso *et al.*, 1991).

Subunidad e

Esta subunidad es una proteína integral anclada a la membrana por un segmento hidrofóbico en el extremo amino. La subunidad e se compone de 96 aminoácidos (10.744 kDa), esta proteína presenta una topología N-adentro (matriz mitocondrial) C-fuera (espacio intermembranal) y tiene una estequiometría de 2 subunidades por cada subunidad γ de la ATPasa. La región amino terminal presenta el motivo GxxxG (Gly-15-Gly19), el cual se ha descrito participa en la formación de homo- o heterodímeros membranales (Everard-Gigot *et al.*, 2005; Brunner *et al.*, 2002). En este sentido, en *S. cerevisiae* se ha propuesto que la proteína Mgm1p se requiere para la regulación y estabilidad de la misma (Amutha *et al.*, 2004). La subunidad e y g de levadura están involucradas en los procesos de dimerización/oligomerización de la enzima (Figura 12). La eliminación de estas proteínas por ingeniería genética trae como consecuencia una morfología mitocondrial con pérdida de crestas, numerosas digitaciones y estructuras de tipo cebolla, lo que sugiere un vínculo entre la oligomerización del complejo enzimático y la arquitectura de las crestas mitocondriales (Arselin *et al.*, 2003; Arselin *et al.*, 2004).

Subunidad g

Esta proteína posee 115 aminoácidos y su extremo amino se encuentra orientado hacia la matriz mitocondrial y su corto dominio carboxilo está ubicado en el espacio intermembranal. Se ha identificado un motivo GxxxG (Gly101-Gly105) altamente conservado en distintos organismos, que se encuentra en la región que atraviesa la membrana y se ha demostrado que éste es el responsable de la participación de la subunidad g en la dimerización de la enzima (Bustos & Velours, 2005; Saddar & Stuart, 2005). Estudios anteriores empleando agentes entrecruzadores, mostraron que la formación del heterodímero *e+g* es específico del dímero de ATPasa, mientras que los homodímeros *e+e* y *g+g* se encuentran únicamente en las formas oligoméricas de la enzima (Fronzes *et al.*, 2006). Considerando lo anterior, se ha propuesto un modelo de interfaz, en donde dos subunidades 4 del complejo enzimático, una subunidad por monómero, participan en la formación de dos interfaz: una implica el dímero de la subunidad 4 y la otra corresponde a las subunidades e y g. Estas superficies de contacto no son independientes, puesto que la eliminación del extremo amino terminal de la subunidad 4 conduce a la pérdida de la subunidad g y de las formas oligoméricas de la enzima, mientras que el mismo efecto se presenta tras la pérdida de la subunidad e ó g (Figura 12) (Bustos & Velours, 2005).

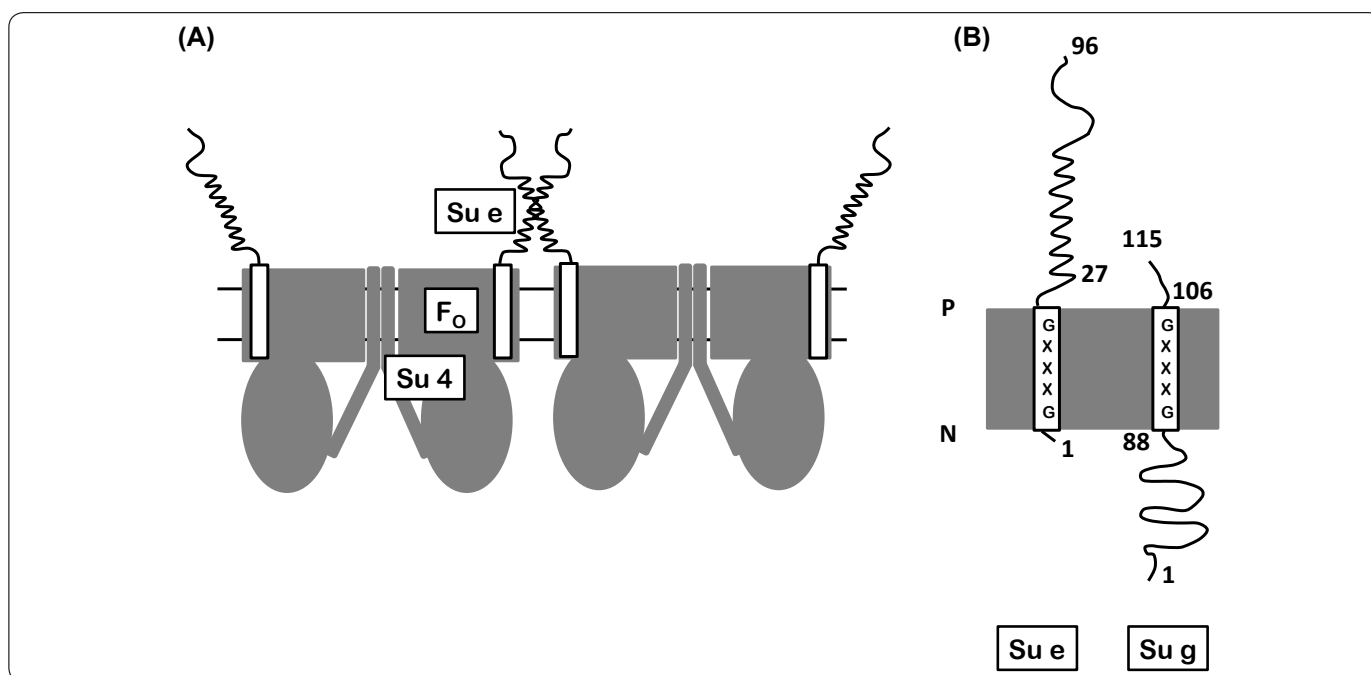


Figura 12. Modelo de la participación de las subunidades 4, e y g en el dímero de la ATP sintasa. (A) En este modelo, se representa la interacción del dímero de la subunidad e y la interacción de las subunidades *e+g* (hélices con un segmento membranal) estabilizando los contactos del sector F_o , además de la interacción de la subunidad 4 en cada uno de los monómeros de la enzima. Por simplicidad, en el modelo sólo se representa una hélice que corresponde al homodímero *e+e* y al heterodímero *e+g*. (B) Topología de membrana de las subunidades e y g. Se indica la orientación de cada subunidad de acuerdo al número de aminoácido correspondiente, igualmente se resalta el dominio GxxxG. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificado de Brunner *et al.*, 2002.

