



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**ESTUDIOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE SÍNTESIS E HIDRÓLISIS  
DE ATP DE LA  $F_1F_0$ -ATP SINTASA MITOCONDRIAL  
DEL ALGA INCOLORA *Polytomella sp.***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)**

**PRESENTA**

ALEXA VILLAVICENCIO QUEIJEIRO

**TUTOR**

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**COMITÉ TUTORAL**

DR. GEORGES DREYFUS CORTES  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA,

Febrero , 2016



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.

*Imagination is more important than knowledge; for while knowledge defines  
all we currently know and understand, imagination points to all  
we might yet discover and create.*

*Albert Einstein*

# ESTUDIOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ATP DE LA $F_1F_0$ -ATP SINTASA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA *Polytomella sp.*

## RECONOCIMIENTOS

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

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Georges Dreyfus Cortés	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo y el apoyo brindado en la implementación y desarrollo técnico.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Javier de la Mora y el apoyo brindado en la implementación y desarrollo de algunas técnicas.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 128110) y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, IN203114). Durante los estudios de doctorado la sustentante tuvo una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis (229468).

El Jurado del Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Rafael Camacho Carranza	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Horacio Reyes Vivas	Instituto Nacional de Pediatría, UNAM

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la UNAM por ser el lugar en el que he crecido profesional y personalmente . Sobre todo por ser un lugar que da oportunidad a cada persona que esté dispuesta a luchar y superarse.

Agradezco al Instituto de Fisiología Celular por darme sentido de pertenencia y ser mi segundo hogar durante casi 10 años. El IFC es un lugar lleno de recuerdos para mí, un lugar de libertad de pensamiento y de amplio criterio, un lugar en el que encontré el ambiente idóneo para desarrollarme. Espero que retome su fuerza y recuerde que su comunidad es su fuerza más grande.

A mis padres que siempre han trabajado mucho por nosotras, sacrificándose y demostrándonos lo que es el trabajo duro, comprometido y con pasión. Les agradezco el haberme dado alas para ser la mejor persona que puedo ser y raíces a las que siempre vuelvo y de las que creceré fuerte. Espero que sepan que a ustedes debo el poder estar donde estoy ahora.

A mis hermanas; Aline, James y Monse, ustedes son para mi un ejemplo de tenacidad y fuerza; son la alegría de mi vida y el consuelo de muchos días grises. ¡Es genial compartir la vida con ustedes! (aunque usualmente esté basada en planes chinos...). Me han mostrado la fuerza para salir adelante ante lo adverso y también que es posible redefinirse y cambiar.

A mi sobrina Valentina que, a pesar de que ahora es muy pequeña, me ha enseñado el significado del amor simple y verdadero, además de que es increíble verla crecer y muuuy divertido aprender con y de ella.

A Paco por ser mi compañero de aventuras e impulsarme a ser la mejor persona que puedo ser, aunque oponga resistencia y sea naturalmente rejega... ¡es lo mejor ir a la aventura contigo y construir el futuro! ILU B.

Al Dr. Diego González Halphen por ser no solo un gran tutor sino un gran ser humano, por acompañarme en el camino, a veces complicado y muchas veces divertido.

A mi comité tutorial; al Dr. Georges Dreyfus Cortés por siempre tener una crítica constructiva al trabajo y compartir conmigo su conocimiento. Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez por aceptar unirse a est proyecto y enriquecerlo con su conocimiento cinético, bioquímico y con muchas muchas preguntas.

A los miembros del jurado que se dieron el tiempo de revisar mi tesis, gracias por sus comentarios y sugerencias. A la Dra. Marietta Tuena Sangri, que es para mi un ejemplo de Científica, admiro su brillantez y amabilidad sin fin. Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, por no dejar de preguntar nunca y siempre hacerme pensar. Al Dr. Rafael Camacho Carranza, por enriquecer el trabajo con sus señalamientos puntuales y por darme una visión externa y distinta. Al Dr. Daniel Alejandro Fernández, por revisar mi tesis, aún contra el tiempo y al Dr. Horacio Reyes Vivas, por las sugerencias e ideas constructivas.

A los miembros pasados, presentes y fósiles con los que conviví :P. Algunos ya han migrado y otros etán en proceso, gracias por hacer los días de jornada completa más amenos; Diana, Lili, Ale, Lorenzo, Valentín, Chava, Alain, Araceli, Eli, Paola, Héctor & Félix.

En especial a Miriam, ciertamente ahora entiendo la posición, no siempre valorada y no muy comprendida. ¡Gracias por toda tu ayuda y tu apoyo!.

¡Gracias a los miembros del laboratorio Funes!, siempre me ayudaron cuando lo necesite y creo que es invaluable su sentido de comunidad y su ñoñez (en el buen sentido), gracias a Sole, Fabiola, José Luis, Raymond y Carlos. También al laboratorio de los “Berthos” y los “Mases”, definitivamente es esa colaboración lo que hace de IFC un lugar único.

A Chayito, Gaby y el Señor Alfredo, por siempre ayudarme con lo que necesitara y por darme ánimos cuando se veía lejos el final. Muchas gracias al Señor Alfredo, es usted una “especie en extinción”, admiro su compromiso y su calidad de trabajo, siempre dispuesto a ayudar, espero que siempre mantenga esa calidez porque lo hace único.

# ESTUDIOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ATP DE LA F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP SINTASA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA *Polytomella sp.*

	Página
<b>Tabla de contenidos</b>	
Lista de tablas	4
Lista de figuras	5
Resumen	7
Abstract	8
Abreviaturas	9
Introducción	11
La mitocondria como organelo central para la célula	12
Relevancia biológica del ATP y síntesis dentro de la célula	13
ATP sintasas: estructura y función	15
Mecanismo de la enzima	18
Las algas clorofíceas: <i>Chlamydomonas</i> y <i>Polytomella</i>	19
ATP Sintasa en las algas clorofíceas	
Estructura del complejo V	20
Composición polipeptídica de la ATP sintasa en <i>Chlamydomonas</i> y <i>Polytomella sp.</i>	24
Actividad de hidrólisis de la ATP sintasa de <i>Polytomella sp.</i>	25
Planteamiento del problema	27
Objetivos	28
Objetivo general	
Objetivos particulares	
Resultados	29
Hidrólisis de ATP	
Pruebas para estandarizar las condiciones del ensayo por el método de Pullman	30
Curva de concentración de proteína	30
Concentración de enzimas acoplantes (PK/DHL)	30
Curva de concentración de lauril maltósido	32
Evaluación del efecto de inhibidores sobre la hidrólisis de ATP	
Oligomicina	33
DCCD	33
Mg-ADP	35
Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad c	36
Curvas de saturación de Mg-ATP	37
Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de ATP de la enzima dimérica	39

## Tabla de contenidos

Efecto del pH sobre la hidrólisis de ATP de la enzima dimérica	41
Ensayos para calcular el porcentaje de inactivación irreversible de la ATP sintasa dimérica de <i>Polytomella</i> sp	42
Extensión carboxilo terminal de la subunidad $\beta$ .	
Amplificación de la extensión	45
Purificación de la proteína sobre-expresada	45
Inmunodetección de la proteína purificada	45
Ensayos de hidrólisis en presencia de la de la extensión C-T de la subunidad $\beta$ purificada	47
Evaluación de la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima dimérica reconstituida en liposomas	49
Síntesis de ATP	
Determinación del cociente respiratorio de mitocondrias purificadas de <i>Polytomella</i> sp.	51
Pruebas para estandarizar las condiciones del ensayo por el método de Trauttschold	
Curva de concentración de proteína	53
Curva de concentración de succinato	53
Evaluación del efecto de inhibidores sobre la síntesis de Mg-ATP	54
Curva de concentración de oligomicina	55
Curva de saturación de Mg-ADP	56
Discusión	58
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Materiales y métodos	66
1. Cultivo de <i>Polytomella</i> sp	67
2. Obtención de las mitocondrias	
2.1 Mitocondrias desacopladas	67
2.2 Mitocondrias con control respiratorio	67
3. Cuantificación de proteína	
3.1 Método de Lowry	68
3.2 Método de Biuret	68
4. Ensayos de oximetría	68
5. Purificación de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp.	69
6. Obtención de proteoliposomas	
6.1 Preparación de proteoliposomas de ATP sintasa dimérica	70
6.2 Ensayos de hidrólisis de ATP en proteoliposomas	70
7. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE Mg-ATP	
7.1 Método de Pullman (acoplado)	71
7.1.2 Evaluación de la hidrólisis a diferentes pHs	72
7.1.3 Ensayos a diferentes temperaturas	72
7.1.3.1 Cálculo del tiempo de retraso o lag	72
7.2 Método de Chifflet (colorimétrico)	73



7.3 Método de Zerbetto para actividad <i>in gel</i>	74
8. Ensayos espectrofotométricos y pruebas de oligomicina y DCCD	74
9. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	
9.1 Geles nativos azules y claros (BN/CN-PAGE)	75
9.2 Geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)	75
10. Medición de actividad de síntesis de ATP	76
11. Determinación del porcentaje de enzima inactivada irreversiblemente	77
12. Carboxilo terminal de la subunidad $\beta$	
12.1 Clonación del fragmento C-T del gen <i>atp2</i> a partir de una genoteca de cDNA	77
12.2 Ensayos de sobre expresión en <i>Escherichia coli</i> BL21 codon plus	78
12.2.1 Determinación del estado de la proteína	78
12.3 Purificación de la proteína a partir de <i>Escherichia coli</i> BL21 transformada con el vector.	78
12.4 Evaluación del efecto de la extensión purificada sobre la hidrólisis de ATP	79
13. Alineamiento múltiple de secuencias	
13.1 Alineamiento de secuencias de la subunidad <i>c</i>	79
13.2 Alineamiento de secuencias de la subunidad $\beta$	79
Apéndice I: Purificación de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp.	80
Apéndice II: Lavado de los tubos con ácido sulfúrico	81
Referencias	82
Apéndice III: Artículos publicados	88
Kinetic and hysteretic behavior of ATP hydrolysis of the highly stable dimeric ATP synthase of <i>Polytomella</i> sp.	
The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga <i>Euglena gracilis</i> shares many additional subunits with parasitic Trypanosomatidae	
Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of <i>Polytomella</i> sp.	
The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of <i>Polytomella</i> sp. is dimeric.	
La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo Hemo. centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD)	

## ESTUDIOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ATP DE LA F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP SINTASA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA *Polytomella sp.*

### LISTADO DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1</b>	Composición polipeptídica de las ATP sintasas de <i>Escherichia coli</i> ; <i>Bos taurus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , y <i>Polytomella sp.</i>	17
<b>Tabla 2</b>	Listado de subunidades y función que cumplen en el complejo V de <i>Polytomella sp.</i>	25
<b>Tabla 3.</b>	Subunidades que componen a la ATP sintasa de <i>Polytomella sp.</i>	25
<b>Tabla 4.</b>	Constantes cinéticas para la ATP sintasa dimérica y el sector F <sub>1</sub> .	37

## ESTUDIOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ATP DE LA F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP SINTASA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA *Polytomella sp.*

### LISTADO DE FIGURAS

		Página
<b>Figura A.</b>	Introducción	11
<b>Figura B.</b>	Planteamiento del problema y objetivos	26
<b>Figura C.</b>	Resultados	29
<b>Figura 1</b>	Representación gráfica de las mitocondrias y reconstrucción tridimensional hecha a partir de ensayos de criotomografía electrónica.	13
<b>Figura 2.</b>	Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.	14
<b>Figura 3.</b>	Modelo de la F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP sintasa monomérica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	16
<b>Figura 4.</b>	Estructura y composición polipeptídica de ATP sintasas de diferentes organismos	17
<b>Figura 5.</b>	Modelo de binding-change en la hidrólisis de ATP.	18
<b>Figura 6.</b>	Composición de las algas clorofíceas <i>Polytomella sp.</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	20
<b>Figura 7.</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia de la subunidad β de la ATP sintasa de diferentes organismos.	22
<b>Figura 8.</b>	Estructura de la ATP sintasa en mitocondrias de siete especies diferentes.	23
<b>Figura 9.</b>	Estructura y composición polipeptídica de la ATP sintasa de <i>Polytomella sp.</i>	25
<b>Figura 10.</b>	Estandarización de la concentración de ATP sintasa y de enzimas acoplantes.	31
<b>Figura 11.</b>	Curva de concentración de lauril maltósido.	32
<b>Figura 12.</b>	Efecto de la oligomicina y DCCD sobre la ATP sintasa de <i>Polytomella sp.</i>	34
<b>Figura 13.</b>	Efecto del ADP en la hidrólisis de ATP de la ATPasa dimérica.	35
<b>Figura 14.</b>	Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad c de la ATP sintasa.	36
<b>Figura 15.</b>	Curva de saturación de Mg-ATP.	38
<b>Figura 16.</b>	Hidrólisis de ATP en un intervalo amplio de temperaturas.	39
<b>Figura 17.</b>	Comportamiento histerético de la enzima dimérica.	40

<b>Figura 18.</b>	La hidrólisis puede proceder en un intervalo de pH amplio.	41
<b>Figura 19.</b>	Hidrólisis de Mg-ATP de ATPasa dimérica incubada a temperaturas crecientes.	43
<b>Figura 20.</b>	BN-PAGE y CN-PAGE de la enzima dimérica incubada a temperaturas crecientes.	44
<b>Figura 21.</b>	Purificación de la extensión carboxilo- terminal de la subunidad $\beta$ .	46
<b>Figura 22.</b>	Inmunodetección de la extensión carboxilo- terminal de la subunidad $\beta$ .	46
<b>Figura 23.</b>	Efecto de la extensión C-T de la subunidad $\beta$ purificada en la hidrólisis de ATP.	47
<b>Figura 24.</b>	Efecto de la extensión C-T de la subunidad $\beta$ purificada en la hidrólisis de ATP con concentraciones crecientes de LM	48
<b>Figura 25.</b>	Evaluación de la hidrólisis de ATP en liposomas y efecto de la oligomicina.	50
<b>Figura 26.</b>	Consumo de oxígeno en mitocondrias de <i>Polytomella sp.</i>	52
<b>Figura 27.</b>	Estandarización para el ensayo de síntesis de ATP en mitocondrias de <i>Polytomella sp.</i>	53
<b>Figura 28.</b>	Evaluación del efecto de inhibidores sobre la síntesis de ATP en mitocondrias de <i>Polytomella sp.</i>	54
<b>Figura 29.</b>	Curva de oligomicina en mitocondrias de <i>Polytomella sp.</i>	55
<b>Figura 30.</b>	Curva de saturación de Mg-ADP en mitocondrias de <i>Polytomella sp.</i>	56
<b>Figura D.</b>	Discusión, Conclusiones y Perspectivas	57
<b>Figura E.</b>	Materiales y Métodos	66
<b>Apéndice I.</b>	Purificación de ATP sintasa de <i>Polytomella sp.</i>	80

## RESUMEN

La  $F_1F_0$  ATP sintasa en las algas clorofíceas *Polytomella* sp. y *Chlamydomonas reinhardtii* tiene características distintivas de otros complejos: es un dímero altamente estable, tiene una composición polipeptídica atípica y presenta extensiones en sus subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$ . Se ha reportado que la forma totalmente activa es el dímero y probablemente el monómero no está presente en las crestas de las mitocondrias. La  $F_1F_0$ -ATP sintasa purificada de *Polytomella* sp. presenta una actividad de hidrólisis de ATP muy baja ( $0.03 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). La ATP sintasa dimérica de *Polytomella* sp. purificada presenta una  $V_{\text{max}}$  de  $0.095 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$  y una  $K_m$  por Mg-ATP de  $0.55 \text{ mM}$ ; esta actividad puede incrementarse por la presencia de detergentes como lauril maltósido y Tween 20. La  $V_{\text{max}}$  de la enzima dimérica, en presencia de lauril maltósido, se incrementó a  $4.85 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ , (estimulación de 50X) y la  $K_m$  se mantuvo igual ( $0.4 \text{ mM}$ ). Se observó que la enzima dimérica no sigue un comportamiento cinético simple, lo que sugiere que los monómeros presentan un comportamiento cinético asimétrico. La actividad del sector  $F_1$  es mayor que la de la enzima dimérica y también puede activarse con lauril maltósido con una estimulación de dos veces, con respecto a la condición sin detergente; la  $V_{\text{max}}$  para el sector  $F_1$  fue de  $3.43 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$  y  $7.15 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ , en ausencia y presencia de detergente, respectivamente; en contraste, la  $K_m$  no se modificó ( $0.36 \text{ mM}$  y  $0.34 \text{ mM}$ ).

La enzima dimérica es sensible a inhibidores clásicos como DCCD, Mg-ADP y oligomicina en concentraciones similares a las que se han reportado. Al evaluar la sensibilidad a oligomicina en la enzima dimérica, se observó que el inhibidor actúa como un inhibidor rápido no fuertemente unido. El pegado no fuerte de la oligomicina en la enzima del alga podría explicarse por la presencia de mutaciones en residuos que se ha reportado confieren resistencia al antibiótico. Se purificó la extensión carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$ , que se ha propuesto como el análogo funcional de la subunidad regulatoria  $IF_1$  en mitocondrias o la subunidad  $\epsilon$  de *E. coli*; el péptido purificado inhibió la actividad hidrolítica del complejo entre 20 a 30%.

La enzima dimérica es capaz de hidrolizar ATP en un amplio intervalo de temperatura sin disociarse y con una energía de activación de  $4.08 \text{ Kcal/mol}$ . Al realizar los ensayos de hidrólisis a diferentes temperaturas, se observó un comportamiento histerético asociado al proceso de activación por temperatura. La histéresis está relacionada con la transición de las enzimas de una forma inactiva a otra totalmente activa; esta activación podría involucrar cambios conformacionales en la enzima o a la liberación de un péptido inhibitorio del sector  $F_1$ . En *Polytomella* sp. la histéresis mostró dependencia con la temperatura, pero no con el pH. La enzima dimérica de *Polytomella* sp. es capaz de hidrolizar ATP en un intervalo de pH de 6.0 a 8.5 sin presentar un pH óptimo, a diferencia de lo que se ha reportado para otras enzimas.

Las mitocondrias de *Polytomella* sp. presentan un cociente respiratorio con succinato de 2.2 y la síntesis de ATP puede inhibirse con compuestos clásicos como oligomicina, cianuro de potasio (KCN), azida de sodio, carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y antimicina A. Las constantes cinéticas  $V_{\text{max}}$  y  $K_s$  calculadas para este proceso, a partir de un ajuste a un modelo cooperativo fueron  $V_{\text{max}}$  de  $63.45 \text{ nmol min}^{-1}$  y  $K_s$  de  $23.63 \text{ nM}$  con un coeficiente de Hill de 1.6.

La mayoría de los estudios cinéticos que se han llevado a cabo en otros organismos, se han realizado con la enzima  $F_1-F_0$  ATP sintasa monomérica o con el sector  $F_1$  libre. Aunque estos estudios se han realizados con la suposición explícita o implícita, de que la enzima funciona *in vivo* como un monómero, trabajos recientes han demostrado la existencia de dímeros y formas oligoméricas superiores en levadura, plantas, hongos, rata y algas. Se ha mostrado también la relevancia del complejo V mitocondrial y su oligomerización en procesos fisiológicos y patológicos, por lo que el estudio de la funcionalidad de esta forma oligomérica es muy relevante en el campo.

