



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

**Estudio de las interacciones de la subunidad ASA1 en el brazo
periférico de la ATP sintasa de *Polytomella* sp.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:

Martha Lilia Colina Tenorio

Facultad de Medicina



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Diego González Halphen**

México D.F, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Georges Dreyfus Cortés

Vocal: Dr. Luis Servín González

Secretario: Dr. Diego González Halphen

Suplente: Dr. Óscar Flores Herrera

Suplente: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina y al Instituto de Fisiología Celular por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

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

A mis padres, todo el cariño y dedicación.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1 Mitocondrias	3
3.2 Cadena respiratoria mitocondrial	5
3.3 Algas clorofíceas	7
3.4 F ₁ F ₀ ATP sintasa	9
3.5 Estructura de la F ₁ F ₀ ATP sintasa	11
4. Antecedentes directos	16
5. Objetivo	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
6. Estrategia experimental	20
7. Materiales y métodos	21
7.1 Obtención de la proteína recombinante ASA1	21
7.1.1 Amplificación del gen correspondiente a ASA1	21
7.1.2 Clonación del gen correspondiente a ASA1	22
7.1.3 Sobreexpresión de la subunidad ASA1	23
7.1.4 Purificación de la subunidad ASA1	23
7.2 Obtención de la proteína recombinante OSCP	25
7.2.1 Amplificación del gen correspondiente a OSCP	25
7.2.2 Sobreexpresión de la subunidad OSCP	26
7.2.3 Purificación de la subunidad OSCP	26
7.3 Separación de proteínas mediante electroforesis	27
7.4 Inmunorréplica tipo Far Western	28
7.5 Copurificación	29
8. Resultados	31
8.1 Obtención de la proteína recombinante ASA1	31
8.1.1 Amplificación del gen <i>asa1</i>	31
8.1.2 Clonación del gen <i>asa1</i>	31
8.1.3 Sobreexpresión de la subunidad ASA1	32
8.1.4 Purificación de la subunidad ASA1	33
8.2 Obtención de la proteína recombinante OSCP	34
8.2.1 Clonación del gen <i>oscp</i>	34
8.2.2 Sobreexpresión de la subunidad OSCP	35
8.2.3 Purificación de la subunidad OSCP	35
8.3 Ensayos de interacción entre ASA1 y las otras subunidades componentes de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	37
8.3.1 Inmunorréplica tipo Far Western	37
8.3.2 Inmunorréplica tipo Far Western con geles de segunda dimensión	38
8.3.3 Ensayo de copurificación	41
9. Discusión	45
10. Conclusión	51
11. Perspectivas	52
12. Referencias	53
12.1 Referencias bibliográficas	53
12.2 Referencias electrónicas	58
13. Anexos	59
13.1 Soluciones y amortiguadores	60
13.2 Artículo publicado	66

1. RESUMEN

La ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas tiene una estructura que difiere de aquella de las enzimas de otros organismos, ya que carece de las subunidades que clásicamente están involucradas en la formación del brazo periférico (estator) de la enzima y en la dimerización de la misma. En su lugar tiene 9 subunidades atípicas de origen evolutivo desconocido que han sido llamadas ASA1 a ASA9. Estas subunidades ASA sólo están presentes en el grupo de las algas clorofíceas y no se encuentran en otras algas cercanamente relacionadas, como son las algas verdes del linaje de las ulvofíceas, de las prasinofíceas o de las trebuxiofíceas. Experimentos de disociación de la enzima con calor, tratamiento con agentes entrecruzadores y estudios de microscopía electrónica llevaron a la propuesta de un modelo estructural de la ATP sintasa de las algas, en el cual las subunidades ASA1 a 9 forman la estructura del brazo periférico y participan en la dimerización de la enzima; sin embargo, la localización de ASA1 no era clara. El objetivo de este trabajo fue clonar y purificar la subunidad ASA1 y realizar estudios de interacción, conocer cuáles son sus subunidades vecinas y proponer su disposición topológica en el estator de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* La estrategia experimental se basó en la clonación del gen de ASA1, la sobreexpresión de la proteína en *Escherichia coli* y su purificación; una vez purificada la proteína recombinante se procedió a realizar ensayos de interacción. En este trabajo se describe la interacción de la subunidad ASA1 con la subunidad OSCP, lo cual podría vincular a una proteína clásicamente conservada de la enzima, como es OSCP, con una de las subunidades atípicas propia de las algas clorofíceas.

2. ABSTRACT

The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae presents a structure different from that of other organisms. All the subunits that typically make up the structure of the peripheral arm and are involved in the dimerization of the enzyme are missing. In compensation, it contains nine subunits of unknown evolutionary origin that have been named ASA1 to ASA9. These ASA subunits are only present in chlorophycean algae and are not found in others closely related algal lineages, such as ulvophycean, prasynophycean and trebuxophycean green algae. Heat dissociation experiments, cross linking studies and electronic microscopy studies have allowed the proposal of a structural model of the ATP synthase of chlorophycean algae in which ASA subunits make up the peripheral arm and participate in the dimerization of the enzyme; however, the localization of ASA1 subunit was unclear. The objective of this work was to clone and purify the ASA1 subunit to perform interaction studies in order to know which its neighboring subunits and to propose its topological disposition in the peripheral arm of the ATP synthase of *Polytomella* sp. The experimental strategy is based on the cloning of the corresponding gene, the overexpression of the protein in *Escherichia coli* and the purification of the recombinant protein in order to perform interaction assays. In this work, we found an ASA1-OSCP interaction, which could link a classical protein of the enzyme, such as OSCP, with an atypical ASA subunit unique to the chlorophycean algal lineage.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Mitocondrias

Las mitocondrias son organelos celulares muy dinámicos, con una plasticidad considerable y son el compartimento generador de la energía que necesita una célula eucarionte para funcionar (Alberts). El término “mitocondria” fue acuñado en 1898 por Carl Brenda y las mitocondrias fueron observadas por primera vez mediante la tinción con verde Jano por Leonor Michaelis en 1900 (Ernster y Schatz 1981).

En cuanto al origen de las mitocondrias, la teoría actualmente aceptada es la teoría de la endosimbiosis, postulada formalmente y fundamentada por Lynn Margulis en 1967 en su artículo *On the origin of mitosing cells*. Esta teoría establece que las mitocondrias eran originalmente alfa proteo bacterias de vida libre, probablemente del orden de las Rickettsiales, que fueron absorbidas por otra célula, quedando así como endosimbiontes que a lo largo de la evolución transfirieron parte de su material genético a la célula hospedera.

Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas altamente especializadas y con funciones diferentes que dan lugar a dos espacios, la matriz interna y el espacio intermembranal (Figura 1). Tienen su propio genoma, sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear (salvo algunas subunidades hidrofóbicas de los complejos de la fosforilación oxidativa en mamíferos) y tienen que ser importadas del citoplasma hacia el interior de la mitocondria a través de translocasas presentes en ambas membranas.

La membrana externa mitocondrial contiene principalmente porinas; éstas son proteínas de transporte que forman canales acuosos a través de la bicapa lipídica, lo que hace que esta membrana sea permeable a moléculas de hasta 5 kDa, lo que incluye a proteínas pequeñas. En esta membrana se localiza el complejo de translocación TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) (Nelson y Cox 2005).

La membrana interna mitocondrial contiene varias proteínas de transporte que la hacen selectiva a las moléculas necesarias para el funcionamiento de las enzimas presentes en la matriz mitocondrial. En la membrana interna se localiza también el complejo de translocación TIM (*Translocase of the Inner Membrane*), los complejos respiratorios, y una gran cantidad de transportadores. Las llamadas crestas mitocondriales se generan por invaginaciones y pliegues de la membrana interna, y están conectadas con el espacio intermembranal, por lo que se consideran un subcompartimento separado (Mannella 2006).

En la matriz mitocondrial se encuentran el ADN mitocondrial, toda la maquinaria necesaria para la replicación del genoma mitocondrial, los ribosomas y las enzimas de la mayoría de las rutas celulares de oxidación menos las de la glucólisis. Entre otras, contiene las enzimas que metabolizan piruvato y ácidos grasos para producir, entre otros, acetil coenzima A y las enzimas que oxidan este metabolito en el ciclo del ácido cítrico; los principales productos de esta oxidación son CO_2 (liberado como desecho), NADH y FADH_2 , estos últimos constituyen la principal fuente de los electrones que son transportados en la cadena respiratoria (Koolman y Röhm 2004).

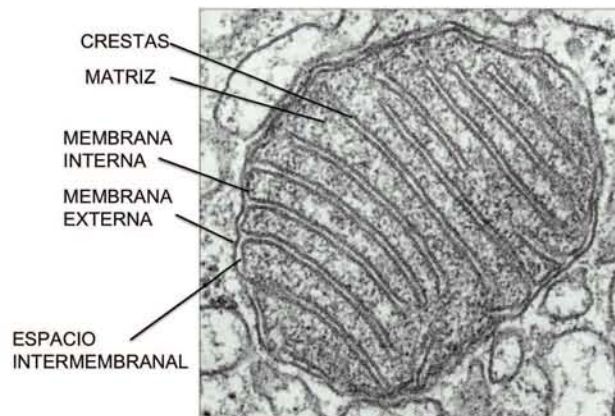


Figura 1. Fotografía de microscopía electrónica de una mitocondria de célula hepática. Se señalan las crestas mitocondriales, las dos membranas y los espacios que generan. (Modificada de Alberts *et al.* 2007).

3.2 La cadena respiratoria mitocondrial

En la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial, a través de una serie de complejos enzimáticos oligoméricos y reacciones de óxido-reducción, se transportan electrones, proceso que produce un gradiente electroquímico de protones que se utiliza para sintetizar ATP en un proceso conocido como fosforilación oxidativa (Nelson y Cox 2005). Este proceso fue descrito por primera vez por Peter Mitchell en 1961 (cita). El transporte de electrones entre los grupos prostéticos (como grupos hemo y flavinas) de los diferentes complejos respiratorios libera suficiente energía para bombear a los protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal.

El transporte de electrones inicia con el complejo de la NADH deshidrogenasa (Complejo I), que acepta los dos electrones generados cuando se pierde el ion hidronio del NADH (NAD^+), y los pasa a través de una flavina y de al menos siete centros de hierro-azufre hasta la ubiquinona (Q), ésta a su vez sirve de almacén de electrones provenientes de diversas rutas (beta oxidación, ciclo de Krebs). Siendo así, la ubiquinona puede recibir electrones de la succinato deshidrogenasa o Complejo II y transferirlos al siguiente complejo. El complejo citocromo bc_1 (Complejo III) funciona como un dímero: cada monómero tiene tres grupos hemo unidos a citocromos y a una proteína hierro-azufre; este complejo acepta los electrones de la ubiquinona reducida (ubiquinol) y los transfiere al citocromo c que a su vez transfiere los electrones al complejo de la citocromo c oxidasa (Complejo IV). Este último complejo también funciona como dímero: cada monómero tiene dos citocromos (a y aa_3) y dos átomos de cobre; acepta un electrón a la vez y transfiere cuatro al oxígeno. (Nelson y Cox 2005). (Figura 2)

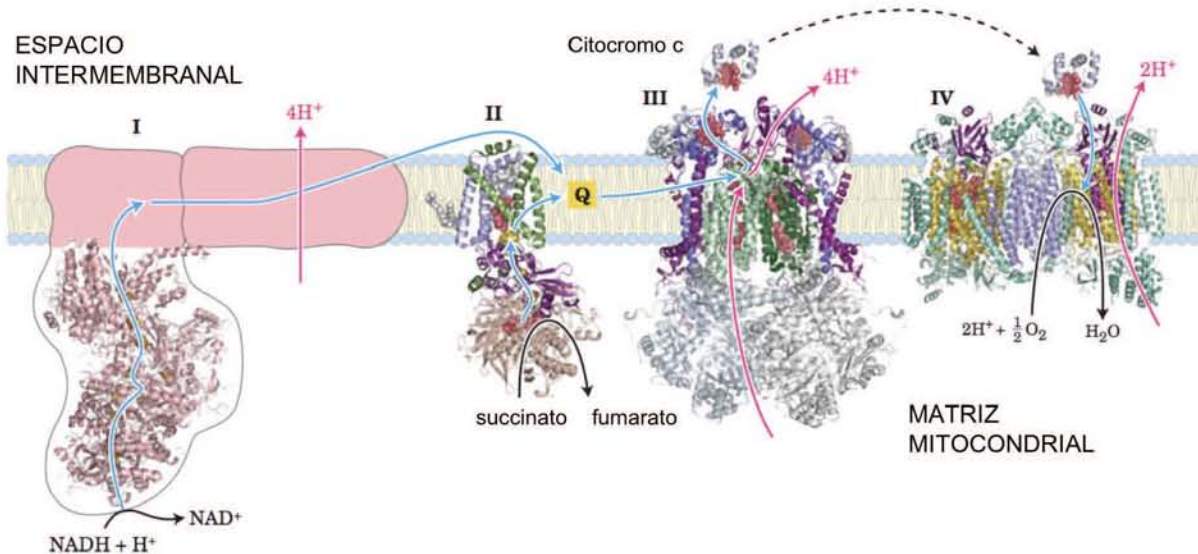


Figura 2. Flujo de protones y electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial. Los electrones llegan a la ubiquinona (Q) a través de los Complejos I y II, y ésta los lleva hacia el Complejo III que los transfiere al citocromo c. El Complejo IV pasa electrones del citocromo c (reducido) al oxígeno. El paso de electrones por los Complejos I, III y IV sucede al tiempo que se translocan protones de la matriz hacia el espacio intermembranal (Modificada de Nelson y Cox 2005).

La transferencia de electrones está naturalmente acoplada a la captura y liberación de protones y a la inducción de cambios conformacionales en los complejos que funcionan como bombas de protones (todos los complejos respiratorios pueden funcionar como bombas de protones excepto el complejo de la succinato deshidrogenasa o Complejo II), generando así el movimiento de éstos desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal (Figura 2). La translocación de protones genera, a su vez, un gradiente de pH a través de la membrana interna y una diferencia de voltaje, o potencial eléctrico de membrana. La diferencia de pH impulsa los protones de regreso a la matriz, ayudado por el potencial de membrana que atrae iones positivos hacia la matriz; este sistema constituye el gradiente electroquímico de protones (Alberts *et al.* 2007). (Figura 3)

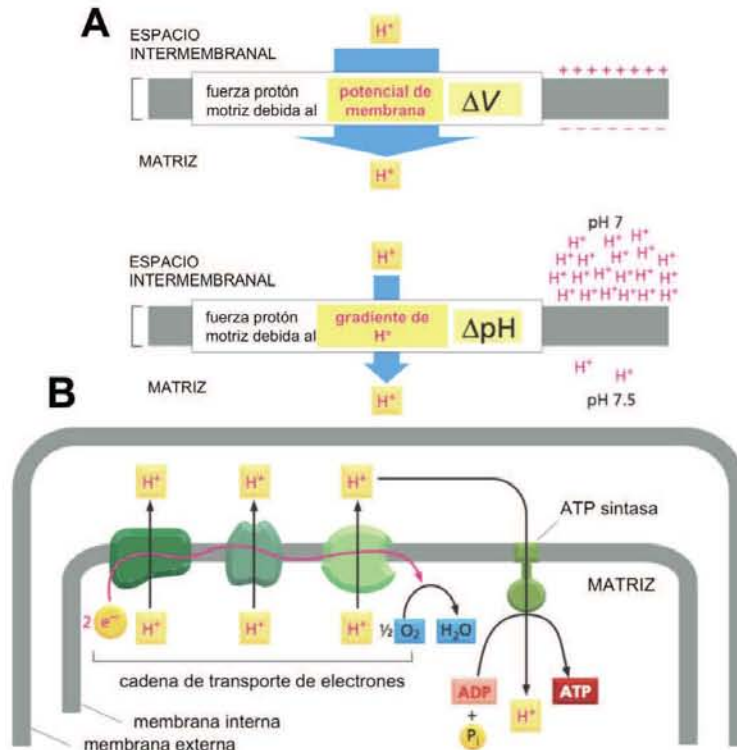


Figura 3. Gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial. A) Tanto el potencial de membrana como el gradiente de protones producen la fuerza protón motriz que conduce los protones hacia la matriz mitocondrial. **B)** El gradiente electroquímico de protones generado por la cadena de transporte de electrones impulsa protones al exterior que regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa, lo cual permite la síntesis de ATP (Imágenes modificadas de Alberts *et al.* 2007).

3.3 Las algas clorofíceas

Las algas clorofíceas o algas verdes son organismos unicelulares de vida libre que habitan generalmente en ambientes acuáticos dulces. La característica distintiva de las algas clorofíceas es la presencia de cloroplastos de doble membrana, proveedores de las clorofilas a y b y también de los llamados pigmentos accesorios, carotenoides y xantofilas (Melkonian 1990). De manera muy general, las algas que cumplen con la descripción anterior han sido agrupadas en el phylum Chlorophyta. Dentro del phylum Chlorophyta existen cuatro linajes de algas: Clorofíceas, Ulvofíceas, Trebuxofíceas y Prasinofíceas (Rodríguez-Salinas *et al.*, 2012).

El alga *Chlamydomonas reinhardtii* es un alga biflagelada y una de las algas verdes más estudiadas perteneciente al linaje de las algas Clorofíceas (Figura 4A). Sus tres

genomas han sido secuenciados y es por lo tanto un buen organismo modelo, particularmente para estudios de fotosíntesis y de estructura flagelar (Rochaix 1995 y Dutcher *et al.*, 1984). También agrupadas dentro del linaje de las Clorofíceas y por lo tanto bajo el nombre de algas verdes, están las algas incoloras del género *Polytomella*, que son parientes cercanos a *C. reinhardtii*, y se han agrupado juntas debido a que el análisis de secuencia del ADN ribosomal 18S indica que *C. reinhardtii*, *Polytomella parva*, *Polytomella sp.* y *Volvox carterii* son miembros de un solo clado monofilético llamado clado Volvox (Melkonian y Surek 1995). Algunas algas de este clado perdieron, a través de un evento evolutivo secundario, la capacidad de realizar fotosíntesis y los cloroplastos se transformaron en organelos incoloros capaces de almacenar almidón (amiloplastos).

En nuestro grupo estudiamos el alga *Polytomella sp.*, que es un alga clorofícea incolora flagelada de forma ovoide que no presenta cloroplastos ni pared celular (Figura 4B) (Pringsheim 1955), características que la convierten en un buen modelo de estudio dado que es posible aislar mitocondrias fácilmente, sin contaminación de cloroplastos, lo cual permite la consecuente purificación de los complejos respiratorios.

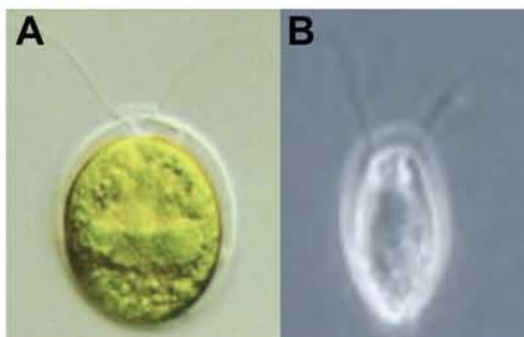


Figura 4. Imágenes de las algas clorofíceas. A) *Chlamydomonas reinhardtii* B) *Polytomella sp.*

Se piensa que el género *Polytomella* evolucionó a partir de un ancestro semejante a los miembros del género *Chlamydomonas*, pero que por algún evento evolutivo secundario perdió la pared celular y los cloroplastos (Round 1980); sin embargo estudios tanto genómicos como bioquímicos, han demostrado que estas dos algas se encuentran muy cercanamente relacionadas (Conner *et al.*, 1989 y Antaramian *et al.* 1996). Siendo así,

la relación filogenética entre ellas está apoyada por similitudes morfológicas y estructurales (Mattox y Stewart 1984) así como por la similitud bioquímica entre las subunidades α y β de la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial (Atteia *et al.*, 1997). Esta última enzima, además, es diferente a la enzima de bacterias, levaduras y mamíferos tanto estructural como funcionalmente, como se describirá más adelante.

3.4 F_1F_0 ATP sintasa

La F_1F_0 ATP sintasa (Complejo V) es un complejo enzimático oligomérico altamente conservado que se localiza en las membranas transductoras de energía, como son la membrana interna mitocondrial, la membrana tilacoidal de cloroplastos y la membrana plasmática bacteriana (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2005). Esta enzima constituye un motor molecular que aprovecha el gradiente electroquímico de protones para sintetizar ATP.

Se divide estructuralmente en dos sectores: al sector membranal se le ha llamado F_0 y al sector extrínseco de membrana se le ha llamado F_1 , éste es el que contiene el núcleo catalítico de la enzima (subunidades α_3/β_3) (Alfonzo *et al.*, 1981). Estos dos sectores están unidos por un rotor central ($\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}$, nomenclatura de las subunidades de la enzima de corazón de bovino) y un brazo periférico (OSCP/a/b/d/F6). (Figura 5) Otras subunidades importantes son la proteína inhibidora IF1, que tiene un papel regulatorio (Glendhill y Walker 2005) y las subunidades e y g que están involucradas en la formación y estabilización de la forma dimérica de la enzima (Brunner *et al.*, 2002 y Fronzes *et al.*, 2006).