Subunidad *f*

La subunidad *f* es una proteína de 101 aminoácidos, que está codificada en el gen *ATP17* con un marco abierto de lectura de 303 pb. La subunidad madura se compone de 95 aminoácidos con una masa de 10.567 kDa. Es una proteína básica con un pI estimado de 9.98. Presenta 19 residuos básicos y 11 residuos ácidos. El análisis del perfil de hidrofobicidad muestra un segmento membranal putativo de 18 aminoácidos cercano al extremo carboxilo terminal (Spannagel *et al.*, 1997). Empleando agentes entrecruzadores, se determinó que presenta una topología N-dentro C-fuera. Estudios previos realizados con mutantes del gen *ATP17*, mostraron que al eliminar los últimos 28 aminoácidos de la secuencia, incluyendo el segmento membranal, la actividad de la ATPasa disminuía dos veces en comparación a la cepa silvestre (Roudeau *et al.*, 1999).

Subunidades *ij*, *k*, *l*

La subunidad *i*, también llamada *j*, está codificada en el gen *ATP18*, tiene 59 aminoácidos y una masa molecular estimada de 6.687 kDa. Es una proteína de la membrana interna mitocondrial que presenta una topología N-dentro C-fuera. Análisis de alineamientos múltiples de secuencia determinaron que tiene homólogos en *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL número de acceso Z99753), *Neurospora crassa* (GenBank número de acceso AI329387) y *Caenorhabditis elegans* (GenBank con números de acceso AF067943.1 22.834 a 22.974). La mutante del gen *ATP18* no afecta el crecimiento en medio no fermentable, lo que sugiere que no es esencial para la función de la enzima de levadura (Paumard *et al.*, 2000). Estudios previos con entrecruzadores demostraron la interacción de los heterodímeros *i+i*, *i+f*, *i+d*, así como la interacción de los subcomplejos *i+6+f* e *i+6+d* (Figura 13). El homodímero de la subunidad *i* se ha demostrado participa en la oligomerización de la enzima de levadura (Paumard *et al.*, 2002).

Recientemente dos nuevas proteínas, llamadas *k* (descrita en *S. cerevisiae*) y *l* (reportada en *Y. lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Pichia angusta* y *S. cerevisiae*), se han asociado al dominio F₀. Análisis bioinformáticos sugieren que ambas presentan su extremo carboxilo expuesto al espacio intermembranal y su función putativa está relacionada al ensamblaje del complejo enzimático (Arnold *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2015). En las levaduras, las subunidades *k* e *i* estabilizan al dímero de la F₁F₀-ATP sintasa (Wagner *et al.*, 2010).

Factor B y proteína TMEM70

El factor b de bovino no tiene homólogos en procariontes ni una contraparte en la levadura, parece unirse del lado de la matriz de la membrana interna mitocondrial y no parece tener una función reguladora. Además, de la vía de translocación de protones clásica descrita para el dominio F₀, se ha propuesto que la región membranal de los mamíferos podría albergar una segunda vía de translocación de los protones, formada a partir del ensamblaje de las subunidades *e*, *f*, *g* y *A6L*, así como por

los segmentos transmembranales del acarreador ADP/ATP. También, se ha sugerido que este factor puede ocluir esta segunda vía de translocación de protones favoreciendo así la actividad de la ATP sintasa. Sin embargo, no se sabe con detalle su función dentro del complejo F₀ (Jonckheere *et al.*, 2012).

La proteína transmembrana 70 (TMEM70) de bovino tiene una masa molecular aproximada de 21 kDa. Análisis de fracciones submitocondriales han demostrado que TMEM70 se asocia con la membrana interna mitocondrial. Se ha mostrado que esta proteína se requiere para mantener los niveles normales de expresión y actividad del complejo V. Aunque no se ha determinado una interacción directa con el complejo enzimático, se ha propuesto una unión transitoria con la enzima. TMEM70 es una proteína poco abundante, y al igual que los factores de ensamblaje ATP11 y ATP12, se ha sugerido que participa en la biogénesis del complejo V, no obstante se requieren más estudios para aclarar su función (Jonckheere *et al.*, 2012).

Proteínas MLQ y AGP

Recientemente se han descrito dos nuevas proteínas asociadas al complejo enzimático de bovino. La primera de ellas se conoce como proteolípido mitocondrial de 6.8 kDa (6.8PL) o proteína MLQ debido a que se obtuvo a partir de membranas