## ABSTRACT

The  $F_1F_0$ -ATP synthase from chlorophycean algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii* presents characteristic features different from other complexes: it is a very stable dimer, exhibits peripheral arms with nine atypical subunits only present in chlorophycean algae and has extensions on its catalytic subunits  $\alpha$  and  $\beta$ . It has been reported that the active form is the dimer and probably the monomer is not present at all in mitochondrion. The  $F_1F_0$ -ATP synthase purified from *Polytomella* sp. has a very low hydrolytic activity ( $0.03 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) and has a  $V_{\text{max}}$  of  $0.095 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$  and a  $K_m$  for Mg-ATP of  $0.55 \text{ mM}$ , this latent ATP hydrolytic activity, can be released by detergents such as lauryl maltoside and Tween 20. When lauryl maltoside was present  $V_{\text{max}}$  increased to  $4.85 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ , (50X stimulation) and  $K_m$  remained the same ( $0.4 \text{ mM}$ ). Kinetic behaviour displayed can not be described by Michaelis-Menten adjustments, which suggests that monomers present an asymmetrical behaviour.  $F_1$  sector has a larger hydrolytic activity than the dimeric form and can also be activated by detergent with a 2X stimulation;  $V_{\text{max}}$  was  $7.15 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$  and  $3.43 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} / \text{mg}$ , with and without detergent, respectively, on the other hand  $K_m$  remained the same ( $0.34 \text{ mM}$  and  $0.36 \text{ mM}$ ).

The dimeric enzyme can be inhibited by classic inhibitors such as DCCD, Mg-ADP and oligomycin with similar concentrations as the ones previously reported. Oligomycin acts as fast inhibitor that does not seem to bind strongly to the enzyme which could be attributed to mutations on residues that confer resistance to the antibiotic.

The  $\beta$  subunit of the enzyme has a 68-residue C-terminal extension similar to the endogenous mitochondrial ATPase inhibitor IF<sub>1</sub> or  $\epsilon$  in *E. coli*. Thus, we over-expressed and purified the 68-residue peptide and show it has a limited inhibitory effect on ATP hydrolysis by the dimer of 20-30%. The  $F_1F_0$ -ATP synthase purified from *Polytomella* sp. can hydrolyze ATP on a broad temperature range, without dissociating and with a strong temperature-dependence with an activation energy of  $4.08 \text{ Kcal/mol}$ . The enzyme also exhibited a hysteretic behaviour with a lag phase associated with the transition from an inactive to a fully active form, which could indicate conformational changes or the release of an inhibitory peptide from  $F_1$ . The enzyme can also perform its activity on a pH range from 6.0 to 8.5, lag phase was strongly dependent on temperature but not on pH. *Polytomella* sp. mitochondria have a respiratory control ratio of 2.2 with succinate as substrate and ATP synthesis is inhibited by classic compounds such as oligomycin, potassium cyanide (KCN), sodium azide, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone and antimycin A.  $V_{\text{max}}$  and  $K_s$  calculated from a cooperative model  $V_{\text{max}}$   $63.45 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1}$  and  $K_s$   $23.63 \text{ nM}$  with a Hill coefficient of 1.6 .

The majority of mechanistic studies carried out in other organisms have focused on the ATP hydrolysis either of the  $F_1$  sector or of the monomeric  $F_1F_0$ -ATP synthase. These studies have been performed with the explicit or implicit assumption that the enzyme operates *in vivo* as a monomer. Dimers and higher oligomeric forms of ATP synthase have been found in mitochondria of yeast, plants, fungi, rat and *Polytomella* sp. and its relevance in physiological and pathological processes has become clear; therefore, the study of this oligomeric form is very important for the field.

**ABREVIATURAS**

ADP	Adenosin Difosfato
ASA	siglas en inglés de proteína asociada a la ATP sintasa
ATP	Adenosin Trifosfato
Bis-Tris	2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol
BN-PAGE	siglas en inglés de electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida
BSA	Álbumina sérica bovina
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
CMC	Concentración micelar crítica
CN-PAGE	siglas en inglés de electroforesis nativa en geles claros de poliacrilamida
$\Delta p$	Potencial electroquímico
DCCD	Diciclohexil dicarbodiimida
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA <sub>mt</sub>	DNA mitocondrial, genoma mitocondrial
DNA <sub>pt</sub>	DNA plasmídico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen diamina tetracético
FADH	flavin adenín dinucleótido (reducido)
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kcal	kilocalorías
kg	kilogramos
LM	n-dodecil-b-D-maltósido
LDAO	Óxido de Lauril dimetil-amina
LDH	Lactato deshidrogenasa
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido (reducido)
OSCP	Siglas en inglés de proteína conferidora de sensibilidad a oligomicina, subunidad de F <sub>1</sub>
PEP	Fosfoenol piruvato
Pi	Fosfato inorgánico
PCR	Siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Siglas en inglés de Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank)
PK	Piruvato cinasa
PMSF	Fenilmetanolsulfonil fluoruro
PVDF	Polifluoruro de vinilidenoj
RNA	Siglas en inglés de ácido ribonucleico (ARN)
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	siglas en inglés de electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina
TLCK	cetona de tosil lisil clorometilo
$V_{\max}$	Velocidad máxima



# INTRODUCCIÓN

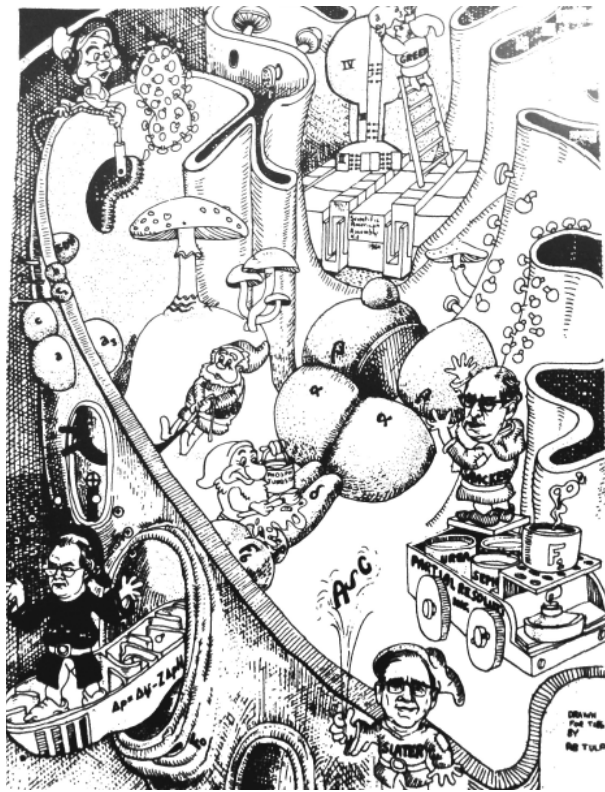


Figura A. (1)

## La mitocondria como organelo central para la célula

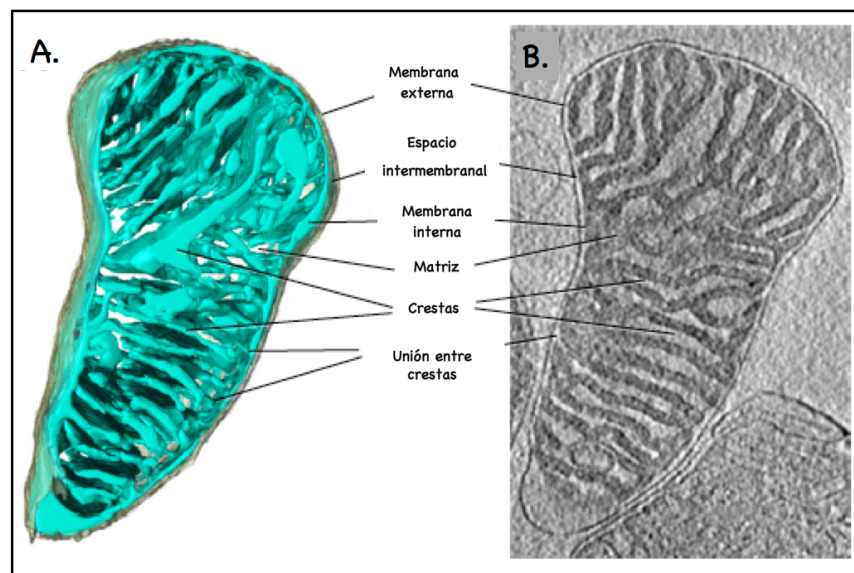
Las mitocondrias son organelos que se encuentran presentes en la gran mayoría de las células eucariontes y que tienen una participación fundamental en el metabolismo celular; juegan un papel relevante en la regulación del calcio intracelular, la oxidación de los ácidos grasos, la biosíntesis del grupo hemo y de los centros hierro-azufre (Fe-S). Son los sitios principales donde se genera la energía en las células eucariontes no fotosintéticas, al mismo tiempo que están relacionadas con procesos de muerte celular programada, envejecimiento y con diversos procesos patológicos.

Las mitocondrias suelen representarse como estructuras ovaladas y solitarias que se encuentran en el citosol (fig. 1). Esta aseveración es una sobre-simplificación de la realidad, actualmente con base en estudios de tomografía por microscopía electrónica (fig. 1) (2, 3), se ha establecido que estos organelos poseen una morfología muy dinámica, ya que su número y tamaño dependen del estado fisiológico de la célula y varían considerablemente entre los diferentes tipos celulares. Como resultado de eventos de fusión y fisión, las mitocondrias pueden existir como organelos independientes en algunas células mientras que en otras forman una red continua y dinámica; incluso hay algunas células que presentan mitocondrias sin crestas o algunos organismos que en condiciones anaeróbicas las pierden (4, 5).

Es un hecho que las mitocondrias son centrales para la provisión de energía de las células eucariontes y se acepta de manera general que el último ancestro común a todas las formas de vida era energéticamente ineficiente. Esto se modificó cuando se dio la endosimbiosis entre una  $\alpha$  proteobacteria y su hospedero (6, 7). Entre otras evidencias esta teoría está apoyada por el hecho de que las mitocondrias contienen su propio DNA, que es remanente de cuando eran bacterias aeróbicas. En un árbol filogenético las secuencias de DNA mitocondrial (DNA<sub>mt</sub>) y plastídico (DNA<sub>pt</sub>) se posicionan en el grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias y de las cianobacterias, respectivamente. Otra evidencia son los ribosomas presentes en las mitocondrias y la doble membrana que las envuelve (fig. 1).