El flujo de protones a través del hemicanal formado por la subunidad a provoca la rotación del anillo formado por las subunidades c y del eje central que se encuentra unido al anillo, así la energía del flujo de protones se convierte en energía mecánica generada por la interacción de la parte rotatoria de la enzima contra el brazo periférico que se mantiene fijo (Boyer 2002).

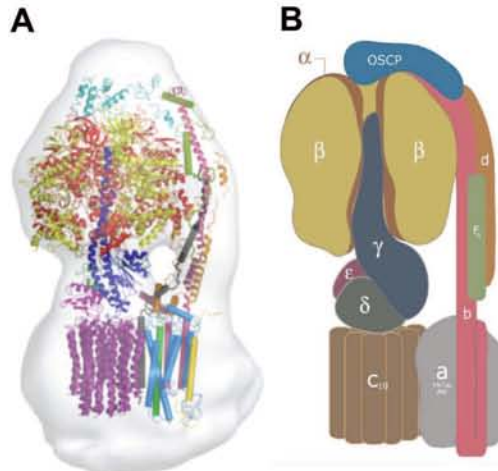


Figura 5. F_1F_0 ATP sintasa o Complejo V mitocondrial. **A)** Modelo de la F_1F_0 ATP sintasa de levadura en el que las subunidades o las partes de subunidades cuya estructura tridimensional no ha sido definida se representan con cilindros. (Modificada de Habersetzer *et al.*, 2013). **B)** Esquema de la enzima de corazón de bovino con todas las subunidades que lo componen señaladas (Tomada de Walker y Dickson 2006).

Las tres subunidades β tienen sitios de unión a ADP y P_i y la síntesis de ATP es posible al convertir la energía mecánica en energía química para formar nuevos enlaces químicos. En un ciclo completo, tres movimientos de 120° de la subunidad γ inducen cambios conformacionales consecutivos en las tres subunidades β (Itoh *et al.*, 2004) liberando 3 moléculas de ATP; de este modo la ATP sintasa es capaz de producir más de cien moléculas de ATP por segundo (Brand 2005) (Figura 6).

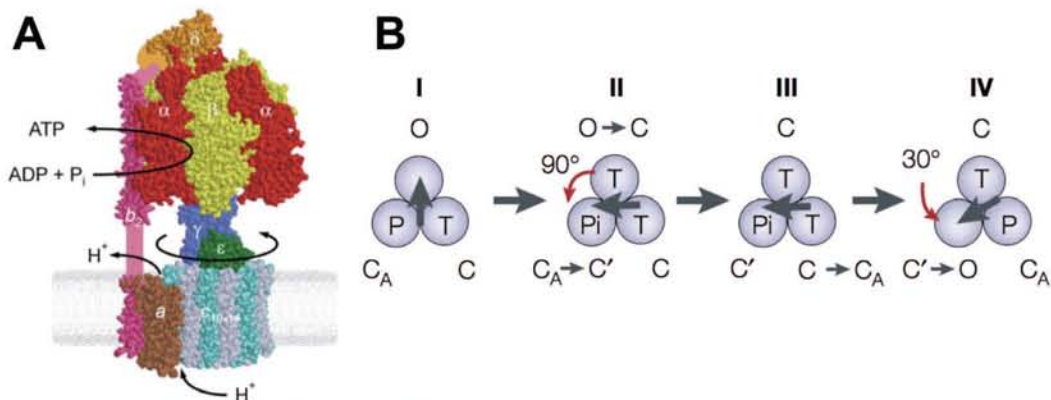


Figura 6. Mecanismo de catálisis rotatoria de la F_1F_0 ATP sintasa. **A)** Modelo en el que se ilustran los movimientos que tienen lugar durante la síntesis de ATP; la catálisis, la rotación y el movimiento de protones suceden simultáneamente (Tomada de Weber 2003). **B)** Secuencia de cambios conformacionales de la subunidad β . I a II: el ATP se une a una subunidad β abierta (O) que cambia a una estado cerrado (C) que puede acomodar ATP (T). Simultáneamente otra subunidad β cambia a un estado semi cerrado (C') y la subunidad γ gira 90° . II a III: la subunidad β pasa a estar catalíticamente activa (C_A). III a IV se libera ATP de la subunidad β activa que entonces pasa a un estado O y γ gira 30° (Tomada de Yoshida *et al.*, 2001).

3.5 Estructura de la F₁F₀ ATP sintasa

Estructuralmente la ATP sintasa varía de organismo a organismo. La ATP sintasa de bacterias contiene únicamente las subunidades indispensables para llevar a cabo su función; éstas son 8: α , β , γ , δ , ϵ , a , b y c (Weber 2006). (Figura 7A) Por otro lado, la enzima mitocondrial de mamíferos (Figura 7B) y levaduras, mientras que conserva una similitud general con las subunidades bacterianas, contiene además otras proteínas o subunidades supernumerarias que son estructurales y regulatorias; algunas de ellas también están involucradas en la dimerización u oligomerización de la enzima.

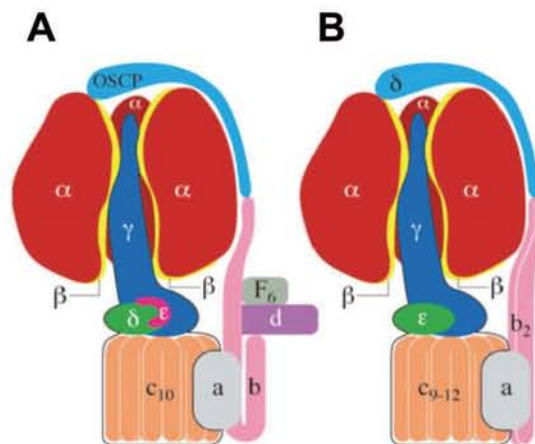


Figura 7. Comparación de la estructura de la ATP sintasa. A) ATP sintasa de *Bos taurus*. Se puede observar un mayor número de subunidades en el complejo mitocondrial de corazón de bovino, particularmente en la estructura del brazo periférico. **B)** ATP sintasa de *E. coli* en la que el brazo periférico está formado por un dímero de subunidades b (Tomada de: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/f1fo.htm>).

El brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino está compuesto por cuatro subunidades: b , d , F_6 y OSCP, esta última se conoce como el factor que confiere sensibilidad a oligomicina y es homóloga a la subunidad δ en bacterias (Walker *et al.*, 1982). Esta enzima presenta además cuatro subunidades membranales e , f , g y A6L (subunidades supernumerarias). Las subunidades e , f y A6L son necesarias para el ensamblaje del sector F_0 . Tanto las subunidades del brazo periférico como las supernumerarias de la enzima de bovino tienen homólogos en la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* (Cano-Estrada y González-Halphen 2011).

En contraste con las ATP sintasas tanto de bacterias como de mamíferos y levadura, la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas presenta una composición de subunidades atípica. Al hacer el análisis de la composición polipeptídica de la enzima de *Polytomella* sp., se encontró que contiene las subunidades del núcleo catalítico (α , β), las que forman el rotor central (γ , δ , ϵ), las subunidades *a* (ATP6) y *c* (ATP9) y la subunidad OSCP; sin embargo no se encontró ninguna de las subunidades clásicas que forman el brazo periférico en mamíferos o levaduras. En su lugar, se encontraron nueve subunidades de origen evolutivo desconocido y que no tienen homólogos definidos en las bases de datos (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). A estas subunidades se les dio el nombre de subunidades ASA (por sus siglas en inglés **ATP Synthase-Associated**) y se han numerado de la subunidad ASA1 a la subunidad ASA9. (Figura 8)

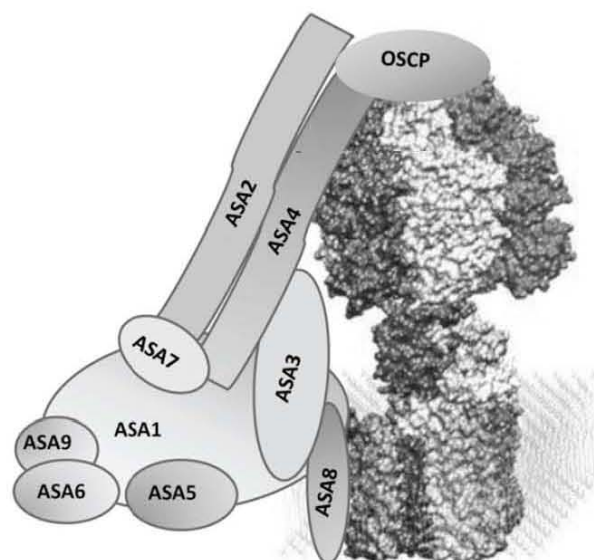


Figura 8. Modelo del acomodo de las subunidades ASA de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Se observan las interacciones que se han encontrado entre subunidades ASA y la ATP sintasa. Este modelo se obtuvo a partir de experimentos de disociación de la enzima con detergentes y calor, experimentos con agentes entrecruzadores y estudios de microscopía electrónica (Tomada de Cano-Estrada *et al.*, 2010).

En la Figura 9 se puede apreciar el patrón electroforético de las subunidades ASA de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, las cuales varían en masa molecular desde 9 kDa (ASA9) hasta más de 60 kDa (ASA1) (Figura 9). Todas las subunidades ASA están codificadas en el genoma nuclear de *Polytomella* sp., y sólo se encuentran en el linaje de las algas

clorofíceas. Se ha demostrado que la composición polipeptídica de la ATP sintasa es muy similar en *Polytomella sp.* y *C. reinhardtii* (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006).

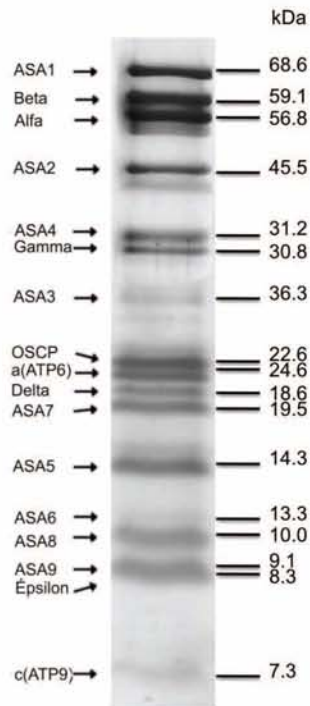


Figura 9. Patrón electroforético de las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* Separación de todas las subunidades componentes de la ATP sintasa en un gel Tricine SDS-PAGE. Se indica la masa molecular de cada subunidad.

Mientras que *in vivo* las ATP sintasas mitocondriales probablemente se encuentran en forma dimérica (Schägger 2002), se tiene evidencia de que al solubilizar una preparación de mitocondrias de corazón de bovino con el detergente lauril maltósido al 1% y observar su migración en un gel azul nativo, el complejo V se disocia y migra como un monómero de aproximadamente 750 kDa (van Lis *et al.*, 2003) (Figura 10A); este fenómeno se reproduce en las enzimas de hongos y plantas superiores.

En fuerte contraste con este comportamiento, se ha observado que las enzimas de *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.*, solubilizadas bajo las mismas condiciones, migran como un dímero estable de 1600 kDa (van Lis *et al.*, 2003, Dudkina *et al.*, 2006). (Figura 10B).

Existen datos que sugieren que las subunidades ASA6 y ASA9 de la enzima de *Polytomella sp.* son las responsables de su dimerización (Cano-Estrada *et al.*, 2010), ya

que su estequiometría con respecto a otras subunidades disminuye en la forma monomérica de la enzima.

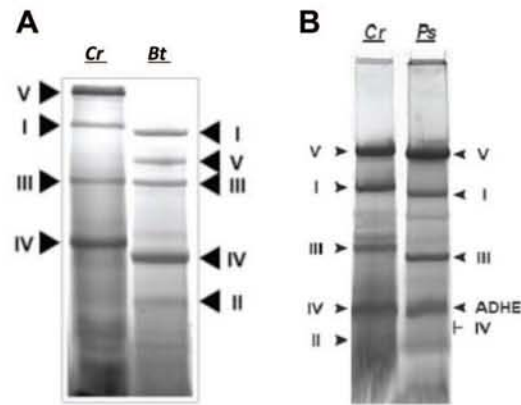


Figura 10. Comportamiento del complejo V mitocondrial observado en electroforesis nativa (BN-PAGE). A) En el primer carril se observa la migración de los complejos respiratorios de *C. reinhardtii* (Cr) y al complejo V como un dímero estable. En el segundo carril se observa la migración de los complejos respiratorios de *Bos taurus* (Bt) y al complejo V como monómero (Tomado de van Lis *et al.*, 2003). **B)** En ambos carriles se observa la migración de los complejos respiratorios de *C. reinhardtii* (Cr) y *Polytomella* sp. (Ps), en ambas el complejo V migra como dímero (Tomado de Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006).

Existen además estudios de microscopía electrónica que han revelado la presencia de un brazo periférico robusto en la ATP sintasa de las algas clorofíceas, que no se observa en la enzima de otros organismos como levadura y bovino (Dudkina *et al.*, 2005, Cano-Estrada *et al.*, 2010) (Figura 11). En un análisis de imágenes de criomicroscopía electrónica se observó que este brazo periférico parece extenderse desde el sector transmembranal de un monómero hasta la región superior del monómero contiguo (Cano-Estrada *et al.*, 2010) (Figura 11C). El modelo tridimensional obtenido a partir de este análisis es consistente con la evidencia bioquímica que sugiere que la forma estable de la enzima es dimérica (Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009).

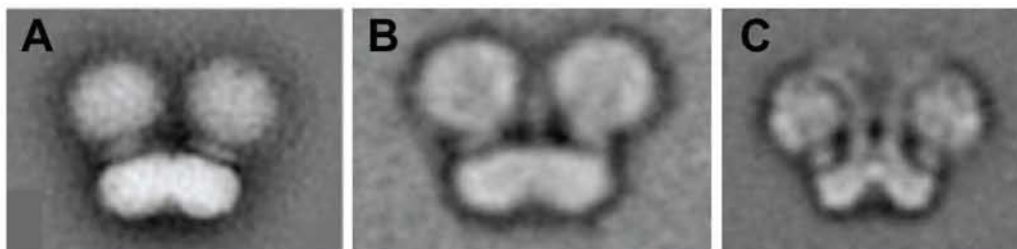


Figura 11. Microscopías electrónicas de las enzimas diméricas de A) *S. cerevisiae* (Dudkina *et al.* 2005) y **C)** *Polytomella* sp. (Cano-Estrada *et al.* 2010). En el caso de la enzima de *Polytomella* sp. se observa un brazo periférico prominente.

Las observaciones anteriores dieron pie a la hipótesis de que son las subunidades ASA las encargadas de formar el brazo periférico robusto en la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas, y que es esta estructura la que le confiere tan alta estabilidad y le permite mantenerse en forma dimérica, aún después de haberla solubilizado con detergentes y extraído de la membrana.

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

Como ya se dijo, la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. tiene una composición atípica en lo que se refiere al brazo periférico. En nuestro grupo se han realizado varios trabajos para estudiar la topología de las subunidades ASA en esta enzima y sus interacciones han sido elucidadas a partir de diversos enfoques experimentales.

Experimentos de disociación de la enzima con calor y experimentos con agentes entrecruzadores apoyan la idea de que, efectivamente, las subunidades ASA son las encargadas de formar el brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Las interacciones observadas mediante el uso de agentes entrecruzadores y generación de subcomplejos han revelado uniones clásicas como α - β y α -OSCP (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006) y también uniones entre subunidades ASA como se muestra en la Tabla 1 (Cano-Estrada *et al.*, 2010).

La estequiometría de las subunidades ASA se ha estimado a partir del marcaje de residuos de cisteína con agentes fluorescentes, y los datos obtenidos sugieren una estequiometría 1:1:1:1 para las subunidades ASA3, ASA4 y ASA5 con respecto a la subunidad γ . Asimismo, se tiene evidencia obtenida por densitometría de geles desnaturizantes teñidos con azul de Coomassie de una estequiometría 1:1:1 para las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7. Con base en la tinción de Coomassie de geles desnaturizantes se estima que el resto de las subunidades ASA también se encuentra en una estequiometría 1:1 con respecto a γ (Cano-Estrada *et al.*, 2010).

La subunidad ASA1 es la más grande de las subunidades ASA, tiene 618 aminoácidos y una masa molecular de 68.6 kDa (calculado a partir de la secuencia primaria con el servidor ExPASy: Calculate pI/Mw). Haciendo experimentos de disociación de la enzima con calor para generar subcomplejos, se observó la presencia de un subcomplejo de aproximadamente 200 kDa compuesto por las subunidades ASA1, ASA3, ASA5, ASA8, *a* y *c* (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). La presencia de ASA1 en asociación con dos subunidades típicamente membranales como son *a* y *c* y la subunidad ASA8, de la que

se predice un cruce transmembranal, lo cual sugiere que esta subunidad se encuentra cercana a la membrana o asociada con proteínas membranales (Figura 12A).

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

Tabla 1. Interacciones de las subunidades componentes de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Estas interacciones fueron obtenidas a partir de experimentos con agentes entrecruzadores (Cano-Estrada *et al.*, 2010).

Por otro lado, y en contraste con la observación anterior, estudios de microscopía demuestran una densidad electrónica considerable en el ápice de la enzima (Dudkina *et al.*, 2006); este trabajo y la predicción de una conformación globular para ASA1 son datos que sugieren que probablemente esta subunidad está localizada en una región distante de la membrana y cercana al sector F₁ (van Lis *et al.*, 2007) (Figura 12B).

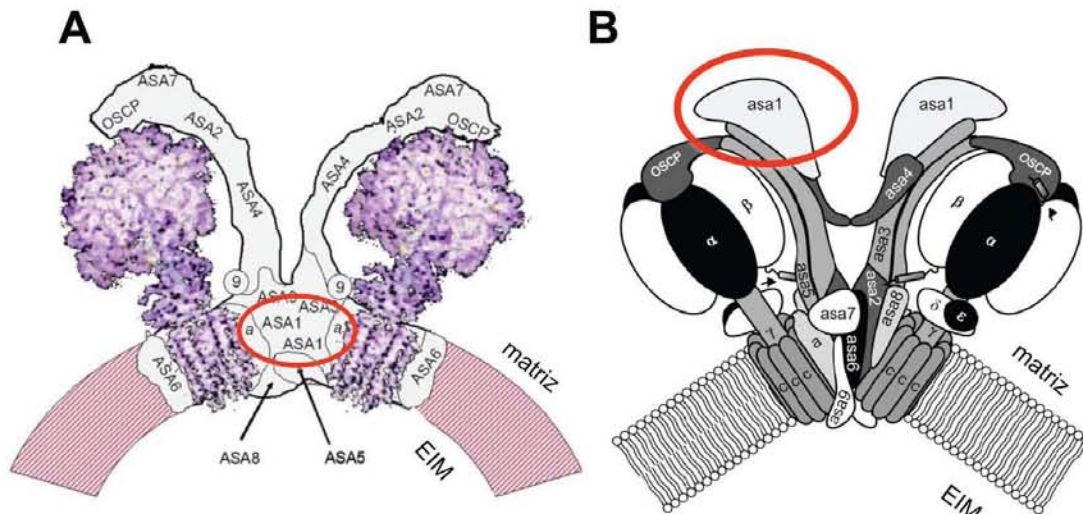


Figura 12. Modelos de la localización de la subunidad ASA1 en la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. A) Modelo en el que ASA1 se localiza asociada a la membrana junto con las subunidades a y ASA8. (Modificado de Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). B) Modelo en el que ASA1 se localiza en el ápice de la enzima en el sector F₁ y formando parte del brazo periférico (Modificado de van Lis *et al.*, 2003).

Las diferencias entre ambos modelos propuestos para la localización de ASA1 nos llevaron a preguntarnos cómo se relaciona esta subunidad con el resto de las subunidades de la enzima, y de esta manera tratar de aclarar su acomodo en la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp.