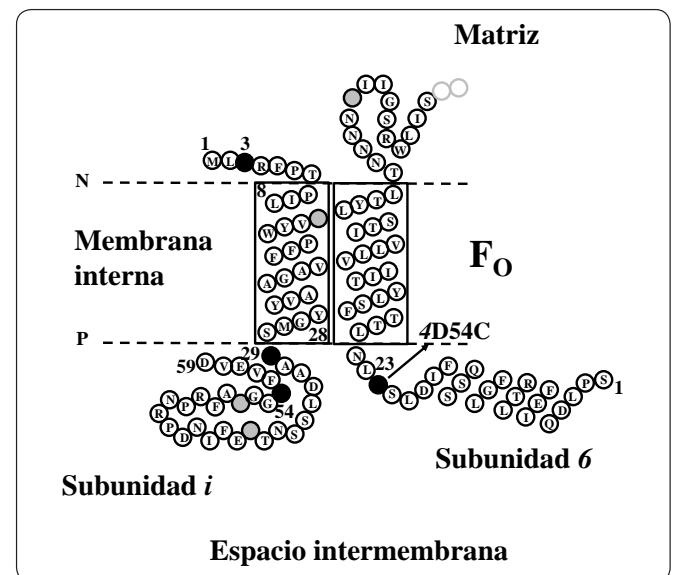


Figura 13. Representación esquemática del modelo de topología de la subunidad *i*. El modelo está basado en los ensayos empleando agentes entrecruzadores, en donde se representa esquemáticamente a las proteínas cercanas a la subunidad *i*. La numeración de la subunidad 6 inicia en la Ser1. Se muestra el primer segmento que atraviesa la membrana y el primer bucle situado del lado de la matriz de la subunidad 6. Los círculos negros representan los residuos de lisina sustituidos por cisteínas en la subunidad *i*. Otros residuos de lisina se muestran como círculos con líneas. **4D54C** significa el cambio del residuo Asp54 por Cis de la subunidad 4. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificada de Paumard *et al.*, 2000.

mitocondriales empleando disolventes orgánicos (cloroformo/metanol). La segunda es una subunidad llamada *AGP* y se ha descrito como una proteína asociada a la diabetes en tejidos sensibles a insulina (DAPIT, por sus siglas en inglés). Se ha determinado que estas subunidades no afectan la actividad del complejo V. Empleando servidores bioinformáticos se predice un cruce transmembranal para cada una de ellas, dos sitios de fosforilación posibles para *AGP* y uno para la proteína MLQ. Al buscar en la base de datos del genoma de levadura homólogos para estas subunidades se observó que sus secuencias tenían una baja identidad (13%) y similitud (16%). Respecto a su función, aún no se conoce con precisión. No obstante, estudios realizados en tejidos de rata en un modelo de diabetes, inducido al dañar las células β pancreáticas debido a la administración del fármaco estreptozotocina, sugieren que podría participar en el metabolismo de la glucosa y/o la fosforilación oxidativa. En este sentido, se ha diseñado RNA de interferencia para evaluar modificaciones morfológicas de la membrana interna mitocondrial o cambios en las formas oligoméricas de la ATP sintasa, sin embargo, no se han obtenido resultados significativos (Meyer *et al.*, 2007).

Organización estructural del dominio membranal

Inicialmente se pensó que las subunidades *e* y *g* estabilizaban al dímero de la ATPasa, mientras que la subunidad *b* favorecía la oligomerización de la enzima. Sin embargo, los heterodímeros *e+b* y *g+b* obtenidos por estudios de entrecruzamiento, proponían que estas subunidades estabilizaban la interfaz monómero-monómero en la ATP sintasa dimerica. De la misma forma, el homodímero *i+i*, además de los productos de entrecruzamiento como *e+b*, *g+b*, *h+b* y *e+i+e* sugerían que al menos cinco

subunidades cercanas, *e*, *g*, *i*, *h* y *b*, formaban parte de la interfaz monomérica del complejo enzimático. Tomando en cuenta estos resultados, así como el elevado número de alfa hélices membranales (aunque esta predicción varía de acuerdo con el algoritmo empleado, con la excepción de la subunidad *h* que no presenta una hélice membranal) refuerzan la idea de que las interacciones de las proteínas del sector F_0 participan en la oligomerización de la enzima (Wittig & Schagger, 2008). En las levaduras, la subunidad *h* se asocia al sector F_1 y no está involucrada en la dimerización (Arselin *et al.*, 1996; Couh-Cardel *et al.*, 2010).

Como se ha expuesto, la alta hidrofobicidad de las subunidades del dominio membranal ha dificultado su caracterización. Actualmente, se han realizado esfuerzos experimentales para determinar la estructura de las subunidades del sector F_0 de la ATPasa mitocondrial de *Yarrowia lipolytica*. Empleando una combinación de técnicas de alta resolución estructural, como la crío-microscopía electrónica y la cristalografía de rayos X, se ha determinado la estructura completa del dímero de la levadura con una resolución general de 7.8 Å, de 6.2 Å para el dominio F_0 del dímero de la enzima y de 6.9 Å para el sector F_1 del monómero del complejo enzimático. El mapa de densidad electrónica obtenido experimentalmente permitió identificar a la mayoría de las subunidades del dominio F_0 (Figura 14) (Hahn *et al.*, 2016).

La organización supramolecular de la ATP sintasa a lo largo del borde de las crestas mitocondriales se observó por primera vez en el protozoo ciliado *Paramecium multinucleatum*; el análisis de las imágenes de microscopía de crío-fractura



Figura 14. Modelo estructural de la F_1F_0 -ATP sintasa dimerica de *Yarrowia lipolytica*. Vista lateral del mapa de densidad electrónica obtenido por crío-microscopía electrónica del dímero de la ATPasa de *Y. lipolytica* representado como un diagrama de superficie (7.8 Å de resolución, no. de acceso EMD 8151). Adicionalmente, a manera de comparación sobre la densidad electrónica del mismo se muestra la estructura cristalográfica del sub-complejo F_1-c_{10} de *Y. lipolytica* (3.5 Å de resolución, no. de acceso PDB 5FL7). Asimismo, se indica la región correspondiente a los dominios extrínseco (F_1) e intrínseco de membrana (F_0) del complejo dimerico de la enzima de la levadura, así como las subunidades *a* y el anillo de subunidades de *c*. Modificado de Hahn *et al.*, 2016.

permitieron establecer una relación entre los dímeros de la enzima con la formación de crestas mitocondriales (Paumard *et al.*, 2002). Recientemente, estas formaciones diméricas se han descrito por microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica en las ATPasas de rata, bovino, levadura, papa y hongos. A la fecha, la existencia de hileras de dímeros de la ATP sintasa mitocondrial es aceptada. Estudios realizados con agentes entrecruzadores han caracterizado una interfaz de dimerización (subunidades δ , 4 , i , e) y otra de oligomerización (subunidades i , e , g), a través de las cuales se dan los contactos entre los dímeros de la enzima (Figura 15) (Habersetzer *et al.*, 2013). En este sentido, se encontró que los monómeros del bovino, la levadura y las algas clorofíceas formaban dos ángulos distintos de asociación lo que sugería la existencia de dos tipos de estructuras, una llamada “dímero verdadero” con un ángulo de 70-90° y otra conocida como “pseudo-dímero” cuyo ángulo es menor a 40°, dando lugar a la formación de crestas mitocondriales lamelares o tubulares respectivamente. Por otra parte, se ha propuesto que estos dímeros podrían ser el resultado de la ruptura de los oligómeros de la ATPasa de las crestas mitocondriales (Figura 15) (Dudkina *et al.*, 2006).