La membrana mitocondrial externa es permeable a moléculas pequeñas ( $M_r < 5000$ ) e iones, en comparación con la membrana interna, que es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón ( $H^+$ ), que solo puede pasar a través de transportadores y bombas. Las únicas especies que cruzan la membrana interna son aquellas para las que existen transportadores específicos.

La membrana interna engloba una matriz densa que incluye a múltiples enzimas del metabolismo intermediario en el que se llevan a cabo un amplio número de reacciones bioquímicas, tales como la oxidación del piruvato, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, la oxidación de los aminoácidos y el ciclo del ácido cítrico, es decir todas las rutas de oxidación de combustibles, excepto la glucólisis. También en la matriz mitocondrial se encuentran varias copias del genoma mitocondrial ( $\text{DNA}_{\text{mt}}$ ), que codifica a proteínas localizadas en la membrana interna así como algunos elementos necesarios para su traducción, como RNAs ribosomales y de transferencia. El resto de las proteínas que la mitocondria necesita para su funcionamiento están codificadas en el genoma nuclear, son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria.



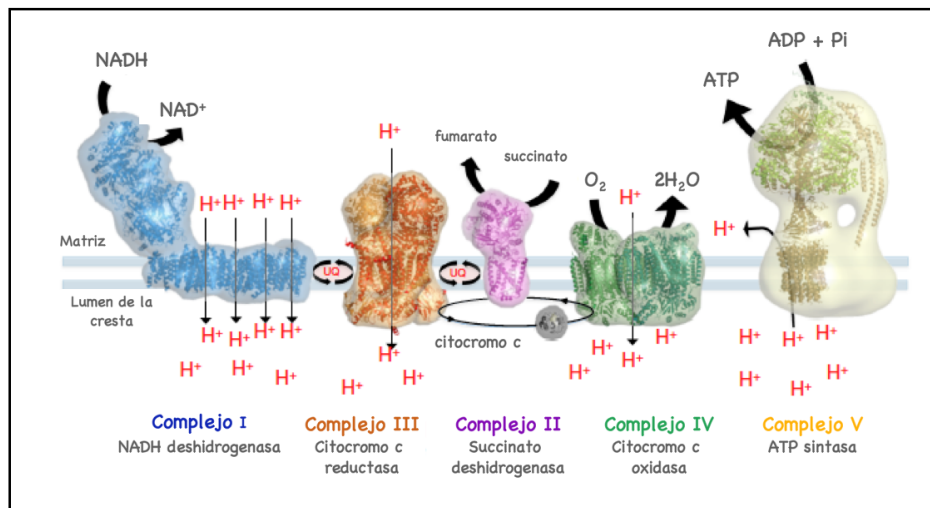
**Figura 1.** Representación gráfica de las mitocondrias y reconstrucción tridimensional hecha a partir de ensayos de crio-tomografía electrónica. **A.** Se muestra el modelo tridimensional de una mitocondria de corazón de ratón. La membrana externa (gris) envuelve a la membrana interna (azul). La membrana interna se pliega para dar lugar a crestas lamelares que se localizan en la matriz. **B.** Corte tomográfico del mapa de volumen, se muestra la matriz en la que se localiza la mayor parte de las proteínas, ésta es densa en comparación con el espacio intermembranal y el lumen de las crestas que se observan con una menor densidad dado su menor contenido de proteína. La membrana interna se localiza a aproximadamente 20 nm de la membrana externa y presenta puntos precisos en los que las crestas se unen (cristae junction). Modificado de Kuhlbrandt (8).

### Relevancia biológica del ATP y síntesis dentro de la célula

El ATP es la molécula de intercambio energético ubicua en la naturaleza, por lo que la mayor parte de la energía en las células eucariontes proviene de la hidrólisis de ATP en ADP. Este proceso es exergónico y dirige un gran número de reacciones bioquímicas en las células. Se ha calculado que un hombre adulto con actividad física normal requiere recambiar 65 kg diarios de ATP para satisfacer sus necesidades energéticas (9). En condiciones aeróbicas las células eucariontes sintetizan la gran mayoría del ATP necesario mediante la actividad de la  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP sintasa.

Este complejo está ampliamente distribuido en la naturaleza; se localiza en la membrana plasmática de las bacterias, en la membrana tilacoidal del cloroplasto y en la membrana interna mitocondrial. Esta enzima cataliza al menos dos reacciones acopladas: el transporte vectorial de protones y la síntesis de ATP; en mitocondrias, el transporte vectorial corresponde a la entrada de protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial. La reacción de síntesis del ATP, que es la unión de un fosfato (Pi) a un ADP mediante un enlace fosfodiéster, procede sin la formación de un intermediario fosforilado.

En bacterias, en mitocondrias y en cloroplastos el potencial electroquímico generado por la cadena respiratoria o fotosintética se aprovecha para sintetizar ATP (10). En el caso particular de la mitocondria, los complejos I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa), II (succinato deshidrogenasa), III (ubiquinona:citocromo c oxidorreductasa) y IV (citocromo c oxidasa), llevan a cabo reacciones de óxido-reducción utilizando sustratos reductores (NADH, succinato y  $FADH_2$ ) y bombean protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, lo que genera un gradiente electroquímico de protones ( $\Delta p$ ). La energía derivada de este gradiente es utilizada por la ATP sintasa o complejo V para permitir la producción de ATP a partir de ADP y Pi en la matriz mitocondrial; ambos procesos, respiración y síntesis de ATP, se conocen de manera general como fosforilación oxidativa (fig.2).



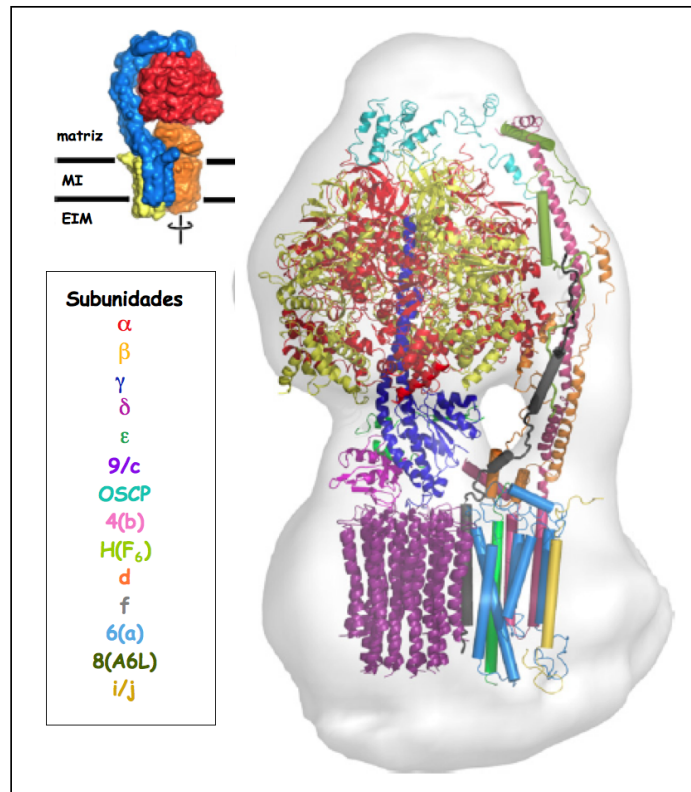
**Figura 2.** Complejos de la cadena respiratoria; cuatro complejos supramoleculares transportan electrones de las moléculas reductoras hasta el oxígeno, formando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial, que es utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP. Se muestran los complejos: I- NADH deshidrogenasa (azul); II- succinato deshidrogenasa (violeta); III- citocromo c reductasa (naranja); IV- citocromo c oxidasa (verde) y el V- ATP sintasa. UQ: ubiquinol. Modificado de Kuhlbrandt *et al.* (8).

## ATP sintasas: estructura y función

La  $F_1F_0$ -ATP sintasa mitocondrial o complejo V es una enzima que se encuentra unida a la membrana interna y juega un papel esencial en la fosforilación oxidativa. En la mayoría de las células aeróbicas, las ATP sintasas tipo F funcionan no sólo como ATPasas, sino también como ATP sintasas (11, 12). Esto es, sintetizan ATP a partir de ADP y  $P_i$  en presencia de  $Mg^{++}$ , en respuesta a un gradiente electroquímico de protones, que se genera por la cadena de transporte de electrones.

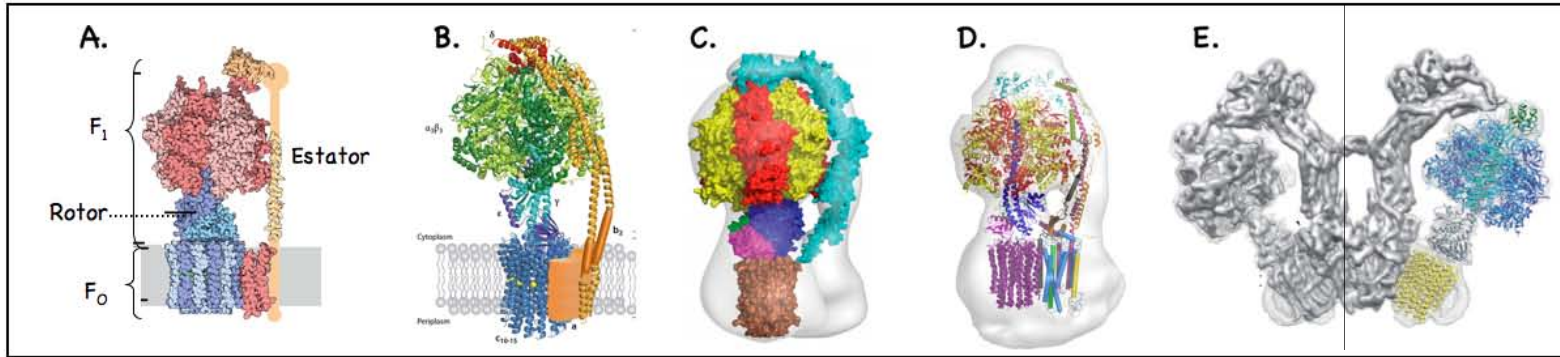
La estructura primaria de las  $F_1F_0$  ATP sintasas de diferentes organismos está altamente conservada, con una identidad de 71.8% entre las subunidades catalíticas de los complejos de *Bos taurus* y de *Escherichia coli* (13). La enzima está compuesta por un núcleo de subunidades conservadas en diferentes organismos así como subunidades especie-específicas, denominadas accesorias, entre cuyas funciones se encuentran el brindar estabilidad a la estructura, regular la actividad de la enzima y oligomerizar al complejo (14, 15). Estructural y funcionalmente, la enzima está compuesta por dos motores rotatorios; uno electroquímico ( $F_0$ ) y uno químico ( $F_1$ ), que se encuentran acoplados por un eje o estator central y un soporte o estator periférico. El dominio  $F_1$  [ $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ] es soluble y corresponde a la parte catalítica de la enzima, en tanto que el dominio  $F_0$  [ $ab_2c_{10-14}$ ] está embebido en la membrana (figs. 3, 4 y tabla 1).