Los datos disponibles hasta el momento han permitido proponer un modelo estructural de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. tomando en cuenta todas las interacciones entre las subunidades ASA que se han encontrado, así como datos *in silico* de predicción de su estructura nativa y estudios de microscopía electrónica de la enzima. En este modelo se propone que las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 son las encargadas de formar la estructura del brazo periférico mediante interacciones de hélices entrecruzadas (Miranda-Astudillo *et al.*, 2014) (Figura 13)

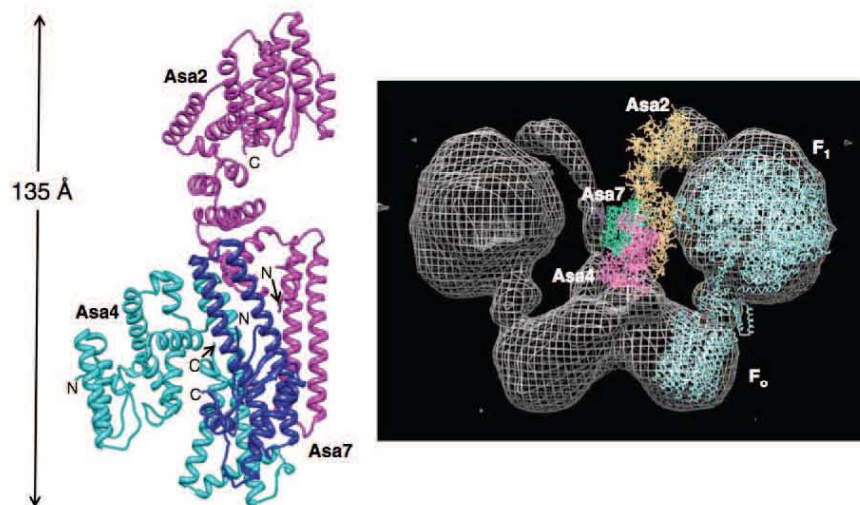


Figura 13. Modelo del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Todos los datos bioquímicos que se tienen y los datos *in silico* de predicción de estructura nativa de las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 se ajustaron a un modelo tridimensional preexistente obtenido de estudios de microscopía electrónica para obtener este modelo en el que las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7 forman el brazo periférico de la enzima a través de un subcomplejo ASA2-ASA4-ASA7 cuya posible estructura se modeló y se muestra a la izquierda (Miranda-Astudillo *et al.*, 2014).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

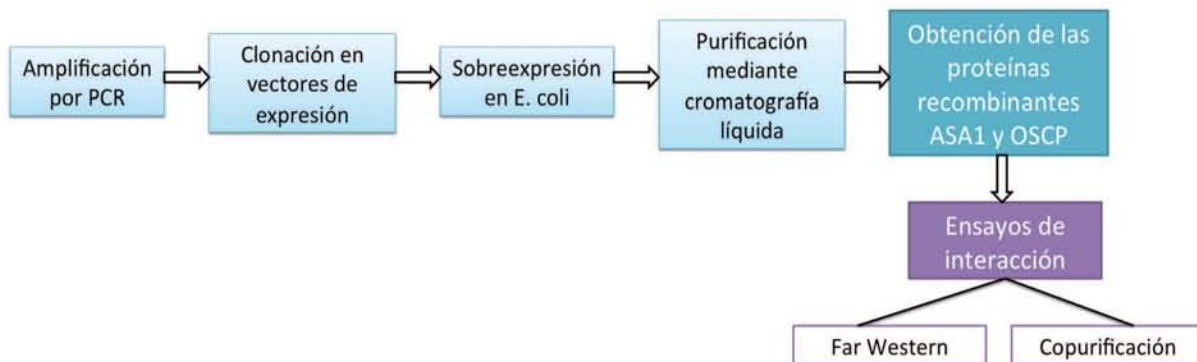
El objetivo de este trabajo es estudiar las interacciones de la subunidad ASA1 con las subunidades vecinas de la ATP sintasa mitocondrial del alga *Polytomella* sp.

5.2 Objetivos particulares

- Amplificar y clonar la secuencia codificante de ASA1
- Clonar la secuencia codificante de OSCP
- Sobreexpresar las proteínas correspondientes en *E. coli*
- Purificar ambas proteínas
- Realizar ensayos de interacción de las subunidad ASA1 recombinante y las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp.
- Realizar ensayos de interacción de ambas subunidades recombinantes

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental de este trabajo consistió en la clonación de los genes de las subunidades maduras ASA1 y OSCP de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. en vectores de expresión para posteriormente sobreexpresar las proteínas en *Escherichia coli* y purificarlas mediante cromatografía de intercambio iónico. Una vez purificadas, las proteínas recombinantes se utilizaron para realizar ensayos de interacción que comprenden inmunorréplicas de tipo Far Western y copurificaciones.



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de la proteína recombinante ASA1

7.1.1 Amplificación

La secuencia codificante de la subunidad ASA1 se amplificó por PCR a partir de una genoteca de cDNA de *Polytomella* sp. clonada en el fago λ -ZAPII utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para este gen, con los sitios de restricción para las enzimas de corte NheI y NotI (New England Biolabs). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Sentido

GCG GCATGC GCTAGC TAC CTT GCC CCC CTC CGC TCT GAT

Antisentido

GCG CTGCAG GCGGCCGC TTA GTT ACC GTT GAC GAG ATC

Se preparó la reacción en un volumen final de 50 μ L con 1 μ g de cDNA, 200 nM de deoxirribonucleótidos, 2 mM de MgCl₂ y 0.5 μ L de ADN polimerasa Accuzyme (Bioline) en el amortiguador correspondiente. La temperatura de desnaturalización inicial fue de 95°C por 5 minutos. Se realizaron 40 ciclos con una temperatura de alineamiento de 55°C por 1 minuto y una temperatura de elongación de 72°C por 1 minuto. Se agregó un paso final de elongación a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR fue separado mediante una electroforesis en agarosa al 1% en amortiguador TAE y purificado con el sistema QIAquick de extracción en gel (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

7.1.2 Clonación

Una vez purificado el producto de PCR, se añadieron poli adeninas (poli-As) al extremo 3' para clonarlo usando el sistema del vector pGEM T-easy (Promega). Este vector se escogió debido a que permite la clonación de productos de PCR de manera eficiente.

La reacción de adición de poli-As se llevó a cabo a 72°C en un volumen final de reacción de 50 µL con 50 mM de MgCl₂, 100 ng de deoxirribonucleótidos trifosfatados y 0.5 µL de Taq Polimerasa (Invitrogen). La reacción de ligación se dejó toda la noche a 16°C siguiendo el protocolo del sistema pGEM T-easy.

La reacción de ligación del vector pGEM con el fragmento correspondiente a ASA1 se utilizó para transformar células competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli* con choque térmico. Para llevar a cabo la transformación se añadió 1 µg del plásmido a 100 µL de células competentes y la mezcla se incubó por 30 min en hielo. Pasado ese tiempo se incubó a 42°C por 2 min e inmediatamente se regresó al hielo por otros 2 min. Posteriormente se agregaron 200 µL de medio LB a las células transformadas y se permitió su recuperación por 1 h a 37°C.

Se extrajo el ADN plasmídico de las colonias obtenidas en la transformación para buscar la construcción pGEM-ASA1 con el sistema de extracción Wizard Plus (Promega) y el fragmento correspondiente a ASA1 fue liberado de este vector usando los sitios de restricción de las enzimas NheI y NotI (New England BioLabs) para clonarlo en el vector de expresión pET28a (Novagen). Este vector añade una etiqueta de histidinas al extremo amino terminal de la proteína que permite purificarla por cromatografía de afinidad en una columna con níquel.

La reacción de ligación del vector pET28a con el fragmento correspondiente a ASA1 se llevó a cabo a 16°C toda la noche en un volumen final de reacción de 20 µL con 10% del volumen final de amortiguador de ligación (amortiguador 10X), 1 µL de T4 DNA Ligase (Promega) y una relación inserto:vector de 3:1.

Nuevamente se transformaron células competentes de la cepa DH5 α y se extrajo ADN plasmídico para buscar la construcción pET28a-ASA1, con la que finalmente se transformaron células competentes de la cepa BL21-CodonPlus (DE3) RIL de *E. coli* para hacer pruebas de sobreexpresión.

7.1.3 Sobreexpresión de la subunidad ASA1

Los cultivos de células se hicieron en 30 mL de medio LB adicionado con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm. Con ese cultivo se inocularon matraces de 2 L con 1 L de medio adicionado con los mismos antibióticos a 37°C hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm para poder iniciar la inducción.

El vector pET28a tiene un promotor inducible con IPTG y para inducir la expresión de ASA1 se requirió una concentración final de 0.1 mM de IPTG e incubación por 16 horas a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, el cultivo se centrifugó a 7000 x g por 20 minutos y las pastillas celulares obtenidas se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.1.4 Purificación de la proteína recombinante ASA1

Todos los pasos se realizaron a 4°C. Todos los amortiguadores y soluciones utilizados se detallan en el Anexo 1.

- a. Rompimiento de las células bacterianas: se partió de dos tubos, cada uno con la pastilla celular equivalente a 1 L de cultivo. Se resuspendió cada pastilla en 30 mL de amortiguador de rompimiento y se pasó la muestra (60 mL) a un recipiente de acero inoxidable enfriado a -20°C. La muestra se rompió con sonicación por 5 min a 5 Watts de potencia en pulsos de 50% con descansos de 1 min entre cada bloque (sumando 30-40 min totales) y finalmente se centrifugó por 4000 x g y se guardaron las pastillas.

- b. Lavado de cuerpos de inclusión (CI): se partió de las dos pastillas con CI obtenidos en el rompimiento.
- Los CI se resuspendieron en 30 mL de amortiguador de lavado y se centrifugaron por 10 min a 4000 x g. Se recuperó la pastilla.
 - Los CI se resuspendieron en 30 mL de agua fría filtrada y se centrifugaron por 10 min a 4000 x g. Se recuperó la pastilla.
 - Los CI se resuspendieron en 20 mL de amortiguador de lavado y se centrifugaron por 10 min a 4000 x g. Se recuperó la pastilla.
 - Los CI se resuspendieron en 25 mL de agua fría filtrada y se centrifugaron por 10 min a 4000 x g. Se recuperó la pastilla.
 - Los CI se resuspendieron en 20 mL de agua fría filtrada y se centrifugaron por 10 min a 4000 x g. Se recuperó la pastilla.
 - Los CI se resuspendieron en 20 mL de agua fría filtrada y se centrifugaron por 10 min a 4000 x g. Estas pastillas se guardaron a -70°C hasta su uso.
- c. Solubilización de los CI: las pastillas de CI lavados se resuspendieron en amortiguador de solubilización, se dejaron toda la noche en agitación y finalmente la muestra se centrifugó a 4000 x g por 10 minutos para eliminar el material no solubilizado.
- d. Replegado de la proteína: la muestra de CI solubilizados se cargó a una columna HisTrap Sepharose FF de 5 mL (GE Healthcare) equilibrada con amortiguador de solubilización (Figura 14A) y conectada a un equipo ÄKTA FPLC: Bombas P-920, detector UPC-900, válvula de inyección INV-907, colector Frac-920. Se diseñó un gradiente de replegado (amortiguador A \rightarrow amortiguador B en Anexo 1) de 10 volúmenes de columna con el que se disminuyó la concentración inicial de urea (8 M) hasta 0.5 M y llegó a concentraciones finales de 2% de glicerol y 0.5% de Tween 20. La concentración de NaCl se mantuvo en 500 mM (Figura 14B).
- e. Elución: una vez terminado el gradiente de replegado, la proteína se eluyó con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol (amortiguador B \rightarrow amortiguador C en Anexo

1) manteniendo iguales las concentraciones de glicerol, NaCl y urea. Se colectaron fracciones de 4 mL en tubos con DTT y EDTA a concentraciones finales de 20 mM y 10 mM, respectivamente. (Figura 14C). Estas fracciones se juntaron y la muestra se concentró con un Amicon Ultra 10 000 MWCO (Millipore) hasta una concentración de 0.94 mg/mL.

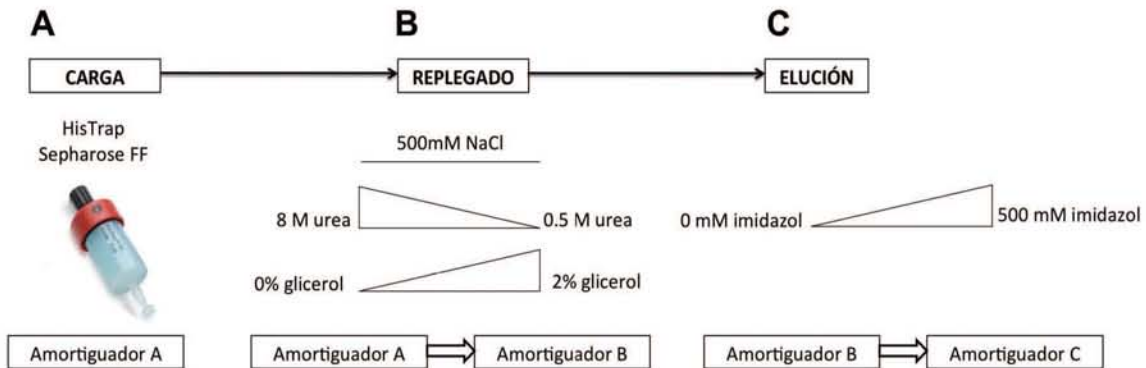


Figura 14. Diagrama de replegamiento y purificación de la proteína recombinante ASA1. La muestra de CI solubilizados se carga a una columna HisTrap Sepharose FF de 5 mL (A) en presencia de 8 M de urea. Esta concentración disminuye durante el replegamiento a la vez que aumenta la concentración de glicerol (B) y posteriormente la proteína se eluye (C) con un gradiente de imidazol.

7.2. Obtención de la proteína recombinante OSCP

7.2.1 Clonación

Se partió de una construcción pGEM-OSCP, de la cual se liberó el fragmento de interés con las enzimas NdeI y BamHI (New England BioLabs) para clonarlo en el vector de expresión pET3a (Novagen). La reacción de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE y el fragmento correspondiente a OSCP se purificó con el kit QIAquick de extracción en gel (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

La reacción de ligación del vector pET3a con el fragmento correspondiente a OSCP se llevó a cabo a 16°C toda la noche en un volumen final de reacción de 20 μ L con 10% del volumen final de amortiguador de ligación (amortiguador 10X), 1 μ L de T4 DNA Ligase (Promega) y una relación inserto:vector de 3:1. Se transformaron células

competentes de *E. coli* de la cepa DH5 α como se describió en el apartado 7.1.2 y se extrajo ADN plasmídico para buscar la construcción pET3a-ASA1, con la que se transformaron células competentes de la cepa BL21-CodonPlus (DE3) RIL de *E. coli* para hacer pruebas de sobreexpresión.

7.2.2 Sobreexpresión de la subunidad OSCP

Las células se incubaron en 30 mL de medio LB adicionado con ampicilina 50 μ g/mL hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm. Con ese cultivo se inocularon matraces de 2 L con 500 mL de medio adicionado con el mismo antibiótico a 37°C hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm y se indujeron con IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Se dejaron en incubación por 16 horas a 37°C y una vez transcurrido ese tiempo se centrifugó a 7000 x g por 20 minutos y las pastillas celulares obtenidas se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.2.3 Purificación de la proteína recombinante OSCP

Todos los pasos se realizaron a 4°C.

El rompimiento celular procedió igual que para ASA1 para obtener la proteína en cuerpos de inclusión. Éstos fueron lavados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para ASA1. Una vez lavados, los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos en presencia de urea 8.0 M en el mismo amortiguador utilizado para ASA1 e igualmente se dejaron incubando toda la noche para solubilizarlos. El material no solubilizado se eliminó centrifugando a 4000 x g por 10 minutos. Con esta muestra se procedió a purificar la proteína OSCP recombinante como se describe a continuación.

- a. Diálisis: la muestra de CI solubilizados se dializó contra 1 L de amortiguador de diálisis por 12 horas y posteriormente se centrifugó a 4000 x g por 10 minutos.

- b. Purificación: la muestra se cargó a una columna DEAE Sefarosa de 24 mL equilibrada con el amortiguador de diálisis y la proteína se eluyó con un gradiente de 0 a 1 M de NaCl de 10 volúmenes de columna en fracciones de 4 mL. Estas fracciones se juntaron y la muestra se concentró con un Amicon Ultra 10 000 MWCO (Millipore) hasta una concentración aproximada de 0.72 mg/mL.

7.3 Separación de proteínas mediante electroforesis

En este trabajo se utilizaron dos sistemas de electroforesis en condiciones desnaturizantes: el sistema de geles de Glicina SDS-PAGE (Laemmli 1970), y el sistema de geles de Tricina SDS-PAGE (Schägger 1987). Las diferencias entre el uso de amortiguadores para cada sistema se especifican en el Anexo 1. Ambos sistemas permiten la separación de proteínas al ajustar la concentración de acrilamida según se necesite para el rango de masas moleculares de las proteínas con las que se trabaje. A menos que se indique lo contrario, todos los geles utilizados para visualizar proteínas en este trabajo fueron geles de Tricina SDS-PAGE al 12%.

Para separar por completo las subunidades que componen a la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* fue necesario combinar los dos sistemas de electroforesis desnaturizante: primero se corrió al Complejo V en una primera dimensión en el sistema de geles de Glicina SDS-PAGE al 12% y posteriormente el carril se cortó y se realizó una segunda dimensión usando el sistema de geles Tricina SDS-PAGE al 14% (Figura 15). Con esta combinación de geles fue posible resolver todas las subunidades de la ATP sintasa del alga. Para nuestros fines era necesario poder separar la subunidad ASA4 de γ y la subunidad OSCP de α .

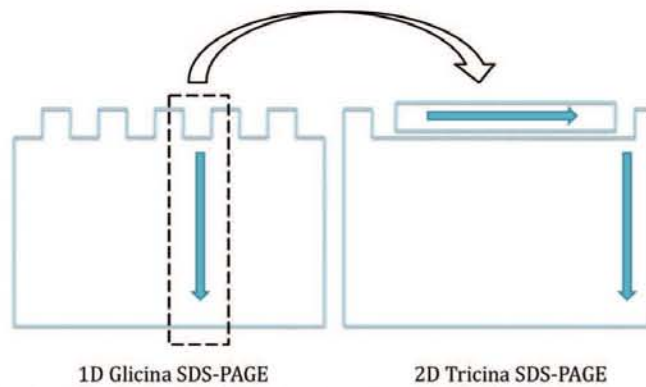


Figura 15. Combinación de electroforesis desnaturalizante utilizada para separar las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* Se separan las subunidades presentes en el Complejo V en un gel de primera dimensión (1D Glicina SDS-PAGE 12%), se corta el carril de interés completo y se corre en un gel de segunda dimensión (2D Tricina SDS-PAGE 14%).

7.4 Inmunorréplica tipo Far Western

Esta técnica está basada en la descrita previamente (Hall 2004) con las modificaciones que se describen a continuación. Las muestras se corrieron en un gel Tricina SDS-PAGE que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA por 2 horas en amortiguador de transferencia a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó en una solución de rojo de Ponceau para que fuera posible marcar todas las bandas transferidas. Se bloqueó toda la noche en agitación con amortiguador TBS adicionado con 10% de leche deshidratada y descremada.

Después del bloqueo la membrana se lavó dos veces con TBS y se incubó en agitación con la proteína de interés en su amortiguador correspondiente adicionado con 1% de leche por 4 horas. Las cantidades de proteína utilizadas para incubar la membrana fueron de 0.05 hasta 5 nanomoles. Posteriormente se hicieron 2 lavados de 5 minutos con TTBS y la membrana se incubó en agitación con el anticuerpo primario (dilución 1 : 100 000) en TTBS con 1% de leche por 3 horas. Igualmente se hicieron dos lavados con TTBS y se procedió a incubar en agitación con el anticuerpo secundario (dilución 1 : 10 000) en TTBS con 1% de leche por 2 horas.

El anticuerpo secundario que se utilizó se encuentra covalentemente unido a la enzima fosfatasa alcalina y para revelar las membranas se utilizó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) que reacciona *in situ* y da lugar a un precipitado violáceo en la membrana en el lugar de reconocimiento (Maniatis 1989). La solución para revelar se preparó al momento y se incubó en agitación hasta ver señal; para detener la reacción se dejó la membrana en agua destilada (Figura 16).

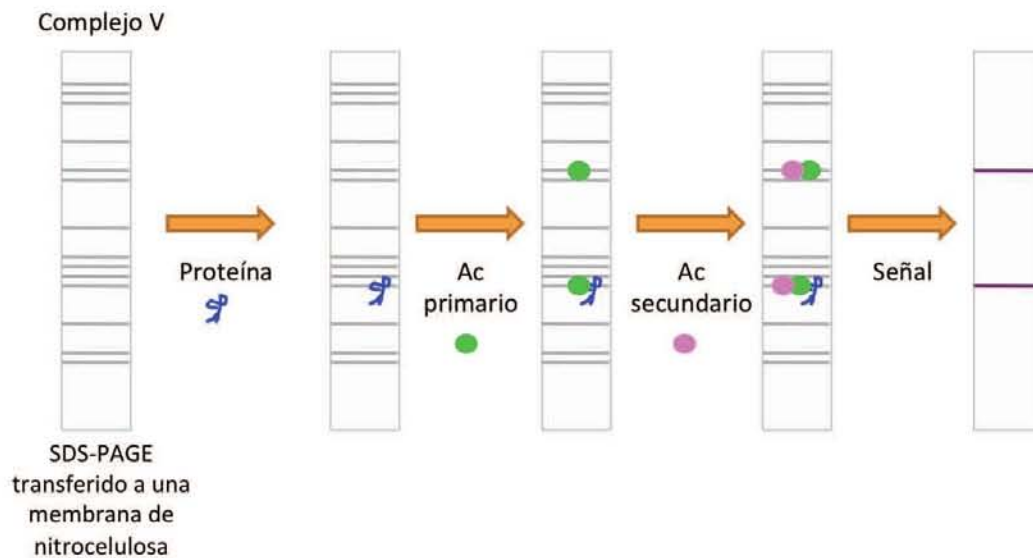


Figura 16. Inmunorreplicación tipo Far Western. Se muestra la secuencia de pasos que se siguieron para realizar estos ensayos: se transfiere un gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa que se incuba con la proteína de interés. Posteriormente se incuba con el anticuerpo primario que reconocerá a la subunidad nativa en el complejo y a aquellas a las que se haya unido. Finalmente se incuba con el anticuerpo secundario y se revela la membrana.

7.5 Copurificación ASA1_{6H}-OSCP

Todos los pasos se realizaron a 4°C.

Se utilizaron ambas subunidades recombinantes purificadas (ASA1 con etiqueta de histidinas y OSCP sin etiqueta). La subunidad ASA1 (2 mg) se dializó contra 500 mL de amortiguador de diálisis por 3 horas para eliminar la urea y el imidazol presentes en la preparación y posteriormente se centrifugó a 6000 x g por 10 minutos para eliminar el material agregado.