Las F₁F₀-ATP sintasas con subunidades atípicas

En comparación con la estructura de la ATP sintasa de los mamíferos o de la levadura, que han sido muy estudiadas, poco se sabe de la composición estructural de la ATP sintasa de las plantas (Cano-Estrada & González-Halphen, 2011). En éstas, aún menos subunidades del sector F₀ han sido caracterizadas, y solamente se han reportado genes que codifican para las

subunidades a y c . No obstante, en el genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* se han encontrado los genes *orfB* y *orf25* que codifican para proteínas asociadas al dominio membranal de la ATP sintasa. El gen *orf25* codifica para una proteína denominada F_Ad. Sin embargo, los productos proteicos de estos genes no tienen homólogos claros en bovino o levadura y su función es aún desconocida (Heazlewood *et al.*, 2003).

En contraste con otros complejos enzimáticos, el brazo periférico y el dominio membranal de las ATPasas de las algas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. están compuestos por nueve polipéptidos atípicos (Asa1-9) (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). El análisis de imágenes de microscopía electrónica de las secciones transversales de la membrana reveló seis hélices transmembranales (probablemente siete) (Allegretti *et al.*, 2015), adicionales a las correspondientes de las subunidades a y c , que en principio podrían atribuirse a las subunidades *Asa6*, *Asa8* y *Asa9*. Sin embargo, la resolución de la imagen estructural obtenida en este dominio membranal dificulta la correcta asignación para cada una de las subunidades que lo componen.

La subunidad *Asa6* posee 151 aminoácidos (13.1 kDa), su extremo amino se encuentra orientado hacia la matriz mitocondrial y su dominio carboxilo está ubicado en el espacio intermembranal. Algunos servidores de predicción de estructura secundaria para proteínas de membrana sugieren dos cruces transmembranales, mientras que otros algoritmos predicen

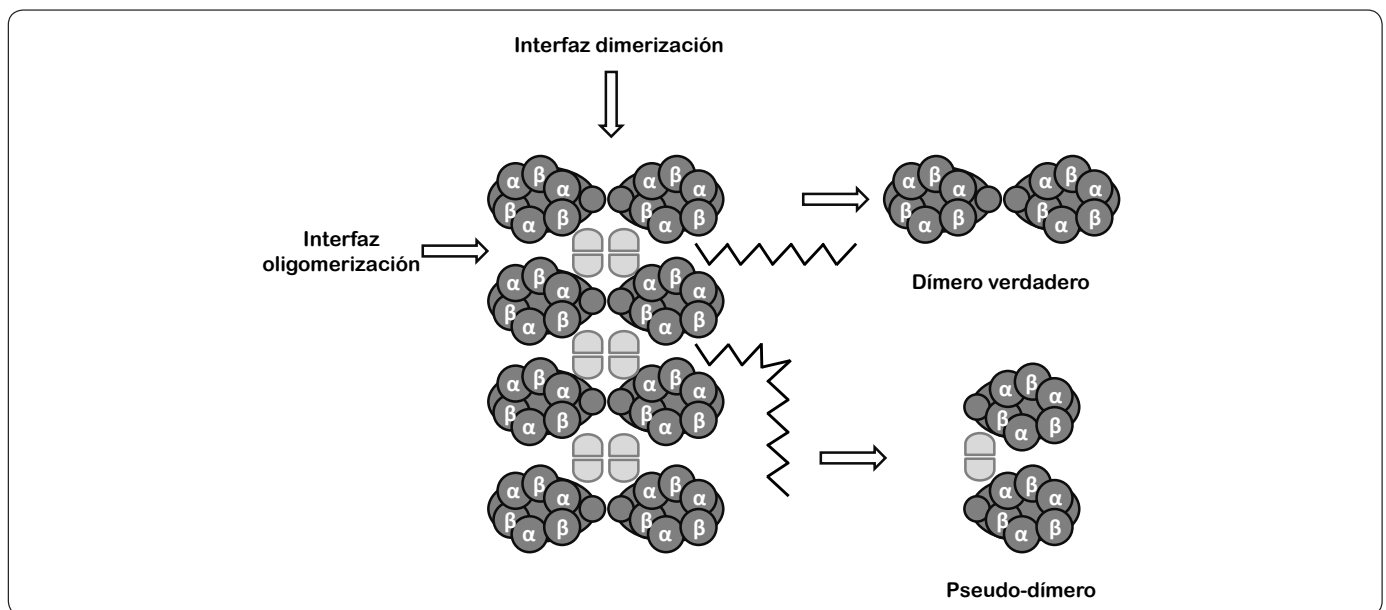


Figura 15. Modelo de la organización de las estructuras oligoméricas de la ATP sintasa. En este modelo se representa de manera esquemática la disposición de los multimémeros de la ATPasa. Se muestran los dos tipos de formas diméricas que existen (dímero verdadero y pseudo-dímero). Así como las superficies de contacto que forman los monómeros de la enzima (representados como elipses horizontales), y dentro de éstos las subunidades α/β . También, se indica la interfaz de dimerización y oligomerización (señalado con una flecha), respectivamente. Modificado de Dudkina *et al.*, 2006.

una hélice re-entrante y un cruce membranal. Asimismo, *Asa8* se compone de 89 aminoácidos (9.9 kDa), presenta un cruce transmembranal y una topología de membrana N-adentro C-fuera, deducido a partir de análisis bioinformáticos. Debido a que la subunidad *Asa8* contiene un dominio GxxxG (Gly59-Gly63) podría formar homodímeros y de esta forma participar en la dimerización de la enzima (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016), ya que la presencia de estos dominios en las subunidades *e* y *g* de levadura desempeñan un papel importante en la formación de estructuras diméricas del complejo enzimático (Arselin *et al.*, 2003; Arselin *et al.*, 2004; Bustos & Velours, 2005). Por último, *Asa9* está formada por 97 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 11 kDa. Al igual que las subunidades anteriores, este polipéptido presenta la misma topología de membrana y por lo menos un cruce transmembranal (Figura 16) (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016).