En *Bos taurus*, el dominio catalítico de la enzima está compuesto por un complejo heterohexamérico de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que se encuentran alternadamente dentro del complejo. Es en estas subunidades donde se encuentran los sitios de unión a nucleótidos (11). El dominio  $F_0$  es de naturaleza hidrofóbica y se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial, está compuesto por la subunidad  $a$ , la subunidad  $b$  y un anillo oligomérico de subunidades  $c$ , cuyo número de monómeros varía entre especies. Los dominios  $F_1$  y  $F_0$  están conectados entre sí por el brazo periférico y por el estator central. El brazo periférico y las llamadas subunidades menores (16-18) evitan la transmisión del torque hacia el núcleo catalítico [ $\alpha_3/\beta_3$ ]. El estator central [ $\gamma, \epsilon, \delta$ ] acopla la translocación de los protones con el movimiento de rotación del dominio membranal hacia los sitios de unión de nucleótido mediante la transmisión del poder elástico con la rotación del anillo (19-24), que se compone por monómeros de la subunidad  $c$ . La composición de el brazo periférico y del estator de membrana, así como de las subunidades dimerizantes y regulatorias varía entre especies. En la figura 4 se muestra una comparación entre algunas especies.



**Figura 3.** Modelo de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa monomérica de *Saccharomyces cerevisiae*. Las subunidades están coloreadas como sigue:  $\alpha$ : rojo;  $\beta$ : amarillo;  $\gamma$ : azul marino;  $\delta$ : magenta;  $\epsilon$ : verde; c: violeta; OSCP: turquesa ; b: rosa;  $H(F_6)$ : verde claro; d: naranja; f: gris; 6(a): azul claro; 8(A6L): verde oscuro e i/j: dorado. Las subunidades cuya estructura 3D no se ha caracterizado se muestran como cilindros. En el panel superior se muestran las estructuras estator  $F_1$  (rojo); rotor (naranja), estator periférico (azul) y estator de membrana (amarillo) en los colores indicados entre paréntesis. Modificada de (25).

**Figura 4 y Tabla 1.** Estructura y composición polipeptídica de ATP sintasas de diferentes organismos. **A.** Estructura general del complejo V, se muestran las partes de la enzima que corresponden al sector soluble  $F_1$ , al sector  $F_0$ , al rotor y al brazo periférico. **B.** ATP sintasa de la bacteria *Escherichia coli*, modificada de (26) . **C.** ATP sintasa de *Bos taurus*, modificada de (27). **D.** ATP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*, modificada de (25). **E)** ATP sintasa de *Polytomella sp.* modificada de (28). **Tabla 1.** Composición polipeptídica de las ATP sintasas de *Escherichia coli*; *Bos taurus*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Polytomella sp.* Se muestra el nombre de la subunidad así como la función que cumple dentro del complejo y el sector ( $F_1$  o  $F_0$ ) al que pertenece. Los pesos moleculares corresponden a las subunidades maduras. Entre paréntesis se muestran las subunidades homólogas en secuencia y/o función en otros organismos. \*Además de la proteína inhibidora  $IF_1$ , *S. cerevisiae* tiene al menos dos proteínas más, llamadas STFs que participan en la inhibición del complejo. Datos tomados de: 1 y 2 (29); 3 (15); 4 (30).



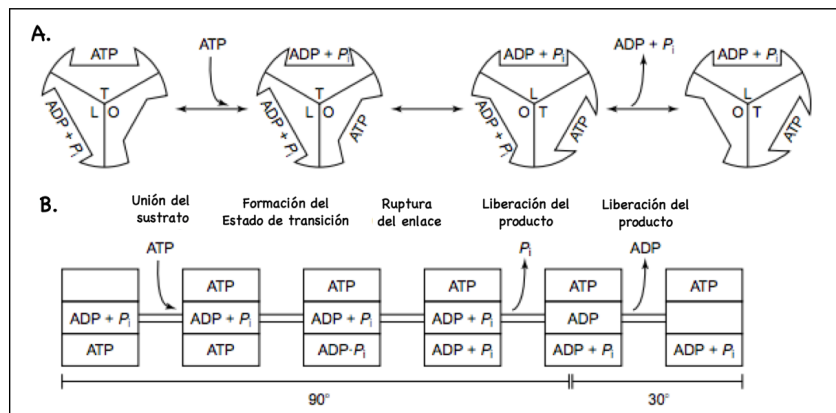
Segmento	Función	Subunidad	<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	<i>Bos taurus</i> <sup>2</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	<i>Polytomella sp.</i> <sup>4</sup>
F <sub>1</sub>	Estator F <sub>1</sub>	α	55 kDa	55 kDa	55 kDa	56.8 kDa
		β	50 kDa	51 kDa	51 kDa	59.1 kDa
	Rotor	γ	32 kDa	30 kDa	30 kDa	30.8 kDa
		δ	19 kDa	21 kDa (OSCP)	20 kDa (OSCP)	22.6 kDa (OSCP)
		ε	14 kDa	15 kDa (d)	14 kDa (d)	8.3 kDa (d)
F <sub>0</sub>		-	-	5.6 kDa (e)	6.6 kDa (e)	6.6 kDa (e)
	Estator periférico	c	8.2 kDa	9.5 kDa (9)	7.7 kDa (9)	7.3 kDa
		b	17 kDa	28 kDa (B1)	23 kDa (4)	-
		h	-	9 kDa (F6)	10 kDa	-
		d	-	17 kDa	10 kDa	-
		f	-	9 kDa	10 kDa	-
	Estator membrana	a	30 kDa	25 kDa (6)	27 kDa (6)	24.6 kDa (6)
		A6L	-	7 kDa	8 kDa	-
		i/j	-	-	6.6 kDa	-
	Dimerización	e	-	8 kDa	10 kDa	-
g		-	11 kDa	12 kDa	-	
k		-	-	7.5 kDa	-	
Regulación	IF <sub>1</sub>	-	10 kDa	6.6 kDa*	-	

Figura 4 y Tabla

## Mecanismo de la enzima

La región del hexámero ( $\alpha_3\beta_3$ ), donde se lleva a cabo la catálisis, ha sido resuelta por cristalografía de rayos X en presencia de diferentes inhibidores y sustratos análogos de la enzima (31-40) lo que ha permitido, junto con estudios bioquímicos, entender el mecanismo catalítico de la enzima. El sitio activo de la enzima se encuentra, principalmente en la subunidad  $\beta$  y los tres sitios (uno en cada  $\beta$ ) muestran cooperatividad. El flujo de protones a través de la subunidad  $\alpha$  ocasiona la rotación del anillo de subunidades  $c_{10}$ , que están embebidas en la membrana y de las cuales protruye el eje central [ $\gamma/\delta/\epsilon$ ]. En un ciclo completo, tres movimientos secuenciales de  $120^\circ$  de la subunidad  $\gamma$  e inducen cambios conformacionales consecutivos en las tres subunidades  $\beta$ , lo que conlleva a la unión del sustrato (ADP +  $P_i$ ), la síntesis de ATP y la liberación de ATP (41) (fig. 5).

El mecanismo mediante el cual se acopla el transporte de protones con la síntesis o hidrólisis de ATP ha sido estudiado a profundidad. El mecanismo de “binding change” propone que la rotación de la subunidad  $\gamma$  en relación al hexámero está acoplada a cambios en la química de los sitios catalíticos (42, 43). Dada la complejidad estructural de las F-ATPasas, su mecanismo cinético no puede ser descrito por un ajuste simple al modelo de Michaelis-Menten. El mecanismo general incluye además de la catálisis, la rotación de subunidades y la translocación de protones.



**Figura 5.** Modelo de “binding-change” en la hidrólisis de ATP. La hipótesis de binding-change y los sitios catalíticos están asociados a la rotación de la subunidad  $\gamma$ . **A)** Una iteración del mecanismo de “binding-change” (36). Cada sitio catalítico atraviesa por un ciclo de 3 etapas: T, L y O. El ATP se une al sitio abierto y vacío (O) y se convierte en un sitio ocupado y lleno (T). Después de que el enlace se rompe, el sitio T se convierte en un sitio relajado (L) que está ocupado por ADP y  $P_i$ , del cual los productos (ADP y  $P_i$ ) salen con lo que el sitio se convierte en abierto de nuevo (O). El cambio concertado entre los sitios entre estos tres estados (T,L y O) da lugar a la síntesis o hidrólisis de una molécula de ATP y a la rotación de  $120^\circ$  del rotor  $\gamma-\epsilon$ . Trabajos de cristalografía han agregado subpasos en el giro de  $120^\circ$  (39). **B)** Subpasos que se presentan en la hidrólisis o síntesis de ATP, con base en estudios de cinética y utilizando inhibidores (44). Con la unión de ATP en el sitio O se da la formación del estado de transición y después a la ruptura del enlace seguida de la liberación del  $P_i$  de un sitio parcialmente abierto y después la liberación del ADP. Cada paso observado en el inciso B, podría producir a su vez un subpaso, de forma tal que la rotación de  $90^\circ$  observada por Yasuda *et al.* (45) se da por pasos intermedios. Imagen modificada de (19).