A esta muestra se le agregó imidazol a una concentración final de 30 mM y 50 μ L de resina NiSepharose FF (Amersham Biosciences) equilibrada con el amortiguador de diálisis. Esta muestra se dejó incubando en agitación por 4 horas y al mismo tiempo se incubó una muestra de la subunidad OSCP (0.4 mg) con 20 μ L de la misma resina como experimento control. Pasadas las 4 horas se agregó la subunidad OSCP (2 mg) a la muestra ASA1+NiSepharose y esta mezcla se incubó por 12 horas adicionales.

Para eliminar la proteína que no se unió, se hicieron lavados con 30 mM de imidazol en un volumen final de 500 μ L para la muestra OSCP+ASA1+NiSepharose y de 100 μ L para el experimento control. Para lavar se centrifugaron las muestras a 170 x g por 5 minutos, recuperando los sobrenadantes.

Finalmente se eluyeron ambas subunidades con lavados a concentraciones crecientes de imidazol (50 mM a 500 mM en pasos de 50) centrifugando igualmente y recuperando los sobrenadantes. Todos los sobrenadantes obtenidos se corrieron en un gel Tricina SDS-PAGE para observar su composición polipeptídica.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de la proteína recombinante ASA1

8.1.1 Amplificación de ASA1

Con el propósito de purificar la subunidad ASA1 de la ATP sintasa lo primero que se hizo fue amplificar el gen correspondiente a partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella* sp. (Figura 17A)

8.1.2 Clonación de ASA1

Una vez amplificado, ese fragmento de ADN se clonó en el vector pGEM (Figura 17B) y finalmente se clonó en el vector de expresión pET28a (Figura 17C), que añade una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína de interés.

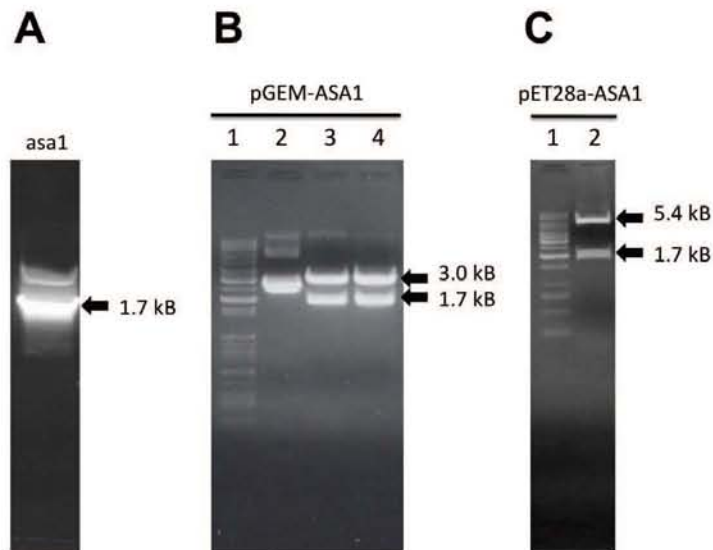


Figura 17. Amplificación y clonación del gen correspondiente a ASA1. **A)** Fragmento correspondiente a ASA1 obtenido de la amplificación por PCR. **B)** Construcción pGEM-ASA1: carril 1 marcador de tamaño, carril 2 plásmido sin cortar, carril 3 restricción con NheI y las bandas correspondientes al peso del vector (3.0 kb) y al inserto liberado de ASA1 (1.7 kb) y carril 4 restricción con NotI y las bandas correspondientes al vector y al inserto. **C)** Construcción pET28a-ASA1: carril 1 marcador de tamaño, carril 2 doble restricción con NheI y NotI y las bandas correspondientes al vector (5.4 kb) y al inserto liberado (1.7 kb).

8.1.3 Sobreexpresión de ASA1

Las cuatro clonas presentaron la proteína ASA1 sobreexpresada, ya que la banda correspondiente a la masa molecular de ASA1 sólo se encuentra en las bacterias transformadas y no en la cepa sin transformar inducida en las mismas condiciones (Figura 18A).

Para confirmar este resultado se realizó un Western Blot revelando con anticuerpo anti ASA1. La banda mayoritaria observada corresponde en todos los casos a ASA1 y no hay señal en el carril que tiene la cepa sin transformar sometida a las mismas condiciones de inducción (Figura 18B). Se escogió la clona con el número C4 para purificar debido a que fue la que presentó mayor cantidad de ASA1 sobreexpresada.

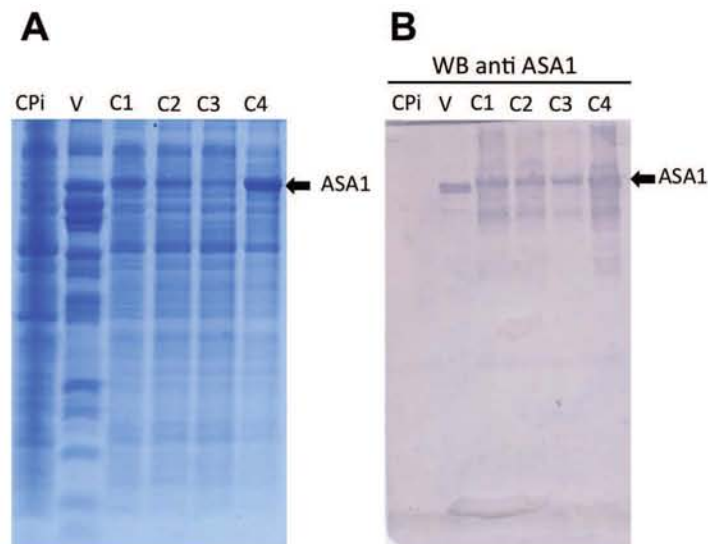


Figura 18. Sobreexpresión de la proteína recombinante ASA1. A) Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en el que se observa la cepa BL21 Codon Plus inducida (CPI), el Complejo V purificado de *Polytomella* sp. (V) y los extractos totales de los cultivos inducidos (C1 a C4). Se observa una banda correspondiente a la masa molecular de ASA1 que no está presente en la cepa sin transformar inducida. B) Western Blot anti ASA1 en el que se observa señal correspondiente a la subunidad ASA1 en el Complejo V de *Polytomella* sp. y a la misma altura en los extractos totales de las cuatro colonias. En el carril con la cepa sin transformar no se observa señal.

8.1.4 Purificación de ASA1

La proteína se obtuvo en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (CI) que fueron lavados en un amortiguador que contiene Triton X-100, y los sobrenadantes obtenidos se muestran en la Figura 19. El último carril es una muestra de los CI lavados y se puede ver que la banda correspondiente a ASA1 está enriquecida y las bandas de fondo disminuyen (comparar con el carril de la pastilla celular).

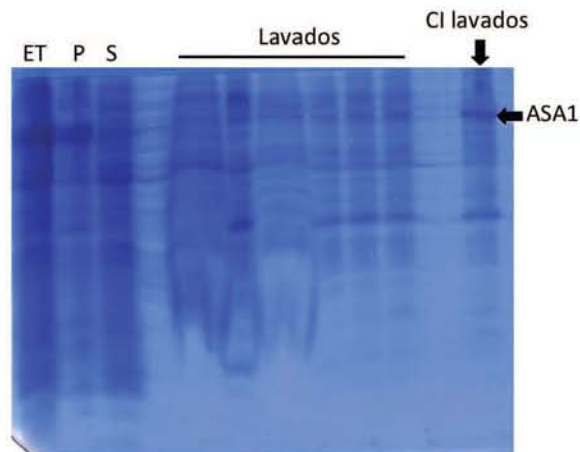


Figura 19. Lavado de cuerpos de inclusión de la subunidad recombinante ASA1. Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha: extracto total (ET), pastilla celular (P), sobrenadante (S), lavados con Tritón X-100 y agua destilada y muestra de cuerpos de inclusión lavados. Se observa que la subunidad ASA1 se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble (P) y en la muestra de CI lavados se puede ver el enriquecimiento de la banda correspondiente a ASA1 y la disminución de las bandas contaminantes.

La subunidad ASA1 se purificó como se explica en el punto 1.4 de la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 20 se muestran las fracciones correspondientes al pico de elución cromatográfica de ASA1. Se puede ver que una cantidad considerable de proteína no se unió a la columna y que existe degradación de la proteína eluida. Con la proteína recombinante purificada se procedió a realizar ensayos de interacción con la técnica de inmunorréplica tipo Far Western.

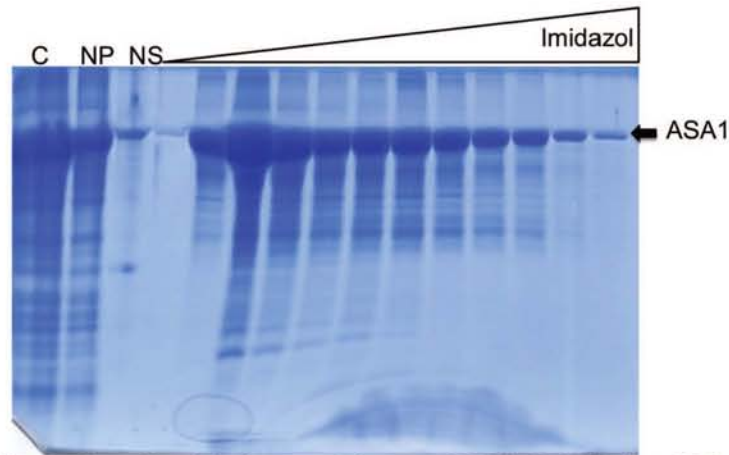


Figura 20. Purificación de la subunidad recombinante ASA1. Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha: lo que se cargó a la columna HisTrap Sepharose FF 5mL (C), lo que no se unió a la columna (NP), cuerpos de inclusión no solubilizados (NS), pico de elución de ASA1. Se puede observar que la proteína ASA1 eluyó con el gradiente de imidazol ya que la banda correspondiente a su masa molecular se encuentra fuertemente enriquecida.

8.2 Obtención de la proteína recombinante OSCP

8.2.1 Clonación de OSCP

El fragmento correspondiente a OSCP se liberó de una construcción pGEM-OSCP y se clonó en el vector de expresión pET3a ya que éste permite la obtención de la proteína recombinante carente de etiqueta de histidinas (Figura 21).

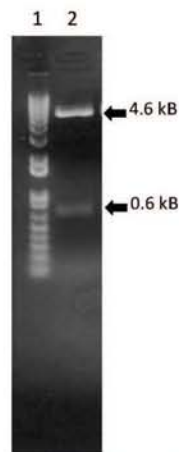


Figura 21. Clonación del gen correspondiente a OSCP. Construcción pET3a-OSCP. Carril 1 marcador de tamaño, carril 2 la restricción del plásmido con las enzimas NdeI y BamHI. Se observan las bandas correspondientes al tamaño del vector (4.6 kb) y al inserto liberado de OSCP (0.7 kb).

8.2.2 Sobreexpresión de OSCP

Se hicieron pruebas de sobreexpresión con ocho clonas y se obtuvo la proteína OSCP sobreexpresada en todas las clonas probadas como se muestra en el gel con los extractos totales de los cultivos inducidos en la figura 22. Se escogió la clona C4 para posteriormente purificar la proteína.

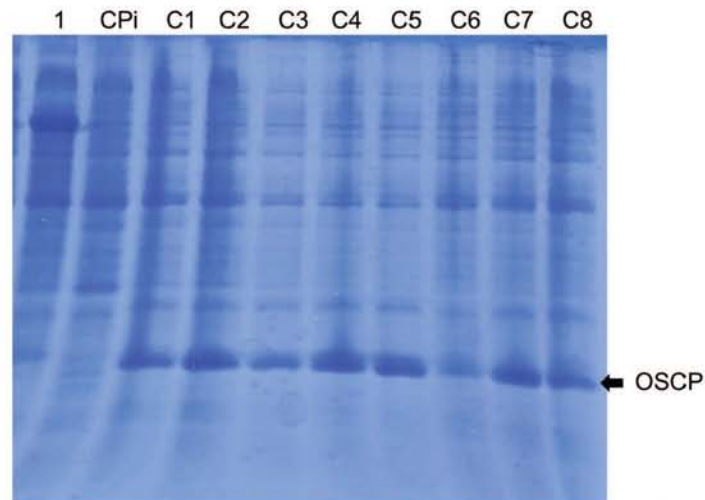


Figura 22. Sobreexpresión de la proteína recombinante OSCP. Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha se observa el extracto total de cultivo de ASA1 (1) sobreexpresada, la cepa BL21 Codon Plus inducida (CPi) y los extractos totales de los cultivos inducidos (C1 a C8) de OSCP. Se observa la presencia de una banda correspondiente a la masa molecular de OSCP en las ocho clonas, que no se encuentra en la cepa sin transformar inducida con IPTG.

8.2.3 Purificación de OSCP

Esta proteína, como ASA1, se obtuvo en la fracción insoluble en cuerpos de inclusión que fueron lavados siguiendo el mismo procedimiento que se siguió para ASA1. También se obtuvo una banda enriquecida con OSCP y la disminución de las bandas de fondo (Figura 23).

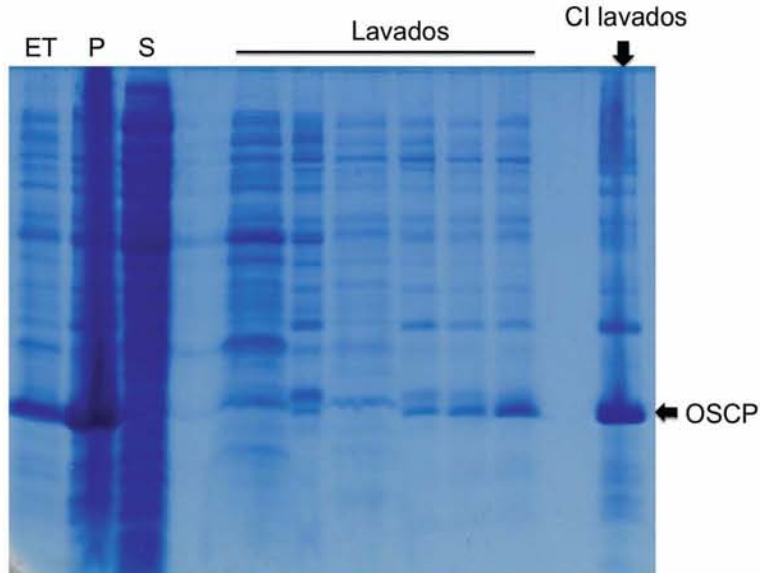


Figura 23. Lavado de cuerpos de inclusión de la subunidad recombinante OSCP. Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha: extracto total (ET), pastilla celular (P), sobrenadante (S), lavados con Tritón X 100 y agua destilada y muestra de cuerpos de inclusión lavados. Se observa que la proteína OSCP se encuentra en la fracción insoluble (P) y en la muestra de CI lavados se observa el enriquecimiento de la banda correspondiente a la masa molecular de OSCP.

La muestra obtenida de CI lavados y solubilizados se cargó en una columna DEAE Sefarosa y se purificó como se describe en el punto 2.2 de la sección de Materiales y métodos. En la Figura 24 se muestran los geles correspondientes al perfil de elución de OSCP, en los que se puede observar que la proteína OSCP eluye al aplicarse un gradiente de NaCl a la columna. Esta proteína se purificó con muy pocos contaminantes y no se observó degradación.

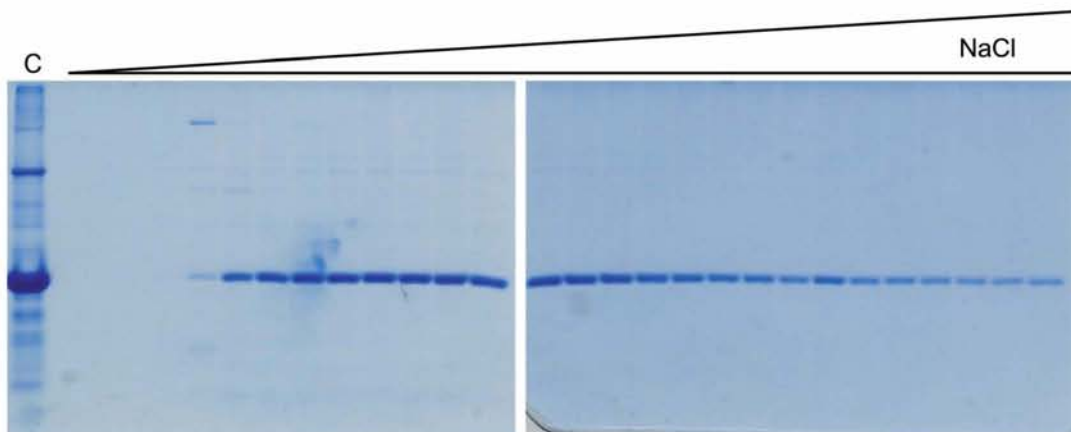


Figura 24. Purificación de la subunidad recombinante OSCP. Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha: lo que se cargó a la columna DEAE Sepharose FF (C) y el gradiente de elución de OSCP. Se observa que la proteína eluye con el gradiente de NaCl sin que haya degradación.

8.3 Ensayos de interacción entre ASA1 y las otras subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp.

8.3.1 Inmunorréplica tipo Far Western

El primer ensayo de Far Western se realizó con el complejo V purificado de *Polytomella* sp. en la membrana, incubando con concentraciones crecientes de ASA1 y revelando con anticuerpo anti-ASA1. Además de la banda correspondiente a la subunidad ASA1 del complejo, que es reconocida directamente por el anticuerpo anti-ASA1, se observó la señal para la subunidad β , con la subunidad ASA4 o γ y con la subunidad OSCP o α .

La duda de cuál subunidad es la teñida en este experimento se debe a que éstas migran prácticamente igual en geles de Tricina SDS-PAGE (ASA4 con γ y OSCP con α) (Figura 25). En estos experimentos la aparición de bandas adicionales indica una posible interacción de la proteína ASA1 con otros polipéptidos de la ATP sintasa.

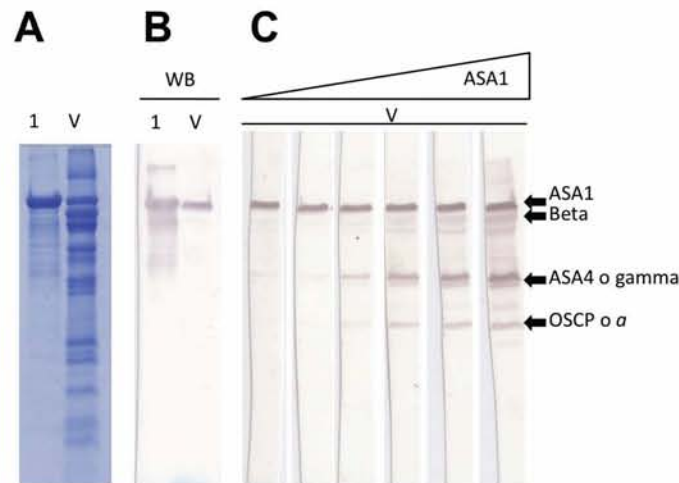


Figura 25. Interacción de la subunidad ASA1 recombinante con las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. A) Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en el que se observa la subunidad ASA1 (1) y el complejo V purificado de *Polytomella* sp. (V) **B)** Western Blot decorado con anticuerpo anti ASA1 en el que se observa el reconocimiento de ASA1 recombinante y ASA1 en el Complejo V de *Polytomella* sp. **C)** Far Western Blot incubado con concentraciones crecientes de ASA1 recombinante en el que se observan interacciones entre la subunidad ASA1 y la subunidad OSCP del complejo V purificado de *Polytomella* sp., así como una posible unión con las subunidades beta, ASA4 o gamma y OSCP o α .

Dado el resultado anterior y con el objetivo de corroborar la interacción ASA1-OSCP, se procedió a realizar un ensayo de Far Western con la proteína OSCP recombinante en la membrana. En este experimento se observó la tinción de la banda correspondiente a la proteína OSCP, cuya intensidad aumentó a medida que aumentó la cantidad añadida de ASA1 (Figura 26). Este resultado sugiere que ASA1 efectivamente se une a OSCP, sugiriendo que en el experimento anterior ASA1 se une a OSCP y no a la subunidad *a*. (Figura 25).

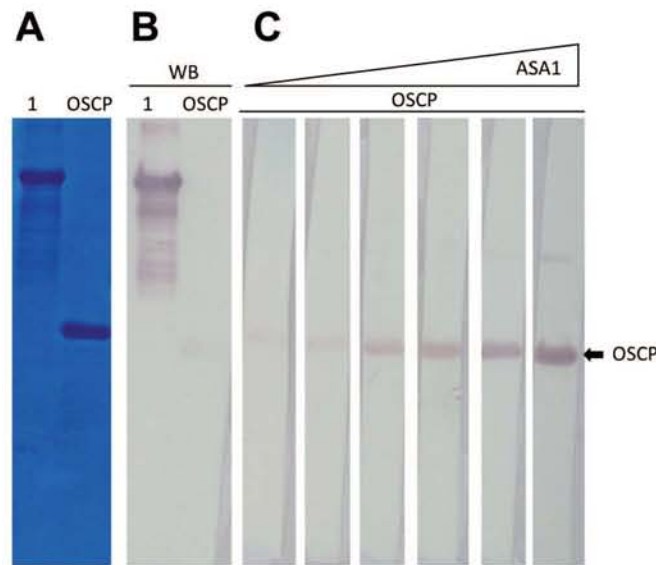


Figura 26. Interacción de la subunidad ASA1 recombinante con la subunidad recombinante OSCP. **A)** Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en el que se observan las subunidades recombinantes ASA1 y OSCP **B)** Western Blot decorado con anticuerpo anti ASA1 en el que se observa el reconocimiento de ASA1 recombinante **C)** Far Western Blot en el que se observa la unión entre la proteína ASA1 recombinante y la proteína OSCP recombinante en la membrana.