Por otra parte, en protozoarios y ciliados al igual que en las algas clorofíceas, se han encontrado subunidades novedosas sin homólogos en otros organismos. Para el primer caso, *Trypanosoma brucei*, se identificaron 22 proteínas, de las cuales cinco están relacionadas a la región F_1 y tres al sector F_0 , mientras que las 14 restantes se asignaron como proteínas putativas (Zíková *et al.*, 2009). En el segundo caso, *Tetrahymena thermophila*, se encontraron siete ortólogos para las subunidades clásicas de ATPasa, con excepción de la subunidad *c*. Además de las 13 subunidades novedosas, del total de proteínas encontradas, se descubrió que la proteína Ymf66 tiene ocho segmentos membranales y podría sustituir a la subunidad *a* en este complejo enzimático (Balabaskaran *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

El complejo enzimático F_1F_0 -ATP sintasa es un nano-motor rotatorio capaz de sintetizar ATP aprovechando la fuerza protón motriz. Su sector F_1 cataliza la síntesis de ATP, mientras que el sector F_0 lleva a cabo la translocación de iones y proporciona un estator para la acción giratoria del complejo (Heazlewood *et al.*, 2003).

La enzima de la mayoría de los organismos eucariontes, desde las levaduras hasta las plantas y los mamíferos, cuentan con las mismas subunidades, aunque poco conservadas a nivel de secuencia pero más conservadas a nivel de estructura, lo cual indica que estas subunidades comparten la misma función dentro del complejo (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016).

Las principales diferencias estructurales de la ATP sintasa de los diferentes organismos se encuentran en la composición polipeptídica del brazo periférico y en el dominio membranal; estas diferencias en algunos casos son dependientes de la especie. Por ejemplo, en las algas clorofíceas, los ciliados y los protozoarios existen subunidades atípicas que estabilizan el complejo enzimático y optimizan el metabolismo energético celular en estos organismos.

El estudio de la composición de las subunidades del complejo F_0 se ha abordado mediante diversas estrategias experimentales: análisis de la composición polipeptídica mediante geles en condiciones desnaturalizantes, fraccionamiento de las subunidades mediante técnicas de purificación y análisis por espectrometría de masas, diseño de mutantes para los

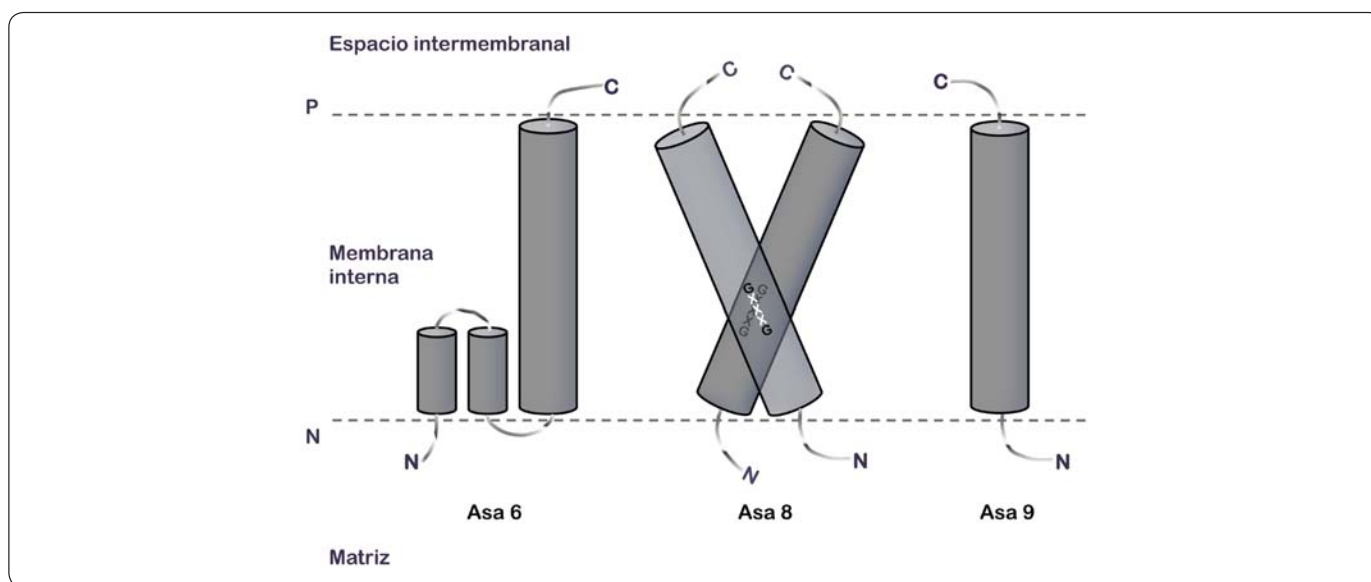


Figura 16. Modelos basados en la hidrofobicidad de las subunidades individuales que participan en el dominio de dimerización de membrana. Varios algoritmos bioinformáticos predicen las subunidades *Asa8* y *Asa9* con un solo TMS. El motivo GxxxG presente en la subunidad *Asa8* podría llevar a su dimerización (representado). Los modelos predichos para *Asa6* varían con los diferentes programas que se utilizaron: un TMS, dos TMS, o un modelo con un TMS y una hélice re-entrante (representado). TMS = Segmento transmembranal. P = lado positivo, N = lado negativo. Modificado de Vázquez-Acevedo *et al.*, 2016.