**Las algas clorofíceas: *Chlamydomonas* y *Polytomella***

El linaje de las algas clorofitas se divide en 4 clases: clorofíceas, prasinofíceas, trebouxifíceas y ulvofíceas. Algunos autores consideran un grupo adicional: las pedinofíceas. *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. pertenecen a la clase de las clorofíceas. Se piensa que *Polytomella* sp. evolucionó a partir de un alga ancestral fotosintética y en algún momento perdió los cloroplastos y su capacidad para realizar fotosíntesis.

*Polytomella* sp. pertenece al clado Reinhardtinia, de acuerdo a Nakada *et al.* (46), este constituye un grupo monofilético de algas verdes dentro de la clase de las algas clorofíceas (47). *Polytomella* sp. es un organismo de vida libre que está cercanamente relacionado con *Chlamydomonas reinhardtii*, que es el organismo modelo de las algas verdes y se ha usado para estudiar los procesos de fotosíntesis, movimiento por flagelos y que incluso algunos han considerado un modelo del origen de las plantas.

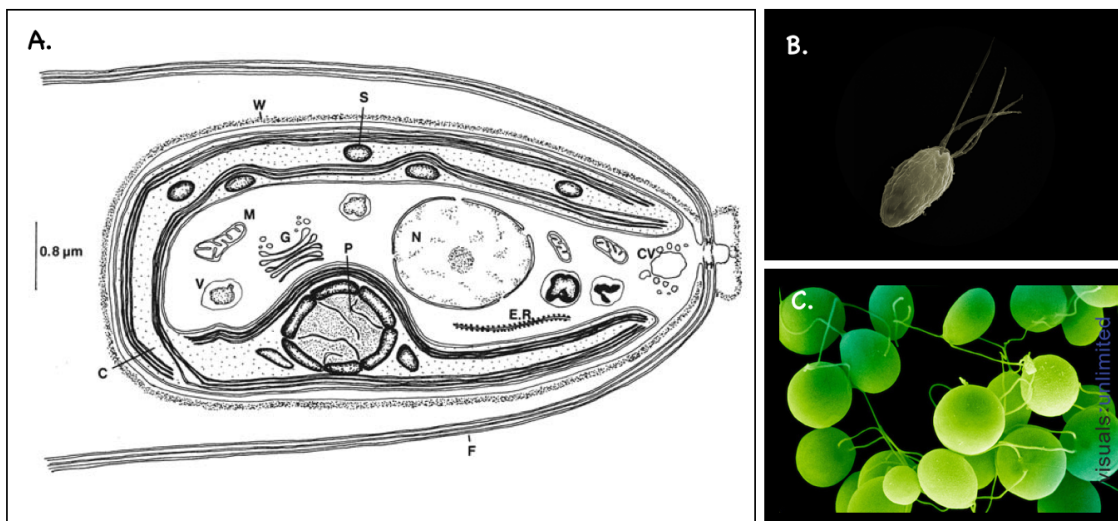
Los miembros del género de algas eucariontes *Chlamydomonas* son organismos unicelulares biflagelados que presentan células uninucleadas con forma de copa, pared celular y un cloroplasto basal con un pirenoide en el centro (fig. 6). Poseen dos vacuolas contráctiles en la base del flagelo y pueden o no presentar una mancha ocular. La membrana plasmática rodea a parte de la célula y es responsable de controlar el flujo de entrada y salida de sustancias al protoplasma.

Los organelos de locomoción o flagelos ayudan a la célula a desplazarse en el medio gracias a su movimiento. Estas estructuras están recubiertas por la membrana plasmática y poseen microtúbulos con un número y orientación específicos. Dentro del núcleo se encuentran el nucleolo, los cromosomas y el nucleoplasma y está rodeado por una doble membrana con poros. Dentro del estroma de los cloroplastos se encuentra una estructura de naturaleza proteica llamada pirenoide, que está asociada con la formación y almacenamiento de productos. Se conoce la secuencia completa de su genoma mitocondrial, el cual es lineal y muy compacto, de solamente 15.8 Kb (48). También se dispone de la secuencia completa del genoma nuclear de esta alga (49) y del genoma cloroplastídico (50). *C. reinhardtii* puede crecerse de manera rápida y la manipulación genética es relativamente sencilla, lo que aunado a las características antes mencionadas la hacen un buen modelo de estudio.

Aunque las algas que pertenecen al género *Polytomella* son consideradas dentro de las algas verdes, a pesar de que no son fotosintéticas y son incoloras ya que no poseen cloroplastos. Son unicelulares y presentan una forma ovoide cuyas dimensiones son 8  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho, y 4 flagelos de 22  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

El taxa *Polytomella* ha emergido como un organismo útil en el laboratorio para estudios mitocondriales, en gran parte porque no posee pared celular ni materiales plastídicos complejos lo que facilita la ruptura de las células y el aislamiento de mitocondrias. Esta alga tiende a enquistarse en su etapa de reposo o en condiciones ambientales desfavorables. El inicio del enquistamiento se caracteriza por el aumento progresivo de microgránulos en el protoplasma.

*Polytomella* sp. (SAG 198.80) se ha utilizado junto con *C. reinhardtii* en estudios comparativos de función y evolución mitocondrial y constituye, junto con *C. reinhardtii*, el mejor par de organismos no-fotosintético/fotosintético para los estudios comparativos de mitocondrias (51).



**Figura 6.** Composición de las algas clorofíceas *Polytomella* sp. y *Chlamydomonas reinhardtii*. **A.** Representación esquemática del alga verde *Chlamydomonas* en la que se muestra los organelos presentes en este organismo. (C) Cloroplasto; (CV) Vacuola contractil; (ER) Retículo endoplásmico; (F) Flagelos; (G) Aparato de Golgi; (M) Mitocondria; (N) Núcleo; (P) Pirenoide; (S) Almidón; (V) Vacuola; (W) Pared. Tomado de (52). **B.** Imagen de microscopia del alga incolora *Polytomella* sp (Robert W. Lee y David Smith). **C.** Imagen de microscopia del alga incolora *Chlamydomonas reinhardtii* tomada de <http://www.visualsunlimited.com>

## ATP Sintasa en las algas clorofíceas

### Estructura del complejo V

Comparada con otras ATP sintasas mitocondriales, la de las algas clorofíceas presenta varias características únicas; primero, las subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$ , en *C. reinhardtii* y en *Polytomella* sp., presentan extensiones peculiares en sus regiones amino y carboxilo, respectivamente, ya que en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) ambas subunidades migran con una masa molecular mayor, en comparación con otras especies. Al analizar la estructura primaria de dichas subunidades, se observó que esta diferencia se debe a la presencia de una extensión de 15 a 18 residuos en el extremo N-terminal de  $\alpha$  y de 60 a 70 residuos en el extremo C-terminal de  $\beta$  (53, 54).

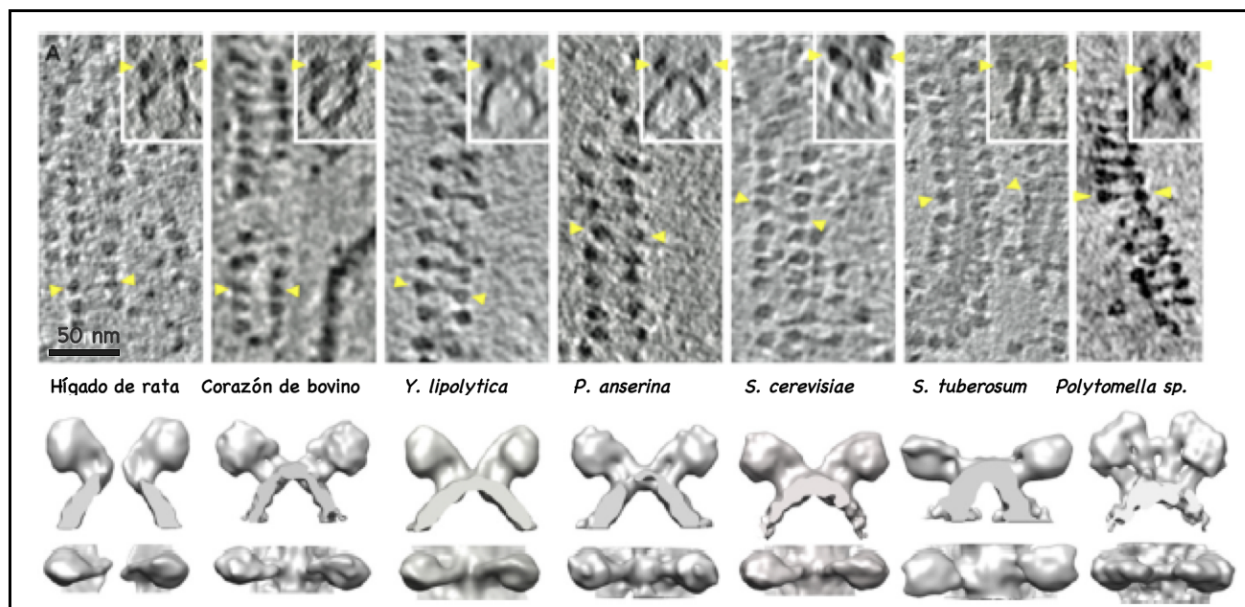
En la figura 7 se muestra un alineamiento múltiple de secuencias de subunidad  $\beta$  de diferentes organismos y se puede apreciar la extensión del C-T de ésta. La extensión en  $\beta$  se ha propuesto que pudiera fungir como la proteína inhibidora  $IF_1$ . En un análisis de alineamiento múltiple, se compararon diferentes secuencias de  $IF_1$  de varias fuentes y se encontró una región de 8 aminoácidos que alinea dentro de la secuencia mínima conocida que funciona como proteína inhibidora (55). Segundo, ambas ATP sintasas, al solubilizarse con una concentración de 1-2% de lauril maltósido, migran en un gel BN-PAGE exclusivamente como un dímero de aproximadamente 1600 kDa (56, 57).