8.3.2 Inmunorréplica tipo Far Western en geles de segunda dimensión

Para corroborar las interacciones deducidas de los ensayos de Far Western anteriores era necesario separar por completo todas las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp., para lo cual se combinaron dos sistemas de electroforesis como se describe en el punto 3 de la sección de Materiales y métodos.

Una vez obtenida la separación deseada (Figura 27A) se realizó un ensayo de Far Western sobre la membrana con las subunidades resueltas por segunda dimensión. Se

observó la aparición de bandas que sugieren uniones específicas entre ASA1 y OSCP, entre ASA1 y β y entre ASA1 y γ (Figura 27C).

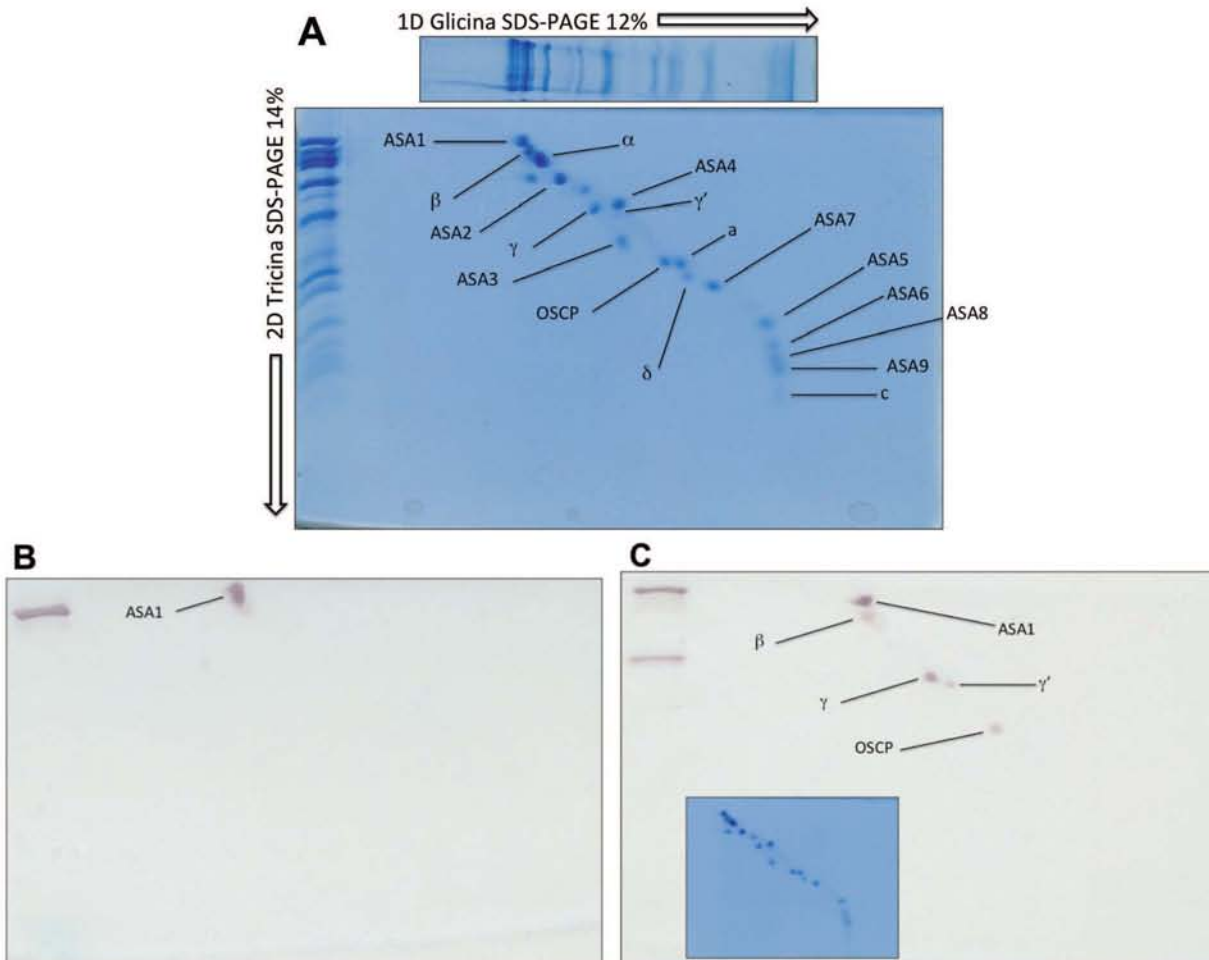


Figura 27. Interacción de la subunidad ASA1 recombinante con las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. en geles 2D Tricina SDS-PAGE mediante la técnica de inmunorréplica tipo Far-Western. A) Geles de 1D Glicina SDS-PAGE y 2D Tricina SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie en los que se observa la separación de todas las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. **B)** Western Blot decorado con anticuerpo anti ASA1 en el que se observa el reconocimiento de la subunidad ASA1 en el complejo V de *Polytomella* sp. **C)** Far Western Blot anti ASA1 en el que se revelan uniones específicas ASA1-beta, ASA1-gamma, ASA1-gamma' y ASA1-OSCP.

El resultado anterior se confirmó haciendo el experimento complementario, incubando con la proteína recombinante OSCP y revelando con anticuerpo anti- OSCP. En este ensayo de Far Western se observó la aparición de bandas que sugiere la unión entre OSCP y ASA1, lo cual confirma los resultados anteriores, además de las uniones entre OSCP y α , y entre OSCP y γ . (Figura 28)

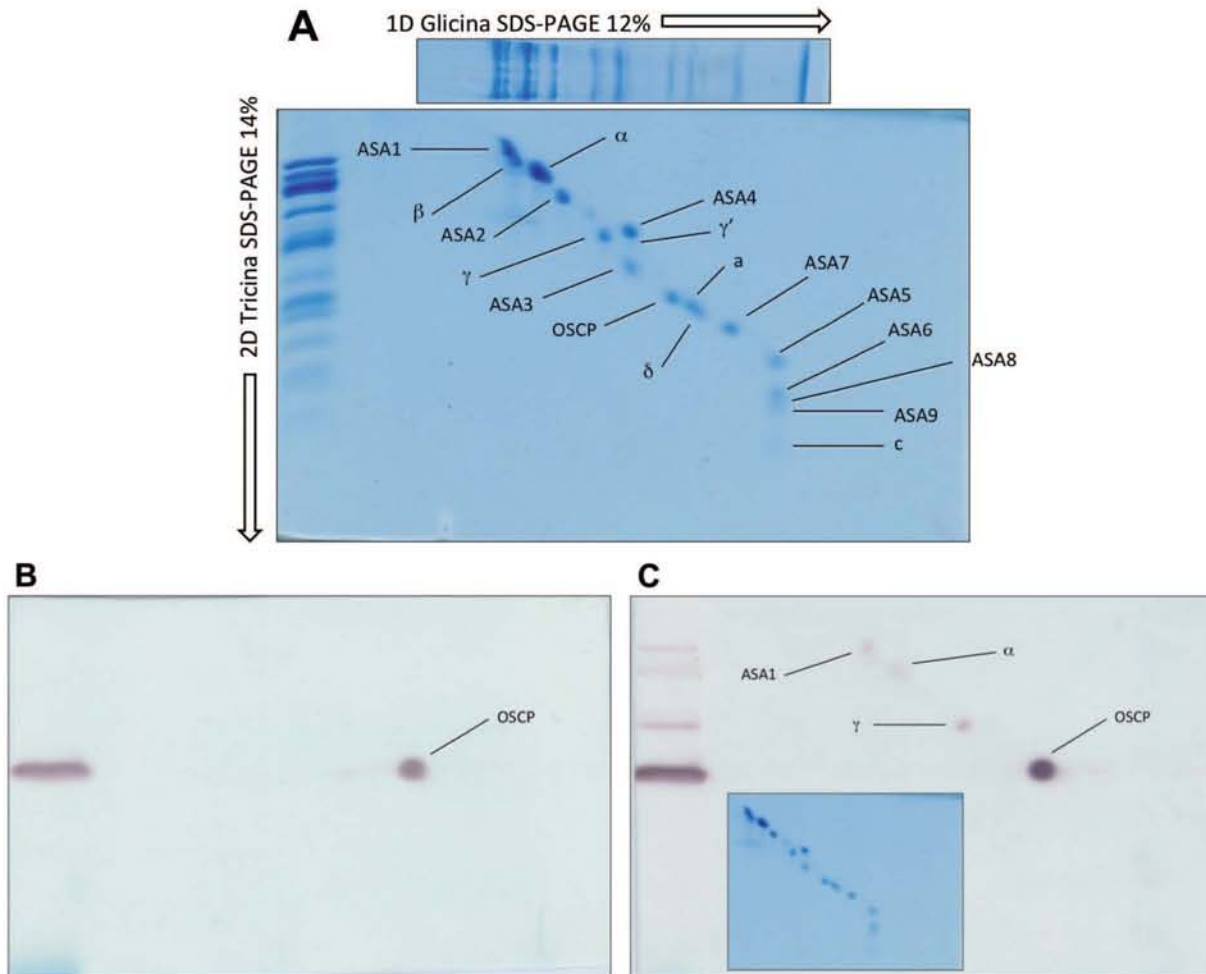


Figura 28. Interacción de la subunidad OSCP recombinante con las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. en geles 2D Tricina SDS-PAGE mediante la técnica de inmunorréplica tipo Far-Western. A) Geles de 1D Glicina SDS-PAGE y 2D Tricina SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie en los que se observa la separación de todas las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. B) Western Blot decorado con un anticuerpo anti OSCP en el que se observa el reconocimiento de la subunidad OSCP en el complejo V de *Polytomella* sp. C) Far Western Blot anti OSCP en el que se observan uniones específicas OSCP-ASA1, OSCP-alfa y OSCP-gamma.

Para hacer un estudio más detallado de la interacción ASA1-OSCP, se utilizaron dos versiones adicionales de la proteína OSCP, una con etiqueta de histidinas (OSCP_{6H}) y otra sin extremo carboxilo terminal (OSCP-N); ambas purificadas en condiciones desnaturizantes por cromatografía de afinidad a partir de construcciones realizadas previamente. Se hicieron ensayos de inmunorréplica tipo Far Western en los que se incubó con una sola concentración de la subunidad ASA1, se mantuvo a las distintas proteínas OSCP en la membrana y se decoró con anticuerpo anti ASA1.

Los resultados observados confirman la interacción ASA1-OSCP y descartan la influencia de la etiqueta de histidinas sobre la misma. Además, la ausencia de señal en el carril con OSCP-N indica que la interacción entre ASA1 y OSCP probablemente está dada por el extremo carboxilo de OSCP (Figura 29).

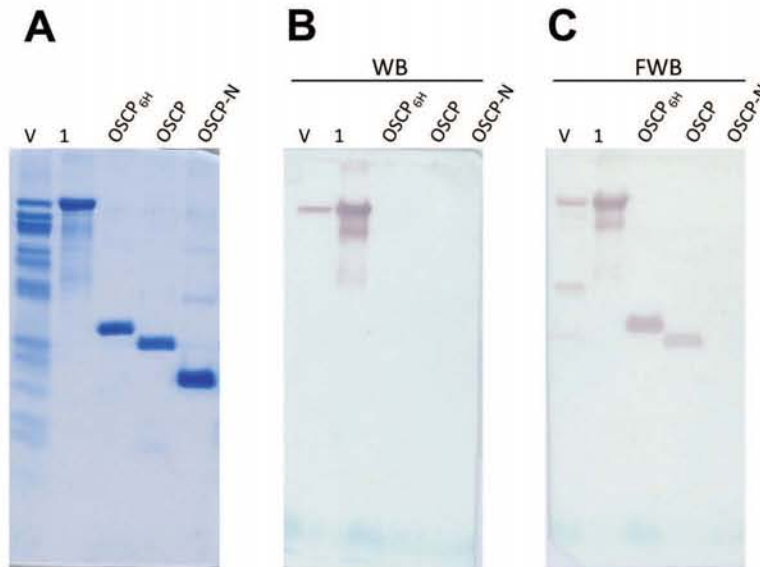


Figura 29. Interacción de la subunidad ASA1 recombinante con diferentes subunidades recombinantes OSCP. A) Gel Tricina SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en el que se observa el complejo V (V) y las subunidades recombinantes ASA1 (1), OSCP_{6H}, OSCP y OSCP-N **B)** Western Blot decorado con anticuerpo anti ASA1 en el que se observa el reconocimiento de ASA1 en el complejo V y la subunidad recombinante **C)** Far Western Blot en el que se observa la unión entre la proteína ASA1 recombinante y ambas proteínas OSCP recombinantes enteras (OSCP_{6H} y OSCP); no se observa señal en el carril con OSCP-N.

8.4 Copurificación ASA1_{6H}-OSCP

Para confirmar la interacción ASA1-OSCP observada en las inmunorrélicas tipo Far Western se realizó la copurificación de ambas subunidades haciendo uso de la etiqueta de histidinas de ASA1. Ambas proteínas coeluyeron con un gradiente de imidazol, lo cual es indicativo de una interacción (Figura 30A). Por otra parte, se demostró que no existe unión inespecífica de la proteína OSCP (que no tiene etiqueta de histidinas) a la resina utilizada (Figura 30B).

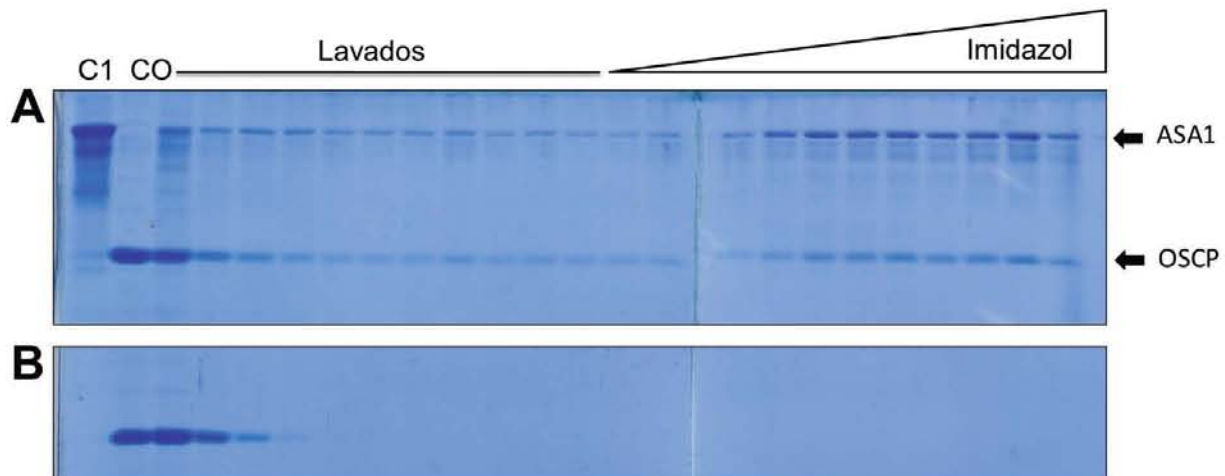


Figura 30. Copurificación de las proteínas ASA1 y OSCP recombinantes por cromatografía de afinidad. A) Se observan las muestras iniciales de ASA1 (C1) y de OSCP (CO) seguidas de once lavados con 30 mM de imidazol y la presencia de ambas subunidades (OSCP y ASA1-6His) en la elución con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol. **B)** Se observa que no hay unión inespecífica de la subunidad OSCP a la resina dado que no eluye con el gradiente de imidazol.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la interacción ASA1-OSCP se llevaron a cabo análisis *in silico* de predicción de estructura y alineamientos de las secuencias correspondientes. Se identificaron las regiones de la subunidad b involucradas en la interacción con OSCP del brazo periférico de la enzima de bovino (Rees *et al.*, 2009) y se alinearon las secuencias de ASA1 y b por medio de BLASTP para buscar residuos conservados; un análisis similar se hizo para OSCP y se alinearon las secuencias de esta subunidad en bovino y en *Polytomella* sp. (Figura 31A)

A través del alineamiento de las secuencias de la subunidad OSCP perteneciente a otras algas clorofíceas y a algas trebuxofíceas y mamielofíceas se encontró que cuatro de los residuos involucrados en la interacción con la subunidad b en bovino están conservados en el linaje de las algas clorofíceas (VDMS) y de éstos dos están conservados en los otros dos linajes (D y S) (Figura 31B). Una vez identificadas las regiones de interacción de las subunidades ASA1 y OSCP, se modeló esta asociación tomando como base la estructura cristalográfica de la enzima de bovino (Figura 32).

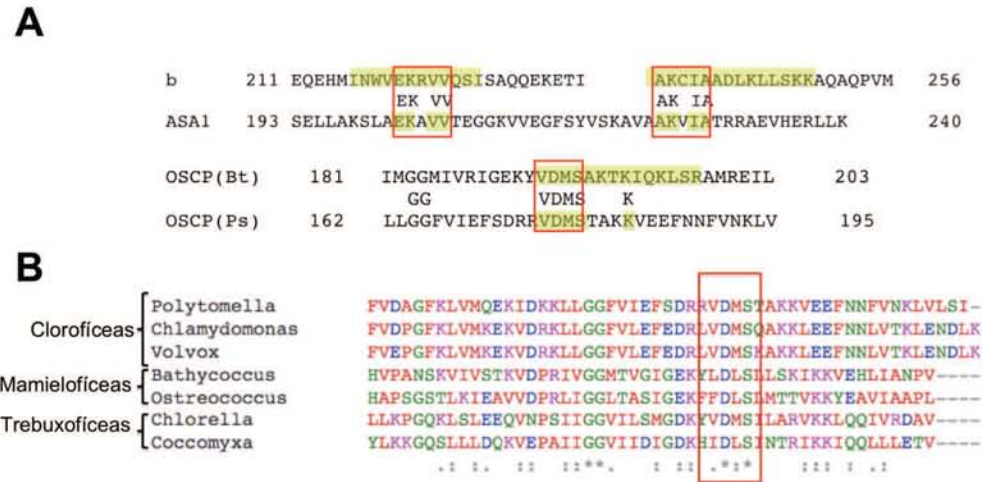


Figura 31. Alineamientos de la región de interacción de la subunidad b y OSCP con las secuencias de ASA1 y de la subunidad OSCP de *Polytomella* sp. A) Se muestran resaltados en amarillo los residuos involucrados en la interacción de la subunidad b con OSCP según la estructura cristalográfica de la enzima de bovino y de éstos aquellos conservados en la subunidad ASA1 están resaltados en amarillo y en un recuadro. En la parte inferior se muestran resaltados los residuos involucrados en la interacción de la subunidad OSCP de la enzima de bovino (Bt) y los conservados en la subunidad OSCP de *Polytomella* sp. (Ps). B) Alineamiento de la subunidad OSCP de algas clorofíceas, mamielofíceas y trebuxofíceas. En el recuadro se encierran los residuos conservados.

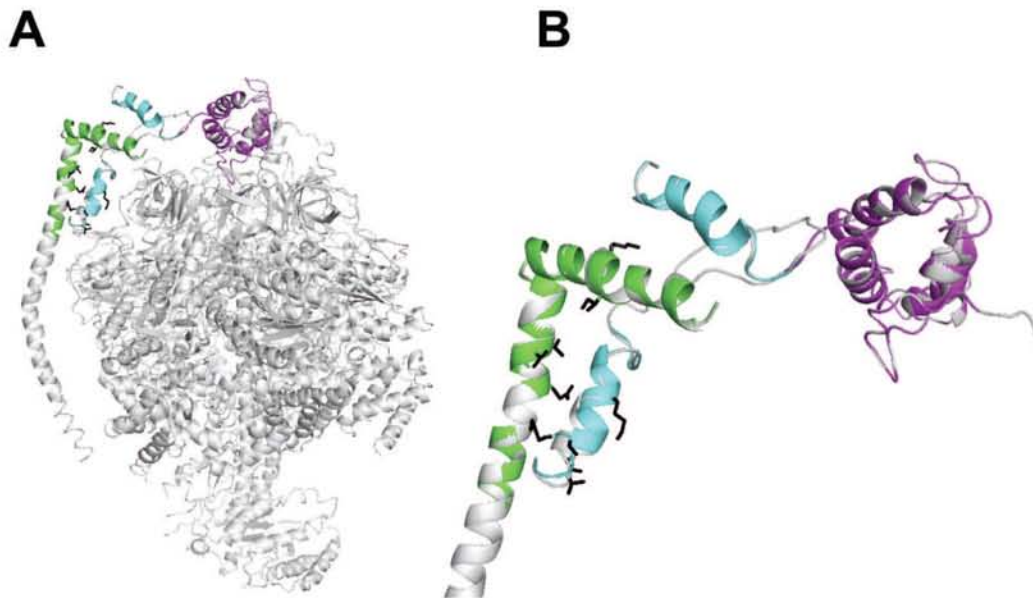


Figura 32. Modelos de la subunidad OSCP y de la región de unión de la subunidad ASA1 sobre la estructura cristalográfica de la enzima de bovino. Se modelaron el extremo amino terminal (OSCP-N) y la región de unión entre las subunidades ASA1 y OSCP en el brazo periférico. A) Sobreposición de los modelos obtenidos sobre la estructura cristalográfica de la enzima de bovino (PDB 2WSS). En morado se muestra el fragmento amino terminal de OSCP, en azul la región de unión de OSCP con la subunidad ASA1 mostrada en verde, en gris se muestra la estructura cristalográfica del sector F₁ (Rees *et al.*, 2009). B) Acercamiento de la región de unión entre OSCP y ASA1 observada en (A). Se muestran en negro los residuos conservados entre las subunidades de *Polytomella* sp. y *Bos taurus* tanto para ASA1 como para OSCP. Los colores corresponden a los de (A).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un nuevo modelo del acomodo de las subunidades ASA en la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp., específicamente de aquellas involucradas en la formación del brazo periférico, el cual se esquematiza en la figura 32. Los datos obtenidos en el presente trabajo permiten proponer que la subunidad ASA1 se extiende desde la región membranal hasta la región catalítica de la enzima (interactuando así con OSCP y probablemente con la subunidades γ y β).