distintos genes que codifican para las proteínas del complejo enzimático y empleo de agentes entrecruzadores, entre otros. Sin embargo, las dificultades experimentales que resultan de la alta hidrofobicidad de las proteínas, por ejemplo las subunidades *a*, *c* y *A6L*, dificultan su identificación aunque estén presentes en cantidades equimolares. Por tal motivo, no se puede excluir la posibilidad que una o más proteínas no sean detectadas o se consideren contaminantes. Por lo tanto, es difícil asegurar que no existan subunidades adicionales en los dominios membranales por descubrir. No obstante, gracias al desarrollo de nuevas técnicas para el análisis estructural de proteínas, como la criomicroscopía electrónica, se puede estudiar con mayor detalle la composición de las subunidades intrínsecas de la membrana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Marietta Tuena Sangri (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y al Dr. Óscar Flores Herrera (Facultad de Medicina, UNAM) por sus valiosos comentarios críticos al presente manuscrito. Agradecemos el apoyo técnico de la QBP. Miriam Vázquez-Acevedo y el apoyo de los siguientes donativos: CONACYT, México (239219); Cooperación Bilateral CONACYT-FNRS, México-Bélgica (245486) y a la DGAPA-UNAM, México (IN203311). Lorenzo Sánchez-Vásquez es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca 128110 del CONACYT.

REFERENCIAS

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**(6491), 621-628. DOI: 10.1038/370621a0.
- Allegretti, M., Klusch, N., Mills, D.J., Vonck, J., Kühlbrandt, W. & Davies, K.M. (2015). Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator *a*-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*, **521**(7551), 237-240. DOI: 10.1038/nature14185.
- Altendorf, K., Stalz, W., Greie, J. & Deckers-Hebestreit, G. (2000). Structure and function of the F(O) complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *J. Exp. Biol.*, **203**(Pt 1), 19-28.
- Amutha, B., Gordon, D.M., Gu, Y. & Pain, D. (2004). A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance. *Biochem. J.*, **381**(Pt 1), 19-23. DOI: 10.1042/BJ20040566.
- Aris, J.P., Klionsky, D.J. & Simoni, R.D. (1985). The F₀ subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase are sufficient to form a functional proton pore. *J. Biol. Chem.*, **260**(20), 11207-11215.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. & Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.*, **17**(24), 7170-7178. DOI: 10.1093/emboj/17.24.7170.
- Arselin, G., Giraud, M.F., Dautant, A., Vaillier, J., Brèthes, D., Couly-Salin, B., Schaeffer, J. & Velours, J. (2003). The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit *e* is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.*, **270**(8), 1875-1884. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03557.x.
- Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.V. & Velours, J. (1996). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J. Biol. Chem.*, **271**(34), 20284-20290. DOI: 10.1074/jbc.271.34.20284.
- Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M.F., Dautant, A., Brèthes, D. & Velours, J. (2004). The modulation in subunits *e* and *g* amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J. Biol. Chem.*, **279**(39), 40392-40399. DOI: 10.1074/jbc.M404316200.
- Balabaskaran Nina, P., Dudkina, N.V., Kane, L.A., van Eyk, J.E., Boekema, E.J., Mather, M.W. & Vaidya, A.B. (2010). Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Biol.*, **8**(7), e1000418. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000418.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V. & Stuart, R.A. (2002). Su e of the yeast F₁F₀-ATP synthase forms homodimers. *J. Biol. Chem.*, **277**(50), 48484-48489. DOI: 10.1074/jbc.M209382200.
- Bustos, D.M. & Velours, J. (2005). The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit *g* destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **280**(32), 29004-29010. DOI: 10.1074/jbc.M502140200.
- Cano-Estrada, A & González-Halphen, D. (2011). F₁F₀-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB*, **30**(3), 98-108.
- Cingolani, G. & Duncan, T.M. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an auto inhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**(6), 701-707. DOI: 10.1038/nsmb.2058.
- Claggett, S.B., Grabar, T.B., Dunn, S.D. & Cain, B.D. (2007). Functional incorporation of chimeric *b* subunits into F₁F₀ ATP synthase. *J. Bacteriol.*, **189**(15), 5463-5471. DOI: 10.1128/JB.00191-07.
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E. & Walker, J.E. (1994). F₀ membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F₁-ATPase. *Biochemistry*, **33**(25), 7971-7978. DOI: 10.1021/bi00191a026.
- Couoh-Cardel, S.J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. & García-Trejo, J.J. (2010). Structure of dimeric F₁F₀-ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **285**(47), 36447-36455. DOI: 10.1074/jbc.M110.144907.
- Deckers-Hebestreit, G. & Altendorf, K. (1992). The F₀ complex of the proton-translocating F-type ATPase of *Escherichia coli*. *J. Exp. Biol.*, **172**, 451-459.
- Deckers-Hebestreit, G. & Altendorf, K. (1996). The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 791-824. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.791.
- Devenish, R.J., Papakonstantinou, T., Galanis, M., Law, R.H., Linnane, A.W. & Nagley, P. (1992). Structure/function analysis of yeast mitochondrial ATP synthase subunit 8. *Ann. NY Acad. Sci.*, **671**, 403-414. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb43814.x.
- Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2006). On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.*, **25**, 2911-2918. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601177.
- Dmitriev, O., Jones, P.C., Jiang, W. & Fillingame, R.H. (1999). Structure of the membrane domain of subunit *b* of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **274**(22), 15598-15604. DOI: 10.1074/jbc.274.22.15598.
- Domínguez-Ramírez, L. & Tuena de Gómez-Poyou, M. (2003). Virtudes y pecados de una enzima: La F₀F₁ ATP sintasa. *Mensaje Bioquímico, Depto. de Bioq., Fac. de Medicina, UNAM*, **27**, 25-44.

- Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P. & Boekema, E.J. (2006). Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.*, **580(14)**, 3427-3432. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.097.
- Everard-Gigot, V., Dunn, C.D., Dolan, B.M., Brunner, S., Jensen, R.E. & Stuart, R.A. (2005). Functional analysis of subunit e of the F_1F_0 -ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot. Cell.*, **4(2)**, 346-355. DOI: 10.1128/EC.4.2.346-355.2005.
- Fillingame, R.H. & Dmitriev, O. (2002). Structural model of the transmembrane F_0 rotary sector of H^+ -transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking *in situ*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1565(2)**, 232-245. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00572-2.
- Foster, D.L. & Fillingame, R.H. (1982). Stoichiometry of subunits in the H^+ -ATP synthase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2009-2015.
- Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J. & Brèthes, D. (2006). The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry*, **45(21)**, 6715-6723. DOI: 10.1021/bi0601407.
- García-Trejo, J.J., Zarco Zavala, M. & Morales Ríos, E. (2012). Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F_1F_0 ATP sintasa de las α -proteobacterias en *Paracoccus denitrificans*. *Mensaje Bioquímico, Depto. de Bioq., Fac. de Medicina, UNAM*, **36**, 106-126.
- Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L. & Fillingame, R.H. (1998). Solution structure of the transmembrane H^+ -transporting subunit c of the F_1F_0 ATP synthase. *Biochemistry*, **37(25)**, 8817-8824. DOI: 10.1021/bi980511m.
- Godinot, C. & Di Pietro, A. (1986). Structure and function of the ATPase-ATP synthase complex of mitochondria as compared to chloroplasts and bacteria. *Biochimie*, **68(3)**, 367-374.
- Grasso, D.G., Nero, D., Law, R.H., Devenish, R.J. & Nagley, P. (1991). The C-terminal positively charged region of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase is required for efficient assembly of this subunit into the membrane F_0 sector. *Eur. J. Biochem.*, **199(1)**, 203-209. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16110.x.
- Habersetzer, J., Ziani, W., Larrieu, I., Stines-Chaumeil, C., Giraud, M.F., Brèthes, D., Dautant, A. & Paumard, P. (2013). ATP synthase oligomerization: from the enzyme models to the mitochondrial morphology. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **45(1)**, 99-105. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.05.017.
- Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D.J., Zickermann, V., Vonck, J., Kühlbrandt, W. & Meier, T. (2016). Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol. Cell*, **63(3)**, 445-456. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.05.037.
- Heazlewood, J.L., Whelan, J. & Millar, A.H. (2003). The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are F_0 components in the plant F_1F_0 ATP synthase. *FEBS Lett.*, **540(1-3)**, 201-205. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00264-3.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthase by F_1 -ATPase. *Nature*, **427**, 465-468. DOI: 10.1038/nature02212.
- Jiko, C., Davies, K.M., Shinzawa-Itoh, K., Tani, K., Maeda, S., Mills, D.J., Tsukihara, T., Fujiyoshi, Y., Kühlbrandt, W. & Gerle, C. (2015). Bovine F_1F_0 ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. *Elife*, **27(4)**, e06119. DOI: 10.7554/eLife.06119.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A. & Rodenburg, R.J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inher. Metab. Dis.*, **35(2)**, 211-225. DOI: 10.1007/s10545-011-9382-9.
- Kühlbrandt, W. & Davies, K.M. (2016). Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine. *Trends Biochem. Sci.*, **41(1)**, 106-116. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.006.
- Lee, J., Ding, S., Walpole, T.B., Holding, A.N., Montgomery, M.G., Fearnley, I.M. & Walker, J.E. (2015). Organization of Subunits in the Membrane Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking. *J. Biol. Chem.*, **290(21)**, 13308-13320. DOI: 10.1074/jbc.M115.645283.
- Leyva, J.A., Bianchet, M.A. & Mario Amzel, L. (2003). Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F-ATPase. *Mol. Memb. Biol.*, **20(1)**, 27-33. DOI: 10.1080/0968768031000066532.
- Liu, S., Charlesworth, T.J., Bason, J.V., Montgomery, M.G., Harbour, M.E., Fearnley, I.M. & Walker, J.E. (2015). The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species. *Biochem. J.*, **468(1)**, 167-175. DOI: 10.1042/BJ20150197.
- Martin, J., Hudson, J., Hornung, T. & Frasch, W.D. (2015). F_0 -driven Rotation in the ATP Synthase Direction against the Force of F_1 ATPase in the F_0F_1 ATP Synthase. *J. Biol. Chem.*, **290(17)**, 10717-10728. DOI: 10.1074/jbc.M115.646430.
- Martin, J.L., Ishmukhametov, R., Hornung, T., Ahmad, Z. & Frasch, W.D. (2014). Anatomy of F_1 -ATPase powered rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **111(10)**, 3715-3720. DOI: 10.1073/pnas.1317784111.
- Meyer, B., Wittig, I., Trifilieff, E., Karas, M. & Schägger, H. (2007). Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol. Cell. Proteomics*, **6(10)**, 1690-1699. DOI: 10.1074/mcp.M700097-MCP200.
- Morales-Ríos, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **112(43)**, 13231-13236. DOI: 10.1073/pnas.1517542112.
- Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V. & Pagliarani, A. (2015). Opposite rotation directions in the synthesis and hydrolysis of ATP by the ATP synthase: hints from a subunit asymmetry. *J. Membr. Biol.*, **248(2)**, 163-169. DOI: 10.1007/s00232-014-9760-y.
- Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V. & Pagliarani, A. (2016). The c-Ring of the F_1F_0 -ATP Synthase: Facts and Perspectives. *J. Membr. Biol.*, **249(1-2)**, 11-21. DOI: 10.1007/s00232-015-9860-3.
- Paul, M.F., Velours, J., Arselin de Chateaubodeau, G., Aigle, M. & Guerin, B. (1989). The role of subunit 4, a nuclear-encoded protein of the F_0 sector of yeast mitochondrial ATP synthase, in the assembly of the whole complex. *Eur. J. Biochem.*, **85(1)**, 163-171.
- Paumard P., Arselin G., Vaillier J., Chaignepain S., Bathany K., Schmitter, J.M., Brèthes, D. & Velours, J. (2002). Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, **1(33)**, 10390-10396. DOI: 10.1021/bi025923g.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J.P. & Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.*, **21(3)**, 221-230. DOI: 10.1093/emboj/21.3.221.
- Paumard, P., Vaillier, J., Napias, C., Arselin, G., Brèthes, D., Graves,