Esto contrasta con las ATP sintasas mitocondriales de bovino, levadura y planta, las cuales en presencia de 1% del detergente presentan dos formas, la monomérica, de aproximadamente 600 kDa y el sector  $F_1$  de 400 kDa (15, 58). Tercero, la ATP sintasa de *C. reinhardtii*, al separarse mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE), presenta nueve proteínas de entre 10 y 61 kDa que no tienen similitud con las subunidades de otras ATP sintasas mitocondriales ni cloroplastídicas (fig. 7).

<i>Escherichia coli</i>	-----MKKL-----KL-----LNK	9
<i>Bos taurus</i>	MLGLVGRV-VAASASGALRGLSPSAPLPQQLLLRAAPALQPARDYAAQASPSPKAGAT	59
<i>Ostreococcus tauri</i>	MRRTLSPNIPWRIARDGAMRSMN-IAKIPETSASLSAGDLTLRTTNSLVARTYASAKSIG	59
<i>Polytomella sp.</i>	-----MALRY-AAGLAKNV---VQRQASLNI-ARAPAEAP--AID	36
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-----MLS-SVRLAALR---AGKTSNVFQA-VRAFAEAPAAAATTD	36
<i>Escherichia coli</i>	YSYLSHSINGSLIEAELDDVSVGEVCEIYASRQA---NERI---ARAQVVGFRNGKTLNLI	64
<i>Bos taurus</i>	TGRIVAVIGAVVDVQFDEG----LPPILNALEVQGRETRLVLEVAQHLGE--STVRTIAM	113
<i>Ostreococcus tauri</i>	AGKVTQVIGAVVDVQFDDQ----LPPILSALEVEGHVRLVLEVAQHLGE--NTRVCIAM	113
<i>Polytomella sp.</i>	AGYVSQVIGPVVDVRFDEG----LPSILSSLEVEGHSVRLVLEVAQHMGD--NTRVCIAM	90
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AGFVSQVIGPVVDVRFDEG----LPSILSALEVQGHNVRLVLEVAQHMGD--NTRVRCVAM	90
	. : * : : : * : : * : : . : * : : * : : * : : *	
<i>Escherichia coli</i>	GSSVGLTRTAVLKPTGEQLTIQISDAFLGSVLNASGQIMERFVPTPGDRGNLRLIDELP	124
<i>Bos taurus</i>	DGTEGLVRGQKVLDSGAPIRIPVGPETLGRIMNVI GEPIDERGP---IKTKQFAAIHAEA	170
<i>Ostreococcus tauri</i>	DTTEGLVRGQTVNNTGSPIQIPVGRATLGRIMNVI GEPIDECGP---ISTSTSLGIHREA	170
<i>Polytomella sp.</i>	DSTDGLVRGQKVDVTGSPIKVVPVGRGTLGRIMNVI GEPVDEQGP---IDAADIWSIHREA	147
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	DSTDGLVRGQKVVNTGSP-KVPVGRGTLGRIMNVI GEPVDEQGP---IECSEVWSIHREA	146
	: * * * : : * : : . : * * : : * : : . : * : : *	
<i>Escherichia coli</i>	PSYQERRVINTPLETRIRIVDGVLTFCGIGQRVGFASAGCGKTVLMHMLVNNTEAD---V	181
<i>Bos taurus</i>	PEFVEMSVQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGY	230
<i>Ostreococcus tauri</i>	PPFVQSTEMENLVTGIKVVDLLAPYQGGKIGLFGGAGVGKTVFIMELINNIKAGHGGF	230
<i>Polytomella sp.</i>	PEFTEQSTEQEILVTGIKVVDLLAPYQGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGF	207
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PEFTEQSTEQEILVTGIKVVDLLAPYQGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGF	206
	* : : . * * * : * : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>Escherichia coli</i>	FVIGLIGERGREVTECA-----ESLKKSVNAACKVLVYATSDFSSVDRCAALMATT	233
<i>Bos taurus</i>	SVFAGVGERETREGNDLYHEMIESGVINLKDA--TSKVALVYQGMNEPPGARARVALTGLT	288
<i>Ostreococcus tauri</i>	SVFAGVGERETREGNDLYHEMIEGGVILKGDQASDSKCTLVYQGMNEPPGARARVGLTGLT	290
<i>Polytomella sp.</i>	SVFAGVGERETREGNDLYREMIESGVILKGAERNGSCTLVYQGMNEPPGARARVALTGLT	267
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	SVFAGVGERETREGNDLYREMIESGVILKDKRGSCTLVYQGMNEPPGARARVALTGLT	266
	* : * * * * * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>Escherichia coli</i>	VAEYFRDR-GKRVVLFIDSMTRYARALRDMKLAAGEPPARRGYPASVFDSPRLRLERPGP	292
<i>Bos taurus</i>	VAEYFRDQEGQDVLFDINIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMOERITP	348
<i>Ostreococcus tauri</i>	VAEYFRDQEGQDVLFDVFNIFRFTQANSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDLGGLQERITT	350
<i>Polytomella sp.</i>	VAEYFRDIEGQDVLFDVFNIFRFTQANSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDLGGLQERITT	327
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	VAEYFRDVEGQDVLFDVFNIFRFTQANSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDLGGLQERITT	326
	***** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>Escherichia coli</i>	TLKGSITFEYTVLLEGEDESPLGDEIRSLDGHIVLSRKLQAGQGHYPAIDVLKSVSRVF	352
<i>Bos taurus</i>	TKKGSITSVQAIYVPADLTPAPATTF AHLDTTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTRIM	408
<i>Ostreococcus tauri</i>	TKKGSITSVQAIYVPADLTPAPATTF AHLDTTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTRML	410
<i>Polytomella sp.</i>	TKKGSITSVQAVYVPADLTPGPATTF AHLDTTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTRMR	387
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	TKKGSITSVQAVYVPADLTPAPATTF AHLDTTVLSRSIAELGIYPAVDPLDSTRML	386
	* * * * * . : : . : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
<i>Escherichia coli</i>	GQVTD-EKHRDNAARVRKNTLTLEDLQVFDLGEYRAGQNAENDFAMNARPKLTNMLKQS	411
<i>Bos taurus</i>	DPNIVGSEHYDVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDE-LSEEDKLTVSARKIQRFLSQP	467
<i>Ostreococcus tauri</i>	SPLTLGDEHYNTARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDE-LSEEDKLTVSARKIQRFLSQP	469
<i>Polytomella sp.</i>	NPNVIGAEHYNARGVQKVLQDYKSLQDIIAILGMDE-LSEEDKLTVARARKIQRFLSQP	446
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NPNIIGAEHYNIARGVQKVLQDYKSLQDIIAILGMDE-LSEEDKLTVARARKIQRFLSQP	445
	: * : * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
<i>Escherichia coli</i>	VN-----EKMPSETLKELERIVK-----	430
<i>Bos taurus</i>	FQVAEVFTGHLGKLVPLKETIKGQQILAGEYDHLPEQAFYVVGPIEEAVAKADKLAEEH	527
<i>Ostreococcus tauri</i>	FHVAEVFTGSPGKYVDLKDITISGFKGLISGNYDDLPEMAFYVVGDMNEAISKADELAKQV	529
<i>Polytomella sp.</i>	FQVAEVFTGTPGKYVDLKDITISGFQGLTKGYDDLPEMAFYVVGDIKEVKEKADKMAKDI	506
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	FQVAEVFTGTPGKYVDLKDITISAFGLQGGYDDLPEMAFYVVGDIHEVVEKADKLAQDV	505
	. . : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>Escherichia coli</i>	-----	430
<i>Bos taurus</i>	S-----	528
<i>Ostreococcus tauri</i>	A-----	530
<i>Polytomella sp.</i>	ASRKEAD-NKKVSEELKDIPSLDKLVSEIKEVVIEEDDGLLEEDFKAEALSSETVVLNEEG	565
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AARKDESKAKSSEALKDVPKLEKMGAGEIKDEVIDADDSLEEDFKAEALSSENNMVLNEKG	565
<i>Escherichia coli</i>	-----	430
<i>Bos taurus</i>	-----	528
<i>Ostreococcus tauri</i>	-----	530
<i>Polytomella sp.</i>	KSVPLPKRN	574
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EKVPLPKR-	573

**Figura 7.** Alineamiento múltiple de la secuencia de la subunidad β de la ATP sintasa de diferentes organismos. Se alinearon secuencias de *Escherichia coli*, *Bos taurus* y de las algas *Ostreococcus tauri*, *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando MUSCLE (59). Se puede observar la extensión presente en *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* a partir del residuo 506.

Durante muchos años se supuso que la ATP sintasa y otros complejos generadores de energía se encontraban distribuidos de manera aleatoria en la membrana interna; sin embargo, ensayos hechos por microscopía electrónica de fractura por congelación revelaron la existencia de filas de complejos macromoleculares en las crestas tubulares del organismo unicelular *Paramecium* (60). Veinte años después se comprobó que el componente principal de éstas eran dímeros del complejo V que se encuentran además en todas las especies que se han investigado, usualmente en la parte más curvada en los ápices de las crestas (61, 62). Al comparar imágenes obtenidas promediando subtomogramas, se ha establecido que los dímeros de hongos y mamíferos no presentan diferencias en comparación con los de plantas, algas y protistas cuyo ángulo es más pronunciado con respecto al estator (figura 8).