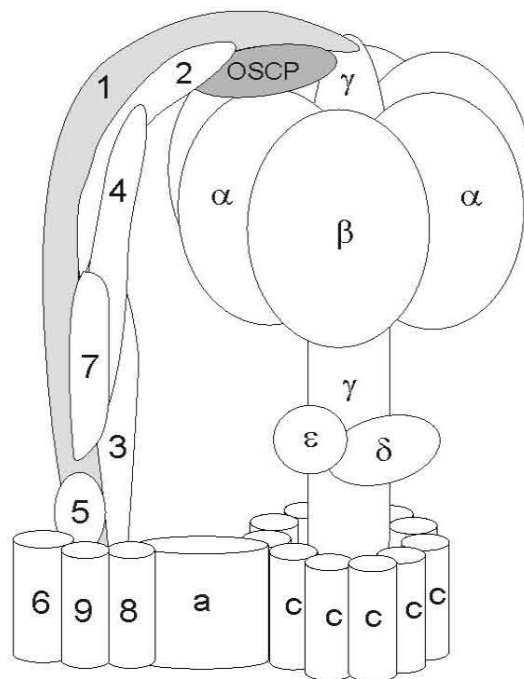


Figura 32. Modelo de la topología de las subunidades ASA del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Se ilustra el acomodo propuesto de las subunidades ASA basado en datos bioquímicos anteriores y en los datos obtenidos en este trabajo.

9. DISCUSIÓN

Es importante conocer cómo interaccionan las proteínas para entender el funcionamiento de una célula. A través de los años se han desarrollado varios métodos para el estudio de asociaciones entre proteínas, que pueden ser aproximaciones *in vivo* o *in vitro*. Algunas de las técnicas de estudio de interacciones *in vivo* más comunes son el sistema de doble híbrido (Fields y Song 1989), la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Gordon *et al.*, 1998) y la transferencia de energía por bioluminiscencia (BRET) (Pfleger *et al.*, 2006).

El sistema de doble híbrido está basado en la activación de genes reporteros cuando dos proteínas se asocian y se puede aplicar en células bacterianas, de levadura o de mamífero; se utiliza principalmente para el estudio de proteínas solubles, aunque existen modificaciones para utilizarlo con proteínas de membrana (Wang *et al.*, 2004). Una desventaja importante de este método es la presencia de resultados tanto falsos positivos como falsos negativos, además de que no está asegurado el plegamiento de los dominios de unión. Por su parte, los estudios de interacción por fluorescencia requieren del diseño de vectores de expresión, del equipo necesario para realizar los ensayos y no pueden utilizarse para determinar si dos proteínas se unen directamente (Wu *et al.*, 2007).

En este trabajo se utilizó la inmunorréplica tipo Far Western para estudiar interacciones, ésta es una técnica *in vitro* que se desarrolló inicialmente con el objetivo de identificar proteínas en bibliotecas de expresión de proteínas fusionadas a GST y marcadas radioactivamente (Kaelin *et al.*, 1992); sin embargo actualmente se utiliza para estudiar interacciones de proteínas no modificadas y es una aproximación que permite determinar si dos proteínas se unen directamente.

Una ventaja de utilizar esta técnica es que en principio permite que una de las proteínas de interés se exprese endógenamente en la célula, sin necesidad de purificarla; sin embargo, trabajar con ambas proteínas purificadas disminuye considerablemente la posibilidad de obtener falsos positivos. Una de las desventajas de estudiar

interacciones por Far Western es que pueden ocurrir uniones inespecíficas. Para minimizar esta posibilidad, las membranas se lavan después de cada incubación con un amortiguador que contiene detergente y alta concentración de sal (como es el TTBS utilizado en este trabajo), lo cual permite eliminar falsos positivos. Estos lavados, sin embargo, pueden prevenir la formación e identificación de uniones más débiles entre proteínas; para poder observar este tipo de uniones, Sato y colaboradores modificaron el método convencional de Far Western promoviendo la unión de las proteínas (la que está en solución con las que están en la membrana) utilizando agentes entrecruzadores, lo cual permite observar tanto uniones débiles como uniones fuertes (Sato *et al.*, 2011).

Para los fines perseguidos con este trabajo, la técnica de estudio de interacciones por inmunorréplica de tipo Far Western fue muy útil debido a que es un sistema eficiente para trabajar con proteínas insolubles. En estos experimentos las proteínas de interés fueron incubadas en un amortiguador diseñado específicamente atendiendo a las particularidades de cada una, en especial el pH. Asimismo, ambas proteínas fueron incubadas en presencia de detergente y glicerol para evitar su agregación. Esta es una manera de asegurar que las proteínas mantengan su estructura secundaria y así sea posible su interacción con las proteínas en la membrana. Por su parte se considera que las proteínas en la membrana se han replegado, al menos parcialmente, debido a que durante las incubaciones se elimina el detergente de la electroforesis desnaturizante. Siempre y cuando el dominio principal de interacción se haya replegado es posible que ambas proteínas interactúen. Igualmente, también es posible que queden expuestos dominios que no deberían interactuar.

La interacción ASA1-OSCP identificada en este trabajo indica que en la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. existe la interacción de una proteína clásica, como es OSCP que está presente en las enzimas de otros organismos, y una proteína atípica propia de las algas, como es ASA1. En cuanto a las asociaciones de OSCP con el resto de las subunidades de la ATP sintasa, se ha demostrado que interactúa con la subunidad *b* del brazo periférico (McLachlin *et al.*, 1998), de la cual no existe homólogo

en la ATP sintasa de *Polytomella* sp; sin embargo, en este trabajo encontramos que algunos de los residuos involucrados en la interacción de b con OSCP en la enzima de bovino están presentes en la subunidad ASA1 de *Polytomella* sp., lo cual sugiere la posibilidad de que la última sea una subunidad b. La subunidad b de *E. coli*, la cual forma un dímero que se asocia a través de una hélice entrecruzada (Del Rizzo *et al.*, 2002) interacciona con la subunidad δ (homólogo de OSCP en bacterias) a través de su extremo carboxilo terminal (McLachlin *et al.*, 1998). Se sabe también que cada subunidad b tiene una hélice transmembranal que interacciona con el sector F_O (Dmitriev *et al.*, 1999).

Por otra parte, en la ATP sintasa de corazón de bovino OSCP interacciona con la subunidad α del núcleo catalítico (Carbajo *et al.*, 2005, Rees *et al.*, 2009) y existe evidencia de esta interacción en *Polytomella* sp. (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006, Villavicencio-Queijeiro *et al.*, 2009, Cano-Estrada *et al.*, 2010). La interacción α -OSCP se da por la unión de superficies hidrofóbicas de las hélices 1 y 5 del extremo amino terminal de OSCP con cadenas laterales hidrofóbicas de la subunidad α (Carbajo *et al.*, 2007). A la fecha, no hay más evidencias de contactos entre el extremo amino terminal de OSCP y otras subunidades de la ATP sintasa, y se ha propuesto que en *E. coli* el único contacto con α es suficiente para resistir el movimiento generado por el mecanismo rotatorio; sin embargo, se desconoce si sucede lo mismo en la enzima mitocondrial (Walker y Dickson 2006).

En este trabajo presentamos evidencia de otro contacto de la subunidad OSCP en la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp., ya que además de observar su interacción con α (dada muy probablemente a través de su dominio amino terminal), observamos su interacción con ASA1, mediada por su extremo carboxilo terminal. Siendo así, ASA1 podría funcionar como equivalente de la subunidad b clásica, ya sea sola o en conjunto con otras subunidades ASA. Esta idea está apoyada por datos anteriores (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006), ya que en el subcomplejo generado al disociar la enzima con calor se encontró la subunidad ASA1 en asociación con subunidades membranales, lo cual indica la posible presencia de un dominio membranal, como el que tiene la

subunidad *b* de *E. coli* (Dunn *et al.*, 2000). De ser así, ASA1 tendría contacto con subunidades membranales y con subunidades del sector F_1 , las mismas interacciones que tiene la subunidad *b* en la ATP sintasa de bacterias; sin embargo aún se tienen que confirmar o descartar estas interacciones.

Otra interacción observada a través de las inmunorrélicas tipo Far Western realizadas en este trabajo fue ASA1- γ . En este sentido, la estructura cristalográfica de la F_1 -ATP sintasa reveló que el rotor central ($\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}$) se extiende desde la región de la membrana hasta el núcleo catalítico, y que éste es atravesado por una hélice de la región carboxilo terminal de la subunidad γ , dejando esa parte de la proteína expuesta en el ápice de la enzima (Abrahams 1994). Siendo así, hay dos posibles interpretaciones de la interacción ASA1- γ observada: la primera es que ASA1 al ser una proteína tan grande tiene la dimensión suficiente para extenderse a lo largo del brazo periférico hasta la parte más alta de la enzima y así alcanzar a asociarse con OSCP y con la parte de la subunidad γ que está expuesta; la segunda es que su interacción con γ no sea en el ápice de la enzima sino con la parte que forma el rotor. Esta interacción, sea cual fuere, tiene que ser estudiada con mayor profundidad. La interacción observada de OSCP con la subunidad γ en los experimentos de Far Western bidimensionales sugiere que la primera hipótesis es la más probable.

El brazo periférico es una estructura común en las ATP sintasas rotatorias, ya que también se encuentra en las ATP sintasas vacuolares (V-ATP sintasas) y en las A_1A_0 -ATPasas de arqueas (A-ATP sintasas) (Miranda-Astudillo 2012); es de las partes menos estudiadas de la enzima y las subunidades que lo componen están poco conservadas (Cano-Estrada *et al.*, 2010). El brazo periférico mantiene unidos el sector F_1 , el rotor central y las subunidades *a* y *c* del sector F_0 . Su principal papel es funcionar como el estator de la enzima y contrarrestar la tendencia de rotación del núcleo catalítico $\alpha_3\beta_3$ en respuesta al movimiento del rotor y del anillo de subunidades *c*.

La base del brazo periférico está asociada con el anillo de subunidades *c*, cuya rotación está impulsada por el paso de protones hacia la matriz mitocondrial; cada giro completo

del rotor genera 3 moléculas de ATP y, según modelos hechos con la enzima de levadura (Stock *et al.*, 1999), cada uno requiere la traslocación de diez protones. Se ha propuesto que esta diferencia entre lo que entra al anillo (un protón por subunidad c) y lo que sale del sector F_1 (tres moléculas de ATP) requiere que durante el movimiento del rotor se almacene energía temporalmente, probablemente en un elemento elástico, que se vaya liberando en dosis para impulsar cada giro de 120° del rotor (Walker y Dickson 2006).

Se han propuesto dos candidatos que podrían encargarse de almacenar energía: la región de hélice alfa de la subunidad γ (Ma *et al.*, 2002) y el brazo periférico (Cherepanov *et al.*, 1999, Wächter *et al.*, 2011); sin embargo la hipótesis de que γ sea responsable aún no se ha confirmado experimentalmente. La idea de que el brazo periférico es una estructura flexible capaz de almacenar energía se basa en experimentos en los que se han añadido o eliminado residuos de la subunidad b y ésta se mantiene funcional, observación que se ha interpretado como señal de flexibilidad (Sorgen *et al.*, 1999). Estos experimentos, sin embargo, no ofrecen información sobre la estructura o función del brazo periférico en la enzima sin cambios en la subunidad b .

La mayoría de los datos que se tienen respecto a la estructura y función del brazo periférico se ha obtenido de estudios con la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino o de *E. coli*. En las algas clorofíceas, como ya se mencionó, el brazo periférico está formado por otras subunidades, no homólogas a las clásicas, y que por lo tanto no necesariamente conservan las características que típicamente le darían al brazo la capacidad de funcionar como almacén de energía.

En *Polytomella* sp. se ha propuesto que el brazo periférico está formado por las subunidades ASA2, ASA4 y ASA7, y que la interacción entre ellas está dada por contactos hélice-hélice (Miranda-Astudillo *et al.*, 2014), como es el caso de las proteínas que forman los brazos en la enzima de bacterias, levaduras, mamíferos y arqueas (Miranda-Astudillo y González-Halphen 2012).

Con un análisis *in silico* de predicción de hélices entrecruzadas (*coiled coils*) se encontró que estas tres subunidades tienen tendencia a formar este tipo de estructura. La subunidad ASA1 tiene un alto porcentaje (30%) de tendencia a la formación de hélices entrecruzadas y se ha visto asociada con ASA7 (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006, Cano-Estrada *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que ASA1 también forma parte de la estructura del brazo periférico.

El brazo periférico de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. es entonces una estructura más robusta y prominente que aquella de las enzimas de otros organismos (ASA1/ASA2/ASA4/ASA7 suman aproximadamente 156 kDa), lo cual hace pensar en una estructura menos flexible que, aunque es lo suficientemente rígida para contrarrestar el movimiento del rotor, no tendría la misma capacidad de movimiento que tienen otros brazos para poder almacenar energía elástica (Miranda-Astudillo *et al.*, 2014).

Juntando los datos disponibles sobre la estructura y función del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial con los datos obtenidos en este trabajo, podemos proponer que la subunidad ASA1 es un componente importante del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. que se extiende desde una región cercana a la membrana interna mitocondrial hasta el ápice de la enzima, donde interacciona con la subunidad OSCP, probablemente de manera semejante a la interacción que existe con la subunidad *b* en la enzima de otros organismos. Esta interacción, junto con las que se han propuesto anteriormente, apoya la idea de un brazo periférico muy rígido y poco flexible en la ATP sintasa de las algas clorofíceas. Las consecuencias fisiológicas de esta posible rigidez quedan por ser exploradas.

10. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indican una interacción entre la subunidad ASA1 y la subunidad OSCP de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. que está mediada por el extremo carboxilo terminal de la segunda. Esta interacción sugiere la vecindad topológica entre una proteína clásica de la enzima (OSCP) con una subunidad atípica (ASA1) que sólo se encuentra en el brazo periférico de las ATP sintasas de algas pertenecientes al linaje de las algas clorofíceas.

11. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas de este trabajo está confirmar o descartar la interacción ASA1- γ observada en las inmunorrélicas tipo Far Western e investigar más a fondo las implicaciones que tendría esta interacción de resultar cierta. De igual manera, confirmar o descartar la interacción observada con la subunidad β . Sería conveniente también obtener a la subunidad ASA1 sin etiqueta de histidinas para así poder llevar a cabo la copurificación ASA1-OSCP complementaria a la realizada en este trabajo.

Una aproximación más detallada al estudio de las interacciones de la subunidad ASA1 se podría llevar a cabo fragmentando a las proteínas recombinantes en sus extremos amino y carboxilo. De esta forma será posible identificar cuál es la parte de la proteína involucrada en cada interacción.

Por otro lado, realizar la copurificación de la subunidad ASA1 en complejo con otras subunidades ASA, particularmente con ASA2, ASA4 y ASA7, implicaría reconstituir una sección importante del brazo periférico de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. con proteínas recombinantes, lo cual sería una contribución importante al estudio de la estructura de este sector de la enzima.

12. REFERENCIAS

12.1 Referencias bibliográficas

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: 621-628.

Alfonzo M., Kandrach M. A., Racker E. (1981) Isolation, Characterization, and Reconstitution of a Solubilized Fraction Containing the Hydrophobic Sector of the Mitochondrial Proton Pump. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 13: 375-391.

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

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

Brand M. D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical Society Transactions* 33: 897-904.

Brunner S., Everard-Gigot V., Stuart R. A. (2002) Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase forms homodimers. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 48484-9.

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

Cano-Estrada A., González-Halphen D. (2011) F₁F_o-ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *Revista de Educación Bioquímica* 30: 98-108.

Carbajo J. R., Kellas A. F., Runswick J. M., Montgomery G. M., Walker E. J., Neuhaus D. (2005) Structure of the F₁-binding domain of the stator of bovine F₁F_o-ATPase and how it binds an alpha-subunit. *Journal of Molecular Biology* 351: 824-838

Carbajo J. R., Kellas A. F., Yang J., Runswick J. M., Montgomery G. M., Walker E. J., Neuhaus D. (2007) How the N-terminal Domain of the OSCP Subunit of Bovine F₁F_o-ATP Synthase Interacts with the N-terminal Region of an Alpha Subunit. *Journal of Molecular Biology* 368: 310-318.

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

Conner T. W., Thompson M. D., Silflow C. D. (1989) Structure of the three beta-tubulin-encoding genes of the unicellular alga, *Polytomella agilis*. *Gene* 84: 345-348.

Couh-Cardel S., Uribe-Carvajal S., Wilkens S. García-Trejo J. J. (2010) Structure of Dimeric F₁F₀-ATP Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 36447-36455.

Del Rizzo P. A., Bi Y., Dunn S. D., Shilton B. H. (2002) The "second stalk" of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry* 41:6875-6884.

Dmitriev O., Jones P. C., Jiang W., Fillingame R. H. (1999) Structure of the membrane domain of subunit b of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 15598-15604.

Domínguez-Ramírez L., Tuena de Gómez-Puyou M. (2005) La F₁F₀ ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8: 18-27.

Dudkina N. V., Heinemeyer J., Keegsta 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. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 579: 5769-5772.

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 Letters* 580: 3427-3432.

Dunn S. D., Revington M., Cipriano D. J., Shilton B. H. (2000) The b Subunit of *Escherichia coli* ATP Synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32: 347-355.

Dutcher S. K., Huang B., Luck D. J. (1984) Genetic dissection of the central pair microtubules of the flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology* 98: 229-236.

Ernster L. y Schatz G. (1981) Mitochondria: a historical review. *Journal of Cell Biology* 91: 227-255.

Fields S. y Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein. *Nature* 340: 245-246.

Fronzes R., Wiemann 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: 6715-6723.

Glendhill J. R. y Walker J. E. (2005) Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal* 386: 591-598.

Gordon, G.W., Berry, G., Liang, X.H., Levine, B. & Herman, B. (1998) Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* 74: 2702-2713.

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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 99-105.

Haines T. y Dencher N. (2002) Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Letters* 528: 35-39.

Hall A. (2004) Studying Protein–Protein Interactions via Blot Overlay or Far Western Blot. *Methods in Molecular Biology* 261: Protein–Protein Interactions: Methods and Protocols.

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

Kaelin W. G. Jr, Krek W., Sellers W. R., DeCaprio J. A., Ajchenbaum F., Fuchs C. S., Chittenden T., Li Y., Farnham P. J., Blonar M. A. Livingston D. M., Flemington E. K. (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 70: 351-364.

Koolman J. y Röhm K. H. (2004) *Bioquímica Texto y Atlas*. 3ª Edición. Editorial Médica-Panamericana, Alemania. pp. 121-151, 210-215.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Ma J., Flynn T. C. Cui Q., Leslie A. G., Walker J. E., Karplus M. (2002) A dynamic analysis of the rotation mechanism for conformational change in F(1)-ATPase. *Structure* 10: 921-931.

Mannella A. (2006) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 542-548.

Mattox K.R., y Stewart K. D. (1984) Classification of the green algae. En: Systematics of the green algae (Editores: Irvine DEG y John DM. Academic Press, Londres, pp 29-72.

McLachlin D. T., Bestard J. A., Dunn S. D. (1998) The b and delta subunits of the Escherichia coli ATP synthase interact via residues in their C-terminal regions. *The Journal of Biological Chemistry* 273:15162-8.

Melkonian M. y Surek B. (1995) Phylogeny of the Chlorophyta-congruence between ultrastructural and molecular evidence. *Bulletin de la Societe Zoologique de Franc-Evolution et Zoologie*. 120: 191–208.

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

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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837: 1-13.

Pfleger K.D., Seeber R.M., Eidne K.A. (2006) Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nature Protocols* 1: 337-345.

Pringsheim E. G. (1955) The genus *Polytomella*. *Journal of Protozoology* 2: 137-145.

Pröschold T., Marin B., Schlosser U.G., Melkonian M. (2001) Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta): I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist* 152: 265-300.

Rees D. M., Leslie A. G., Walker J. E. (2009) The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21597-21601.

Rochaix J. G. (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual Review of Genetics* 29: 209-230.

Rodríguez-Salinas E., Remacle C., González-Halphen D. (2012) Chapter Eight – Green Algae Genomics: A Mitochondrial Perspective. En: *Advances in Botanical Research* 63: 187-214.

Round F. E. (1980) The evolution of pigmented and unpigmented unicells—a reconsideration of the protista. *Biosystems* 12: 61-69.

Schägger H. y von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379.