- P.V. & Velours, J. (2000). Environmental study of subunit *i*, a F(O) component of the yeast ATP synthase. *Biochemistry*, **39**(14), 4199-4205. DOI: 10.1021/bi9924381.
- Rees, D.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2009). The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **106**, 21597-21601. DOI: 10.1073/pnas.0910365106.
- Roudeau, S., Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V. & Velours, J. (1999). Subunit *f* of the yeast mitochondrial ATP synthase: topological and functional studies. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**(2), 85-94. DOI: 10.1023/A:1005407525915.
- Roy, A., Hutcheon, M.L., Duncan, T.M. & Cingolani, G. (2012). Improved crystallization of *Escherichia coli* ATP synthase catalytic complex (F₁) by introducing a phosphomimetic mutation in subunit *ε*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**(Pt 10), 1229-1233. DOI: 10.1107/s1744309112036718.
- Saddar, S. & Stuart, R.A. (2005). The yeast F(1)F(0)-ATP synthase: analysis of the molecular organization of subunit *g* and the importance of a conserved GXXXG motif. *J. Biol. Chem.*, **280**(26), 24435-24442. DOI: 10.1074/jbc.M502804200.
- Shirakihara, Y., Shiratori, A., Tanikawa, H., Nakasako, M., Yoshida, M. & Suzuki, T. (2015). Structure of a thermophilic F₁-ATPase inhibited by an *ε*-subunit: deeper insight into the *ε*-inhibition mechanism. *FEBS J.*, **282**(15), 2895-2913. DOI: 10.1111/febs.13329.
- Soubannier, V., Rusconi, F., Vaillier, J., Arselin, G., Chaignepain, S., Graves, P.V., Schmitter, J.M., Zhang, J.L., Mueller, D. & Velours, J. (1999). The second stalk of the yeast ATP synthase complex: identification of subunits showing cross-links with known positions of subunit *4* (subunit *b*). *Biochemistry*, **38**(45), 15017-15024. DOI: 10.1021/bi9916067.
- Soubannier, V., Vaillier, J., Paumard, P., Couлары, B., Schaeffer, J. & Velours, J. (2002). In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit *4*(*b*), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J. Biol. Chem.*, **277**(12), 10739-10745. DOI: 10.1074/jbc.M111882200.
- Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V. & Velours, J. (1997). The subunit *f* of mitochondrial yeast ATP-synthase: characterization of the protein and disruption of the structural gene *ATP17*. *Eur. J. Biochem.*, **247**(3), 1111-1117. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.01111.x.
- Stewart, A.G., Sobti, M., Harvey, R.P. & Stock, D. (2013). Rotatory ATPases: Models, machine elements and technical specifications. *BioArchitecture*, **3**(1), 2-12. DOI: 10.4161/bioa.23301.
- Stock, D., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, **286**, 1700-1705. DOI: 10.1126/science.286.5445.1700.
- Stocker, A., Keis, S., Vonck, J., Cook, G.M. & Dimroth, P. (2007). The structural basis for unidirectional rotation of thermophilic F₁-ATPase. *Structure*, **15**(8), 904-914. DOI: 10.1016/j.str.2007.06.009.
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C. & González-Halphen, D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **38**(5-6), 271-282. DOI: 10.1007/s10863-006-9046-x.
- Vázquez-Acevedo, M., Vega-de Luna, F., Sánchez-Vásquez, 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. *Biochim. Biophys. Acta*, pii: **S0005-2728(16)**, 30022-30026. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.02.003.
- Velours, J., Paumard, P., Soubannier, V., Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G. & Graves, P.V. (2000). Organisation of the yeast ATP synthase F(0): a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**(2-3), 443-456. DOI: 10.1016/S0005-2728(00)00093-1.
- Vik, S.B. & Ishmukhametov, R.R. (2005). Structure and function of subunit *a* of the ATP synthase of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**(6), 445-449. DOI: 10.1007/s10863-005-9488-6.
- Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C.D. & van der Laan, M. (2010). Stepwise assembly of dimeric F(1)F(o)-ATP synthase in mitochondria involves the small F(o)-subunits *k* and *i*. *Mol. Biol. Cell.*, **21**(9), 1494-1504. DOI: 10.1091/mbc.E09-12-1023.
- Walker, J.E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1-16. DOI: 10.1042/bst20110773.
- Welch, A.K., Claggett, S.B. & Cain, B.D. (2008). The b (arg36) contributes to efficient coupling in F(1)F(o) ATP synthase in *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**(1), 1-8. DOI: 10.1007/s10863-008-9124-3.
- Wittig, I. & Schägger, H. (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**(7-8), 592-598. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.04.027.
- Yoshida, M., Muneyuki, E. & Hisabori, T. (2001). ATP synthase-a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**(9), 669-677. DOI: 10.1038/35089509.
- Zhou, A., Rohou, A., Scheo, D.G., Bason, J.V., Montgomery, M.G., Walker, J.E., Grigorieff, N. & Rubinstein, J.L. (2015). Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM. *eLife*, **4**, e10180. DOI: 10.7554/eLife.10180.
- Zíková, A., Schnauffer, A., Dalley, R.A., Panigrahi, A.K. & Stuart, K.D. (2009). The F(o)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.*, **5**(5), e1000436. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000436.