Schägger H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1555: 154-159.

Sato Y., Kameya M., Arai H., Ishii M., Igarashi Y. (2011) Detecting weak protein-protein interactions by modified far-western blotting. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112: 304-307.

Sorgen P. L., Bubb M. R., Cain B. D. (1999) Lengthening the second stalk of F(1)F(0) ATP synthase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 36261-6.

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

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 Physiology* 132: 318-330.

van Lis R., Mendoza-Hernández G., Groth G., Atteia A. (2007) New Insights into the Unique Structure of the F1FO-ATP Synthase from the Chlamydomonad Algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 144: 1190-1199.

Vázquez-Acevedo M., Cardol P., Cano-Estrada A., Lapaille M., Remacle C., González-Halphen D. (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 38: 271-282.

Villavicencio-Queijeiro A., Vázquez-Acevedo M., Cano-Estrada A., Zarco-Zavala M., Tuena de Gómez M., Mignaco J. A., Freire M. M., Scofano M. H., Foguel D., Cardol P., Remacle C.,

González-Halphen D. (2009) The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41: 1-13.

Wächter A., Bi Y., Dunn S. D., Cain B. D., Sielaf H., Wintermann F., Engelbrecht S., Junge W. (2011) Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 108: 3924-3929.

Walker J. E., Runswick M. J., Saraste M. (1982) Subunit equivalence in *Escherichia coli* and bovine heart mitochondrial F₁F₀ ATPases. *FEBS Letters* 146: 393-396.

Walker J. E. y Dickson V. (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 286-296.

Wang B., Pelletier J., Massaad M.J., Herscovics A., Shore G.C. (2004) The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Molecular and Cellular Biology* 24: 2767-2778.

Weber J. y Senior A. E. (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase. *FEBS Letters* 545: 61-70.

Weber J. (2006) ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757:1162-1170.

Wu Y., Li Q., Chen X-Z. (2007) Detecting protein-protein interactions by far western blotting. *Nature Protocols* 2: 3278-3283.

Yoshida M., Muneyuki E., Hisabori T. (2001) ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2: 669-677

12.2 Referencias electrónicas

<http://starcentral.mbl.edu/microscope/portal.php?pagetitle=assetfactsheet&imageid=673>

http://rydberg.biology.colostate.edu/Phytoremediation/2003/Boczon/Biological_Activity.html

<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/f1fo.htm>

ANEXO 1: Soluciones y amortiguadores utilizados

ANEXO 13.1. Amortiguadores y soluciones utilizados

Amortiguadores para la purificación de ASA1

Amortiguador para el rompimiento celular

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Triton X-100	1%

Amortiguador de lavado de Cl

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Triton X-100	5%

pH 7.8

Amortiguador de solubilización (A)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Urea	8 M

pH 7.8

Amortiguador de replegado (B)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Urea	0.5 M
Glicerol	2%
Tween 20	0.5%

pH 7.8

Amortiguador de elución (C)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Urea	0.5 M
Glicerol	2%
Tween 20	0.5%
Imidazol	500 mM

pH 7.8

Amortiguadores para la purificación de OSCP

Amortiguadores de rompimiento, de lavado de CI y de solubilización de CI son los mismos que para ASA1.

Amortiguador de diálisis

MES	20 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	2%
Tween 20	0.05%

pH 6

Amortiguador de elución

MES	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Glicerol	2%
Tween 20	0.05%
NaCl	1 M

pH 6

Soluciones y amortiguadores para Western Blot y Far Western Blot

Amortiguador de transferencia

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1%
Metanol	20%

pH 8.3

TBS

Tris	20 mM
NaCl	0.5 M

pH 7.5

TTBS

Tris	20 mM
NaCl	0.5 M
Tween 20	0.05%

pH 7.5

Solución de tinción Ponceau

Rojo de Ponceau al 0.1% en 5% de ácido acético

Amortiguador de incubación de ASA1

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Urea	0.5 M
Glicerol	2%
Tween 20	0.5%

pH 7.8

Amortiguador de incubación de OSCP

MES	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Glicerol	2%
Tween 20	0.05%

pH 6

Solución reveladora

NaHCO ₃	0.1 M
MgCl ₂	1 mM

pH 9.8

Al momento:

NBT	1 mL/100 mL
BCIP	1 mL/100 mL

Solución NBT 15 mM

60 mg en 2.8 mL de Dimetilformamida y 1.2 mL de agua destilada

Solución BCIP 15 mM

30 mg en 4 mL de agua destilada

Amortiguadores para la copurificación ASA1_{6H}-OSCP

Amortiguador de diálisis

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Glicerol	2%
Tween 20	0.05%

pH 8

Amortiguador para lavados

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Glicerol	2%
Tween 20	0.05%
Imidazol	30 mM

pH 8

Amortiguador para elución

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Glicerol	2%
Tween 20	0.05%
Imidazol	500 mM

pH 8

Soluciones y amortiguadores para geles Tricina SDS-PAGE

	Gel separador		Gel concentrador
	12%	14%	3%
Acrilamida 30% Bis-acrilamida 0.98%	3 mL	3.5 mL	400 µL
Amortiguador electroforético	3.5 mL	3 mL	750 µL
Glicerol 79.5%	1 mL	1 mL	-
Agua destilada	-	-	1.85 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL	50 µL	20 µL
TEMED	5 µL	5 µL	3 µL

Solución madre de acrilamida

Acrilamida	30%
Bis-acrilamida	0.98%

Amortiguador electroforético

Tris 3 M
HCl 1 N
SDS 0.3%

Amortiguador ánodo

Tris 0.2 M

pH 8

Amortiguador cátodo

Tris 0.1 M
Tricina 0.1 M
SDS 0.1%

Soluciones y amortiguadores para geles Glicina SDS-PAGE

	Gel separador
	12%
Acrilamida 30% Bis-acrilamida 0.8%	3.95 mL
Tris 0.375 M pH 8.8	2 mL
SDS 10%	100 µL
Agua destilada	4 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL
TEMED	5 µL
	Gel concentrador
	3%
Acrilamida 30% Bis-acrilamida 0.8%	990 µL
Tris 0.125 M pH 6.8	90 µL
SDS 10%	30 µL
Agua destilada	1.9 mL
Persulfato de amonio 10%	20 µL
TEMED	3 µL

Solución madre de acrilamida

Acrilamida 30%
Bis-acrilamida 0.8%

Amortiguador ánodo y cátodo

Glicina 0.192 M
Tris 0.025 M
SDS 0.1%

pH 8.3

Solución de tinción con azul de Coomassie

Etanol	50%
Ácido acético	10%
Coomassie Blue G	0.1%

Solución desteñidora

Ácido acético al 10% en agua

Solución desnaturalizante de carga

SDS	10%
Glicerol	30%
Tris	100 mM
Coomassie Blue G	0.3%
Beta mercaptoetanol	4%

ANEXO 2: Artículo publicado



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



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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2013

Received in revised form 24 July 2013

Accepted 2 August 2013

Available online 9 August 2013

Keywords:

F₁F₀-ATP synthase peripheral-stalk

Dimeric mitochondrial complex V

Chlorophycean algae

Chlamydomonas reinhardtii

Polytomella sp.

Asa subunits

ABSTRACT

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase of chlorophycean algae is a complex partially embedded in the inner mitochondrial membrane that is isolated as a highly stable dimer of 1600 kDa. It comprises 17 polypeptides, nine of which (subunits Asa1 to 9) are not present in classical mitochondrial ATP synthases and appear to be exclusive of the chlorophycean lineage. In particular, subunits Asa2, Asa4 and Asa7 seem to constitute a section of the peripheral stalk of the enzyme. Here, we over-expressed and purified subunits Asa2, Asa4 and Asa7 and the corresponding amino-terminal and carboxy-terminal halves of Asa4 and Asa7 in order to explore their interactions in vitro, using immunochemical techniques, blue native electrophoresis and affinity chromatography. Asa4 and Asa7 interact strongly, mainly through their carboxy-terminal halves. Asa2 interacts with both Asa7 and Asa4, and also with subunit α in the F₁ sector. The three Asa proteins form an Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. The entire Asa7 and the carboxy-terminal half of Asa4 seem to be instrumental in the interaction with Asa2. Based on these results and on computer-generated structural models of the three subunits, we propose a model for the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex and for its disposition in the peripheral stalk of the algal ATP synthase.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase (complex V) is the main ATP producing enzyme in non-photosynthetic eukaryotes. The complex works as a rotary motor driven by an electrochemical proton gradient [1,2]. Proton translocation through the F₀ sector drives rotation of the central stalk (the gamma subunit) that extends from the membrane-embedded c-ring into the center of the F₁ sector. The conformational changes induced by the gamma subunit in F₁ allow the synthesis of ATP in the catalytic sites of the beta subunits [3]. Chlorophycean algae like *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp. exhibit a highly stable, dimeric mitochondrial F₁F₀-ATP synthase with an apparent molecular mass of 1600 kDa [4]. This dimeric complex also has a unique overall architecture exhibiting two stout peripheral stalks as judged by electron microscopy analyses [5–8]. The functional core of the algal enzyme is formed

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

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

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

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

¹ These authors contributed equally to this work.

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

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

2. Materials and methods

2.1. Algal strains and growth conditions

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

2.2. *Polytomella* mitochondrial ATP synthase purification

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

2.3. Protein analysis

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

2.4. Dissociation of the ATP synthase into subcomplexes

The purified algal ATP synthase (120 µg of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of 0.04% lithium dodecyl sulfate (LDS) and the resulting sample subjected to BN-PAGE in 4–12% gradient acrylamide gels. The lane of interest was excised and incubated in the presence of 1% SDS and 1% β-mercaptoethanol for 15 min and then subjected to 2D Tricine-SDS-PAGE in 14% acrylamide gels.

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

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

2.6. Overexpression of recombinant proteins

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

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

2.7. Isolation of inclusion bodies

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

2.8. Purification of recombinant proteins

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

2.9. Antibody production and immunoblotting

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

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

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

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

2.11. Protein–protein interactions assayed by affinity chromatography

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

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

2.12. Protein–protein interactions assayed by Blue Native Electrophoresis

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

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

2.13. Protein stability at different pHs

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

2.14. Formation of an Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex

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

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

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

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

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

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

2.16. Protein structure prediction and protein–protein docking

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

3. Results

3.1. Over-expression and purification of recombinant Asa subunits

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

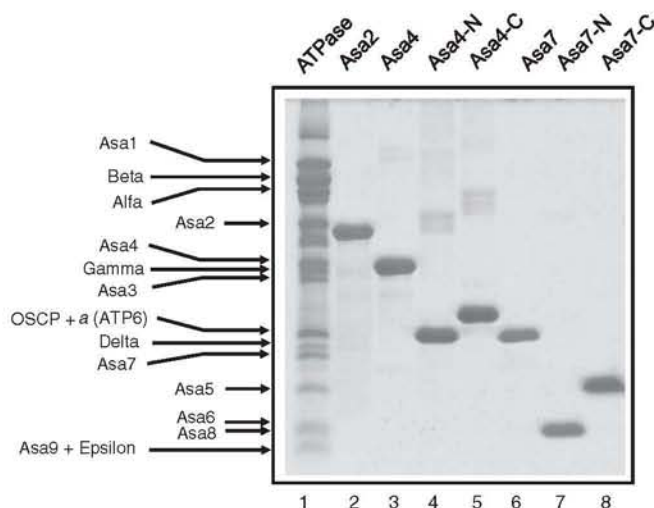


Fig. 1. *Polytomella* ATP synthase and the recombinant Asa subunits used in this work. Tricine-SDS polyacrylamide gel showing the polypeptide pattern of the *Polytomella* ATP synthase complex (25 µg of protein, lane 1). The identity of its 16 subunits is indicated. Three micrograms of each recombinant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

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

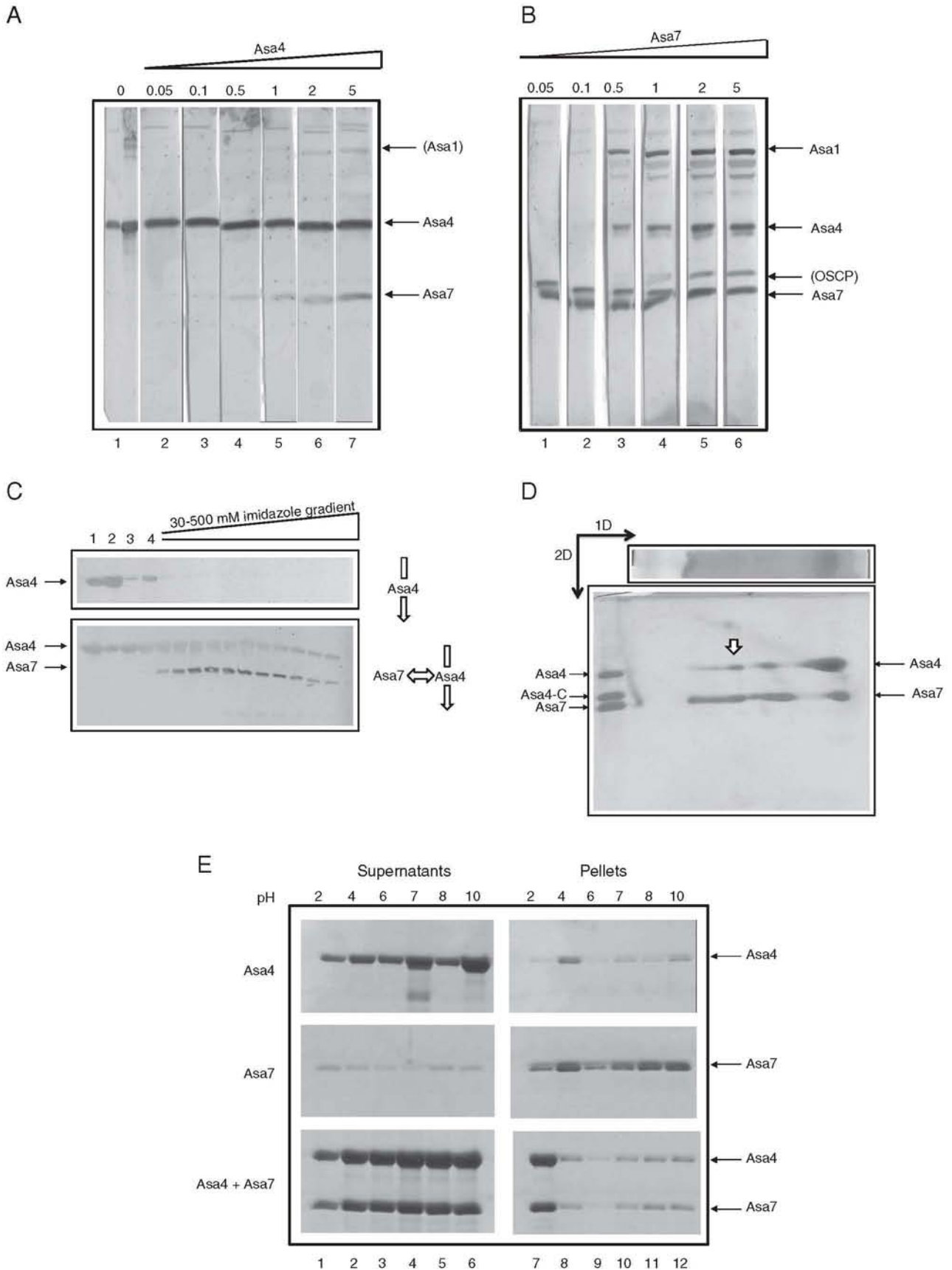
3.2. On the interaction of Asa4 and Asa7

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

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

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

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



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

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

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

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

3.3. On the interaction of Asa4 fragments and Asa7

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

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

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

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

3.4. On the interaction of Asa7 fragments and Asa4

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

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

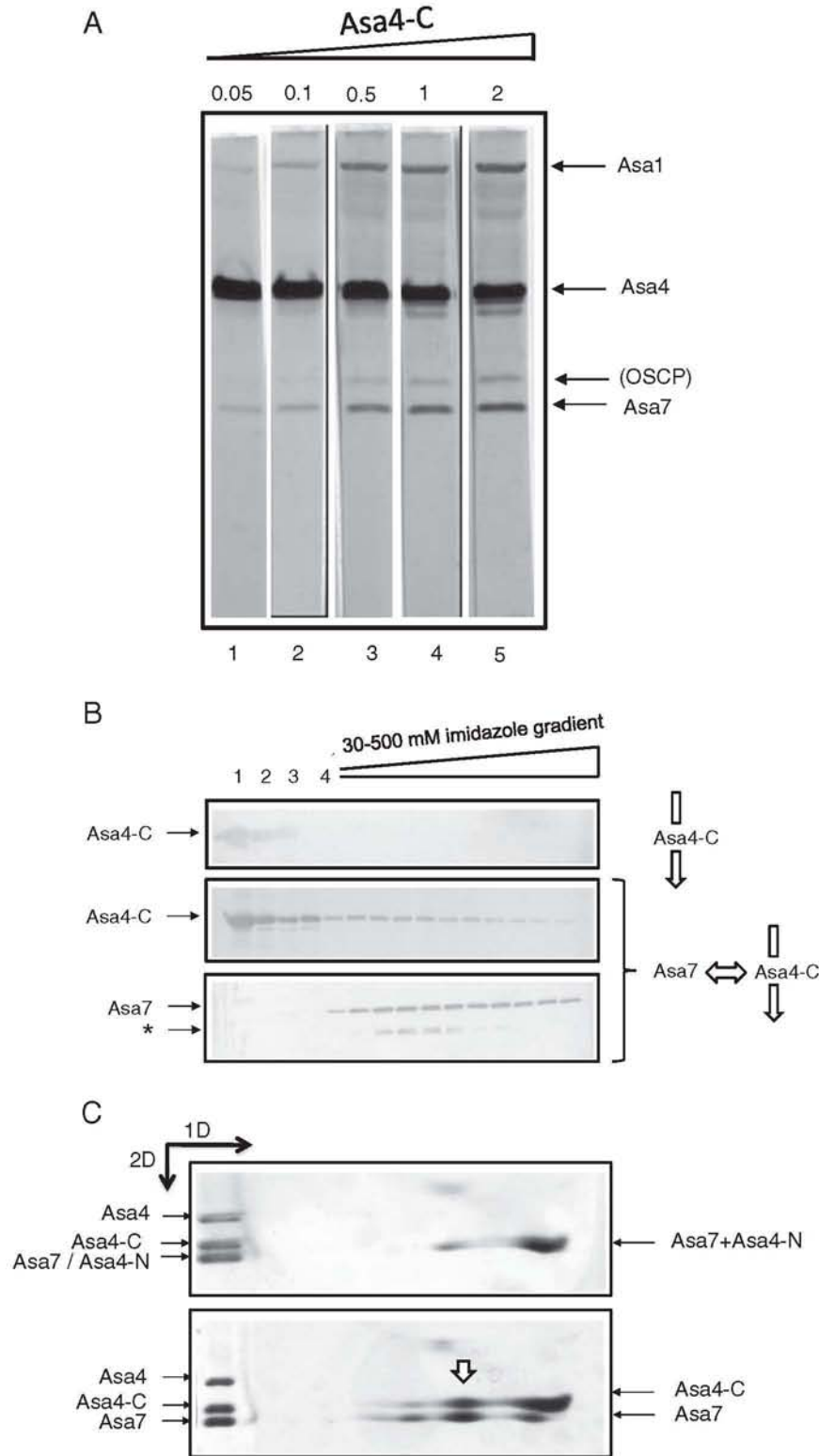


Fig. 3. Interaction of Asa4 fragments with Asa7. A) Far-Western analysis of *Polytomella* ATP synthase (25 µg of protein per lane) incubated for 4 h with increasing nanomoles of the isolated, recombinant Asa4-C fragment as indicated (in a 5 mL final volume), and then decorated with an anti-Asa4 antibody.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

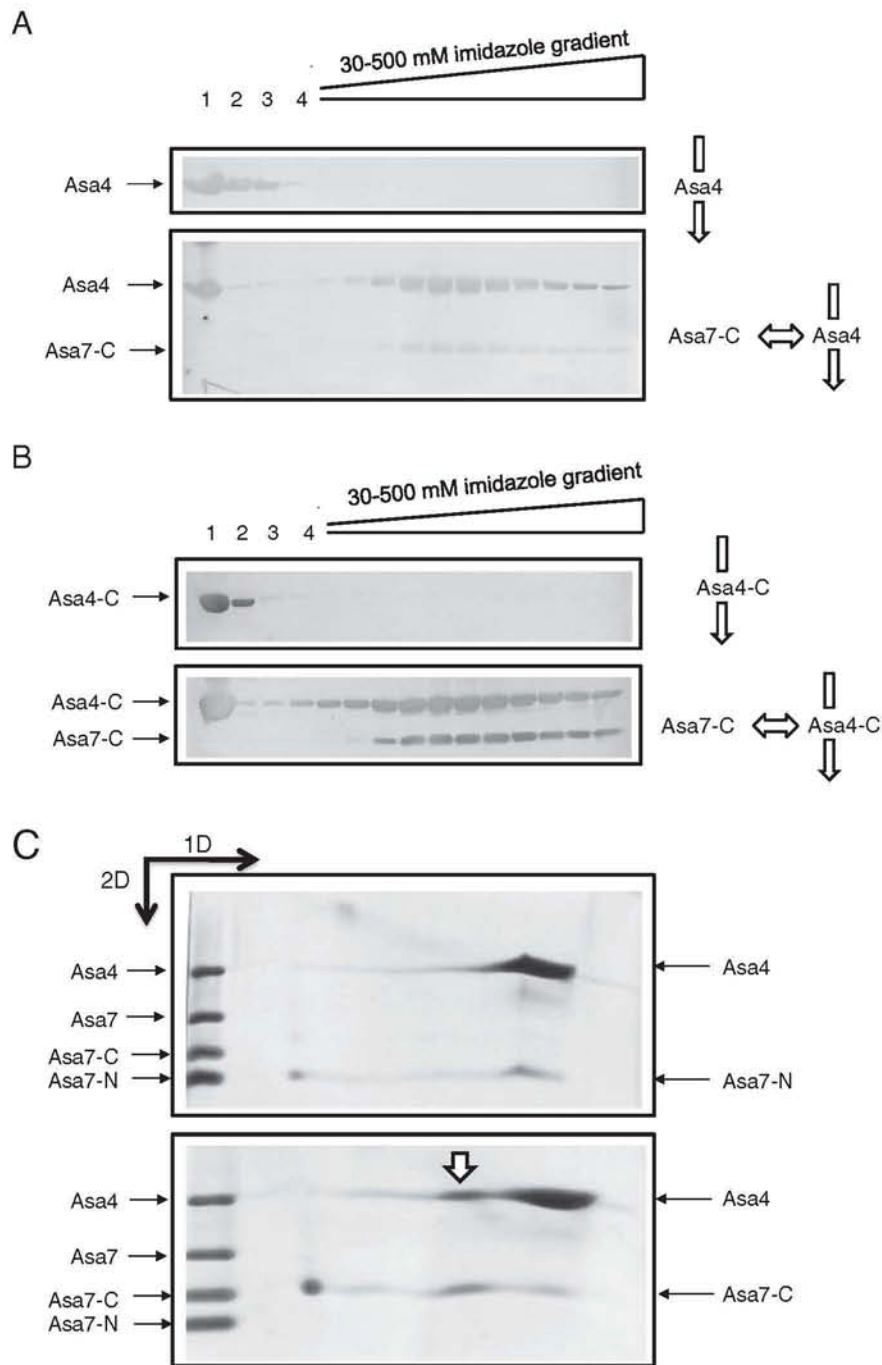


Fig. 4. Interaction of Asa4 with Asa7 fragments. A, B) Interaction of Asa4 and the Asa7 fragments assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa4 subunit (A) or Asa4-C fragment (B) was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to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

Altogether, the data strongly suggest that Asa7 and Asa4 interact through their C-terminal halves.

3.5. On the interaction of Asa2 and Asa4

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

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

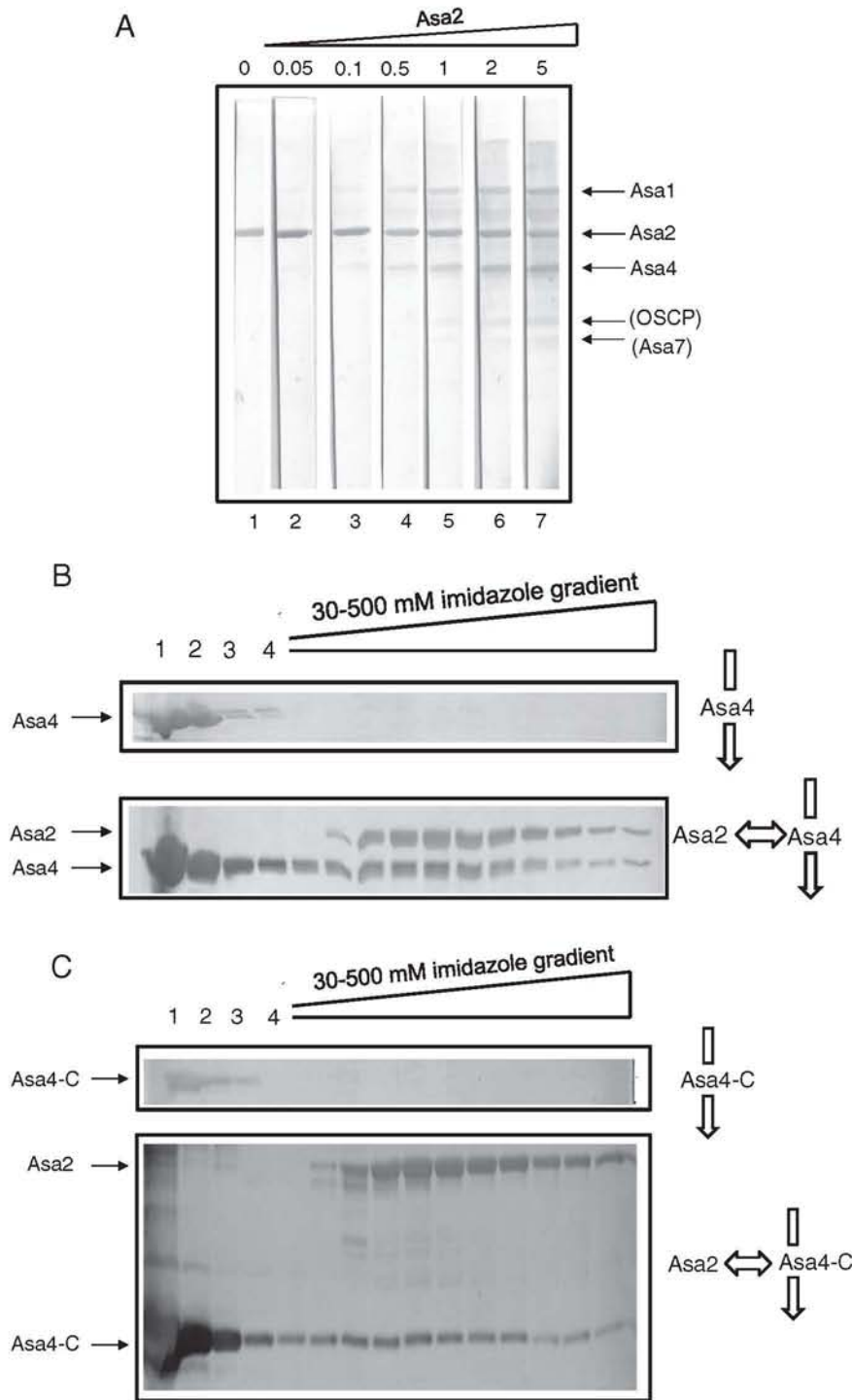


Fig. 5. Interaction of Asa2 with Asa4 and its Asa4-C fragment. A) Far-Western analysis of *Polytomella* ATP synthase (25 µg of protein per lane) incubated for 4 h with increasing nanomoles of the isolated, recombinant Asa2 protein as indicated (in a 5 mL final volume), and then decorated with an anti-Asa2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

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

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

3.6. On the interaction of Asa2 and Asa7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Discussion

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

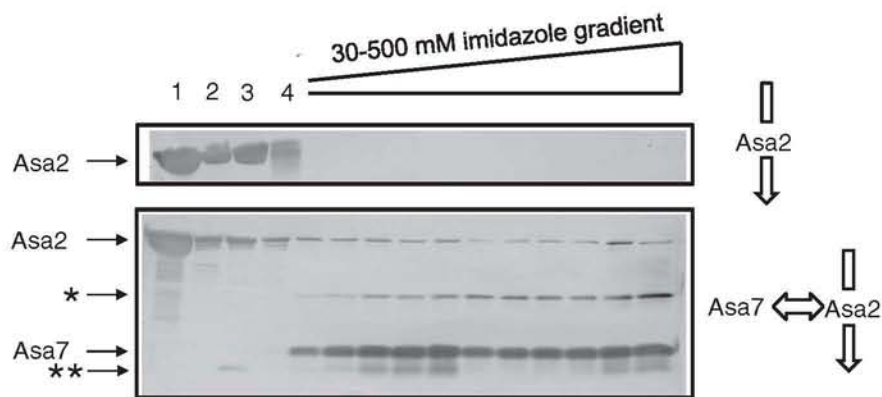


Fig. 6. The interaction of Asa2 with Asa7. A) Interaction of Asa2 and Asa7 assayed by affinity chromatography. The crude extract containing the recombinant Asa2 subunit was loaded on a 1 mL HisTrap column containing no bound protein (upper panel) or to which Asa7, containing a 6His-tag, was bound (lower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

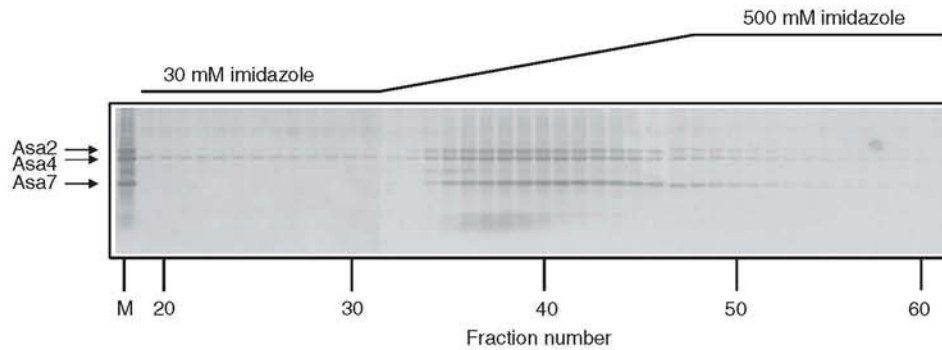


Fig. 7. Formation of an Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. The recombinant, isolated Asa2 (untagged), Asa4 (untagged) and Asa7 (6His-tagged) proteins form a stable subcomplex that can be recovered after affinity chromatography. The generated Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex elutes when a linear imidazole gradient (30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

interact with Asa1 and with OSCP, suggesting their participation as structural components of the peripheral stalk. Also, we show that Asa2 may interact with an α subunit, and thus must be in close proximity to the F_1 sector. In addition, a mixture of Asa2, Asa4 and Asa7 seems to form a subcomplex in a 1:1:1 stoichiometry.

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

RNA-mediated expression silencing of the Asa7 subunit in the green algae *C. reinhardtii*, a close relative of *Polytomella* sp., showed that the absence of this polypeptide neither affected growth nor the oxidative-phosphorylation properties of the alga [13]. Nevertheless, the intact, dimeric ATP synthase could not be purified from the Asa7-silenced mutant, because the complex invariably dissociated, releasing the F_1 sector. Therefore, Asa7 seems to be instrumental in stabilizing the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae. As suggested by the results obtained in this work, Asa7 interacts both with Asa2 and Asa4, and thus could be important in maintaining these subunits together, and thus helping stabilize the architecture of the peripheral stalk [7,10,11]. When heat dissociation of the intact ATP synthase of *Polytomella* sp. was followed in a time course, it was observed that several subunits, including Asa2, Asa4 and Asa7, readily

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

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

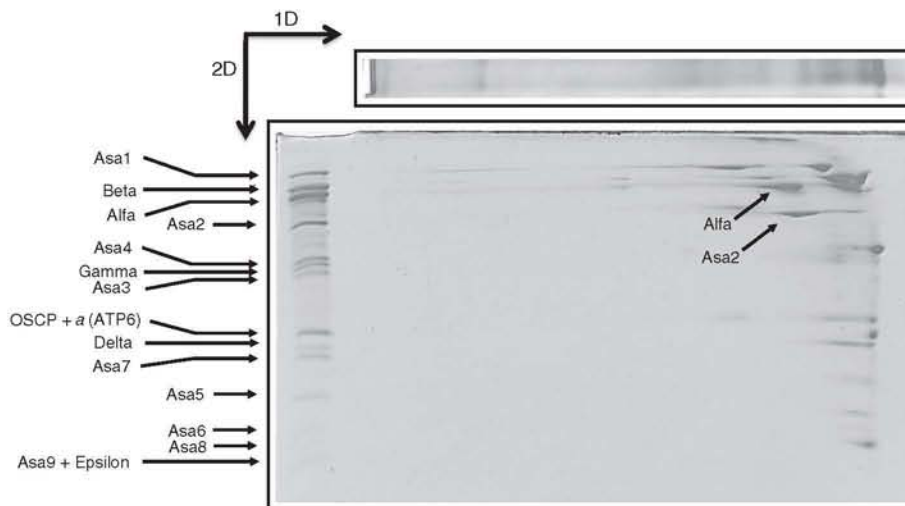


Fig. 8. An Asa2-alfa subunit subcomplex of the algal ATP synthase is generated by LiDS treatment. The purified algal ATP synthase (120 μ g of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of 0.04% LiDS and then resolved by BN-PAGE in a 1D gradient gel of 4–12% acrylamide. The 1D gel was then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

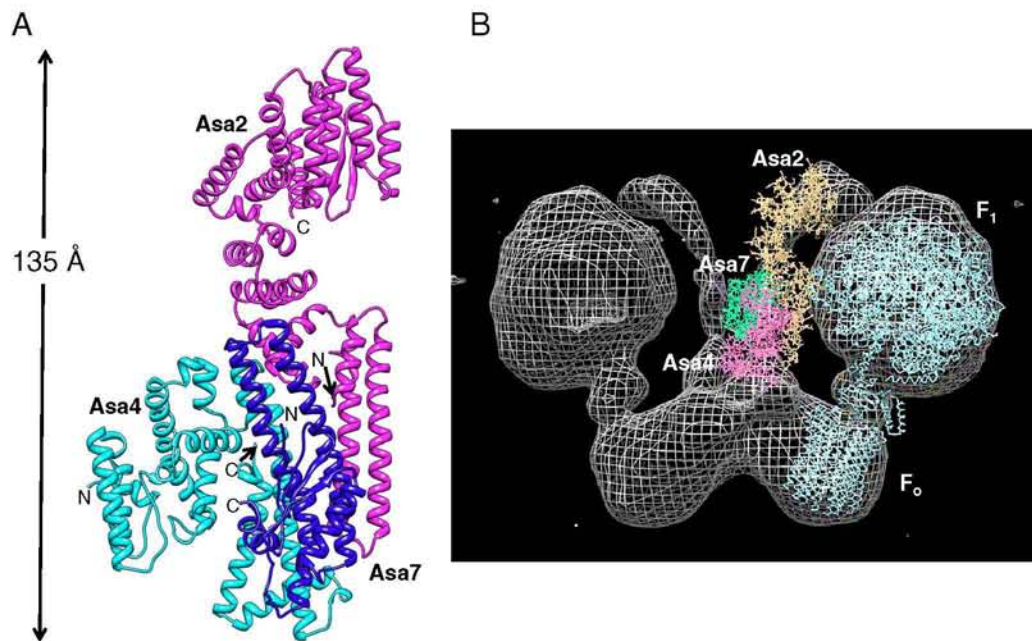


Fig. 9. Model of the Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. A) Model of the in silico generated Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex. Subunit Asa2 is colored in magenta, Asa4 in cyan, and Asa7 in blue. The N- and C-termini are indicated with letters N and C, respectively. B) The Asa2/Asa4/Asa7 subcomplex was fitted in the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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

References

- [1] R.J. Devenish, M. Prescott, A.J. Rodgers, The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267 (2008) 1–58.
- [2] H. Seelert, N.A. Dencher, ATP synthase superassemblies in animals and plants: two or more are better, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 1185–1197.
- [3] W. Junge, H. Sialaff, S. Engelbrecht, Torque generation and elastic power transmission in the rotary F₀F₁-ATPase, *Nature* 459 (2009) 364–370.
- [4] 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.
- [5] N.V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, H.P. Braun, Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5769–5772.

- [6] N.V. Dudkina, S. Sunderhaus, H.P. Braun, E.J. Boekema, Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3427–3432.
- [7] A. Cano-Estrada, M. Vázquez-Acevedo, A. Villavicencio-Queijeiro, F. Figueroa-Martínez, H. Miranda-Astudillo, Y. Cordeiro, J.A. Mignaco, D. Foguel, P. Cardol, M. Lapaille, C. Remacle, S. Wilkens, D. González-Halphen, Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1439–1448.
- [8] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohann, H.P. Braun, E.J. Boekema, Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 272–277.
- [9] A. Atteia, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the F₀F₁-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 275–284.
- [10] M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle, D. González-Halphen, The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex, *J. Bioenerg. Biomembr.* 38 (2006) 271–282.
- [11] R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Atteia, New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1190–1199.
- [12] A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vázquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gómez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scofano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 1–13.
- [13] M. Lapaille, A. Escobar-Ramírez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodríguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. Gonzalez-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F₀F₁-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 1630–1644.
- [14] S. Funes, E. Davidson, M.G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M.P. King, D. González-Halphen, The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F₁F₀-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6051–6058.
- [15] P. Cardol, D. González-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R.F. Matagne, C. Remacle, The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project, *Plant Physiol.* 137 (2005) 447–459.
- [16] E.B. Gutiérrez-Cirlos, A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, R. Coria, D. González-Halphen, A highly active ubiquinol-cytochrome c reductase (bc₁ complex) from the colorless alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas*. Characterization of the heme binding site of cytochrome c₁, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9147–9154.
- [17] X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of chlamydomonad algae, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30144–30152.
- [18] R. van Lis, D. González-Halphen, A. Atteia, Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp, *Biochim. Biophys. Acta* 1708 (2005) 23–34.
- [19] H. Schägger, Denaturing electrophoretic techniques, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 59–79.
- [20] H. Schägger, Native gel electrophoresis, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 81–104.
- [21] M.A.K. Markwell, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [22] R.R. Burgess, Refolding solubilized inclusion body proteins, *Methods Enzymol.* 463 (2009) 259–282.
- [23] H. Schägger, H. Aquila, G. Von Jagow, Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis, *Anal. Biochem.* 173 (1988) 201–205.
- [24] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 4350–4354.
- [25] D. González-Halphen, M.A. Lindorfer, R.A. Capaldi, Subunit arrangement in beef heart complex III, *Biochemistry* 27 (1988) 7021–7031.
- [26] R.A. Hall, Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot, *Methods Mol. Biol.* 261 (2004) 167–174.
- [27] S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, L. Kinch, W. Sheffler, B.H. Kim, R. Das, N.V. Grishin, D. Baker, Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta, *Proteins* 77 (Suppl. 9) (2009) 89–99.
- [28] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinforma.* 9 (2008) 40.
- [29] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [30] A. Tovchigrechko, I.A. Vakser, GRAMM-X public web server for protein-protein docking, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) W310–W314.
- [31] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127–134.
- [32] V.K. Dickson, J.A. Silvester, I.M. Fearnley, A.G. Leslie, J.E. Walker, On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase, *EMBO J.* 25 (2006) 2911–2918.
- [33] A. Poetsch, R.J. Berzborn, J. Heberle, T.A. Link, N.A. Dencher, H. Seelert, Biophysics and bioinformatics reveal structural differences of the two peripheral stalk subunits in chloroplast ATP synthase, *J. Biochem.* 141 (2007) 411–420.
- [34] A.K. Welch, C.J. Bostwick, B.D. Cain, Manipulations in the peripheral stalk of the *Saccharomyces cerevisiae* F₁F₀-ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 10155–10162.
- [35] Y. Bi, J.C. Watts, P.K. Bamford, L.K. Briere, S.D. Dunn, Probing the functional tolerance of the b subunit of *Escherichia coli* ATP synthase for sequence manipulation through a chimera approach, *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008) 583–591.
- [36] S.B. Claggett, M. O'Neil Plancher, S.D. Dunn, B.D. Cain, The b subunits in the peripheral stalk of F₁F₀ ATP synthase preferentially adopt an offset relationship, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 16531–16540.
- [37] R. Priya, G. Biukovic, S. Gayen, S. Vivekanandan, G. Grüber, Solution structure, determined by nuclear magnetic resonance, of the b30–82 domain of subunit b of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 7538–7544.
- [38] A.M. Balakrishna, C. Hunke, G. Grüber, The structure of subunit E of the *Pyrococcus horikoshii* OT3 A-ATP synthase gives insight into the elasticity of the peripheral stalk, *J. Mol. Biol.* 420 (2012) 155–163.
- [39] P. Fariselli, D. Molinari, R. Casadio, A. Krogh, Prediction of structurally-determined coiled-coil domains with hidden Markov models, *Lect. Notes Comput. Sci.* 4414 (2007) 292–302.
- [40] J.E. Walker, V.K. Dickson, The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 286–296.
- [41] D.T. McLachlin, S.D. Dunn, Disulfide linkage of the b and delta subunits does not affect the function of the *Escherichia coli* ATP synthase, *Biochemistry* 39 (2000) 3486–3490.
- [42] J. Vonck, K.Y. Pisa, N. Morgner, B. Brutschy, V. Müller, Three-dimensional structure of A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 10110–10119.
- [43] D.M. Rees, A.G. Leslie, J.E. Walker, The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 21597–21601.
- [44] N.P. Balabaskaran, N.V. Dudkina, L.A. Kane, J.E. van Eyk, E.J. Boekema, M.W. Mather, A.B. Vaidya, Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*, *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000418.
- [45] A. Zikova, A. Schnauer, R.A. Dalley, A.K. Panigrahi, K.D. Stuart, The F₀(F₁)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000436.
- [46] A. Wächter, Y. Bi, S.D. Dunn, B.D. Cain, H. Sialaff, F. Wintermann, S. Engelbrecht, W. Junge, Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 3924–3929.
- [47] A.G. Stewart, L.K. Lee, M. Donohoe, J.J. Chaston, D. Stock, The dynamic stator stalk of rotary ATPases, *Nat. Commun.* 3 (2012) 687.