**Figura 8.** Estructura de la ATP sintasa en mitocondrias de siete especies diferentes. El panel superior muestra cortes obtenidos de volúmenes tridimensionales de crio-tomografía electrónica, los insertos muestran vistas laterales de los dímeros en la membrana y las flechas amarillas señalan al sector F<sub>1</sub> de cada dímero. El panel inferior muestra representaciones obtenidas a partir de los promedios de los subtomogramas. Escala=50 nm. Modificado de Kuhlbrandt *et al.* (8)

Aunque la forma dimérica se ha encontrado en diferentes especies y podría ser la especie preponderante *in vivo* (63), al purificar el complejo V de varias fuentes, incluida la de mamíferos, hongos y plantas superiores, éste migra como un monómero de 550–600 kDa en electroforesis en geles de poliacrilamida nativos azules (BN-PAGE) (64). Aunado a esto, se ha visto que la enzima se disocia parcialmente con la concomitante aparición de un sector F<sub>1</sub> libre (15, 58). En amplio contraste, el Complejo V de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp.* migra en BN-PAGE como un dímero altamente estable de 1,600 kDa (51, 57, 65).

En dos estudios independientes de microscopía electrónica se obtuvieron las estructuras de dos ATP sintasas diméricas; la de bovino (66), que presenta asociaciones entre los monómeros a nivel de los sectores  $F_1$  y  $F_0$ , con mayor cercanía en la interfase  $F_0$ - $F_0$ , y un ángulo de aproximadamente  $40^\circ$ . Por su parte, la estructura dimérica de *Polytomella* sp. presenta dos brazos periféricos robustos que protruyen desde la membrana hasta la región donde se localizan las porciones  $F_1$  formando un ángulo de casi  $70^\circ$  (65). En conjunto, estos estudios sugieren que existen grandes diferencias estructurales entre ambas ATP sintasas, aún cuando las dos son diméricas.

### **Composición polipeptídica de la ATP Sintasa en *Chlamydomonas* y *Polytomella* sp.**

Cuando se llevó a cabo el análisis de la composición polipeptídica de la ATP sintasa de *C. reinhardtii*, se identificaron ocho polipéptidos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $a$  (ATP6),  $c$  (ATP9) y OSCP, pero no se encontraron homólogos para las subunidades  $\epsilon$ ,  $b$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$ ,  $g$ , IF1, A6L y F6 (Tablas 2 y 3) (fig.9). Los otros siete polipéptidos, nombrados Asa1 (por las siglas en inglés **ATP Synthase Associated protein**), Asa2, Asa3, Asa4, Asa5, Asa6 y Asa7, presentes en *C. reinhardtii* no tienen contrapartes en otras enzimas de plantas y animales (Ver Tablas 1 y 3), lo cual sugiere que hay proteínas asociadas a las ATP sintasas mitocondriales en las algas clorofíceas que son atípicas (67). Posteriormente se demostró que la composición de las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. es similar a la de *C. reinhardtii* y que existen dos polipéptidos adicionales, Asa8 y Asa9 (figura 9).

Se sabe también que todas estas características dan lugar a un dímero altamente estable en la ATP sintasa de estas algas y que son los polipéptidos Asa los que dan lugar a las diferencias que se aprecian al comparar las estructuras obtenidas por Dudkina et. al., (65).y Minauro-Sanmiguel (66).

Se ha demostrado que algunos de los componentes canónicos del estator están ausentes en las algas clorofíceas y que probablemente las porciones  $F_0$  están unidas a través de sus subunidades  $a$  por el subcomplejo [Asa1/Asa3/Asa5/Asa8], en tanto que los brazos que protruyen están formados por dos subcomplejos de [Asa2/Asa4/Asa7/OSCP] que a su vez forman al estator que estabiliza a los sectores  $F_1$  (68, 69).

Segmento	Función	Subunidad	<i>Polytomella sp.</i>
F <sub>1</sub>	Estator $\bar{f}_1$	$\alpha$	✓
		$\beta$	✓
	Rotor	$\gamma$	✓
		OSCP	✓
		$\delta$	✓
F <sub>0</sub>	Estator periférico	$\epsilon$	✓
		c	✓
		b	
		h	ASA 1, ASA 2,
		d	ASA 4, ASA 7
	Estator membrana	f	
		a	ASA 1, ASA 3,
		A6L	ASA 5, ASA 8,
		i/j	ASA 9
		e	
Dimerización	g	ASA 6	
	k		
Regulación	IF <sub>1</sub>	?	

Subunidad	Masas moleculares
ASA 1	60.6 kDa
$\beta$	59.1 kDa
$\alpha$	56.8 kDa
ASA 2	45.5 kDa
ASA 3	36.3 kDa
ASA 4	31.2 kDa
$\gamma$	30.8 kDa
a	24.6 kDa
OSCP	22.6 kDa
$\delta$	8.3 kDa
ASA 7	19.5 kDa
ASA 5	14.3 kDa
ASA 6	13.3 kDa
ASA 8	10.0 kDa
ASA 9	9.5 kDa
$\epsilon$	8.3 kDa
c	7.3 kDa

**Figura 9 y Tablas 2 y 3.** Estructura y composición polipeptídica de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* **Tabla 2.** Se muestra el nombre de la subunidad así como la función que cumple dentro del complejo y el sector (F<sub>1</sub> o F<sub>0</sub>) al que pertenece, la palomita representa una subunidad que está presente en el complejo V del alga. Se ha propuesto que las subunidades ASA 1 a ASA 9 se encuentran localizadas en la porción correspondiente al estator periférico o al estator de membrana (68, 69). **Tabla 3.** Subunidades que componen a la ATP Sintasa de *Polytomella sp.* y sus pesos moleculares en kDa, se indica a qué banda en el gel de la figura 7 corresponde cada una. **Figura 8.** Se muestra el patrón electroforético en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) al 14%, teñido con azul de Commassie de una muestra de ATP sintasa de *Polytomella sp.* purificada, como se indica en materiales y métodos.

### Actividad de hidrólisis de ATP sintasa de *Polytomella sp.*

La F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP sintasa de *Polytomella sp.* presenta de manera basal una actividad hidrolítica sumamente baja, comparada con la de otras ATPasas puras (Sector F<sub>1</sub>); ATPasa mitocondrial de corazón de bovino: 70  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ , ATPasa mitocondrial de hígado de rata: 28  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$  (70), ATPasa de cloroplasto de espinaca: 7.45  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$  (71), ATPasa de levadura 63  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$  (Shatz et al., 1967). La actividad de la enzima dimérica (F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>) del alga es muy baja [0.06  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ ] comparada con la del monómero (F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>) [0.17  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ ] y con la F<sub>1</sub> [0.25  $\mu\text{molas} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ ]. La actividad basal de hidrólisis de la (F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>) ATPasa dimérica se incrementa al adicionar varios detergentes (lauril maltósido, Tween 20, Tween 80, Tritón X110, Tritón X114, dodecanoil sacarosa y monodecil éter de octaetilen glicol).

En particular, la presencia del detergente no iónico lauril maltósido en el ensayo aumenta la actividad más de 50 veces. Este efecto activador del lauril maltósido no se debe a la disociación de la enzima, ya que ésta mantiene su integridad en BN-PAGE y su sensibilidad a oligomicina en ensayos enzimáticos (72); por lo que el efecto del detergente podría estar asociado a la relajación de la estructura y/o la liberación de los extremos carboxilo terminal de las subunidades  $\beta$ , o a la liberación de un inhibidor aun no identificado.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

&

## OBJETIVOS

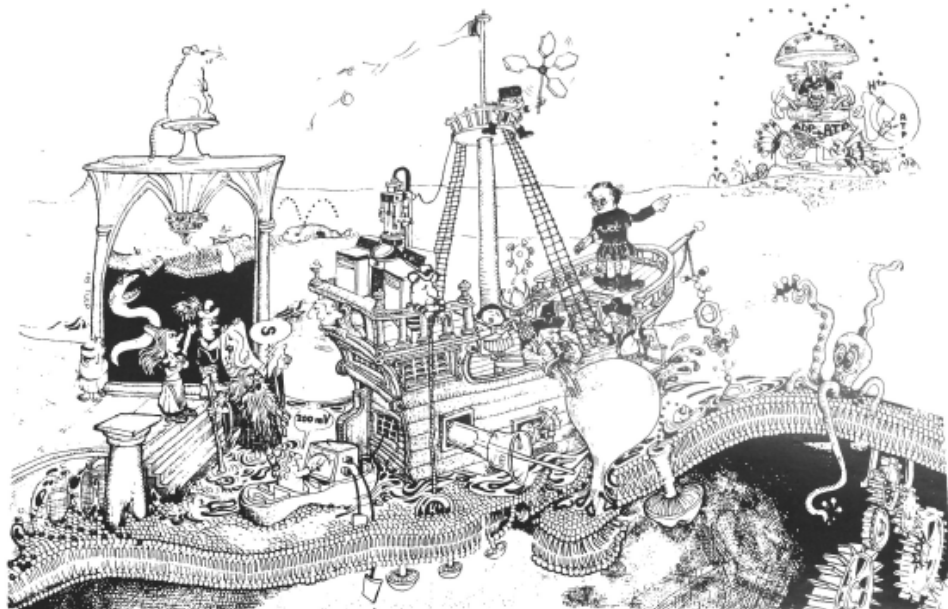


Figura B. (1)



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mediante el uso de diversas técnicas como el empleo de agentes entrecruzadores, la formación de subcomplejos por presión y temperatura y ensayos de interacción, purificación, co-inmuno precipitación y Far-western se ha propuesto un modelo de la topología de la ATP sintasa de *Polytomella* sp (68) y se sabe que las subunidades ASA se encuentran conformando al brazo periférico e intervienen en la formación del dímero (69). Estudios comparativos con otras algas han mostrado que estas subunidades sólo están presentes en el linaje de las algas clorofíceas (30, 73) .

Se ha establecido que la ATP sintasa en *Polytomella* sp., es un complejo dimérico muy estable con una masa molecular de 1,600 kDa. La enzima posee las subunidades canónicas de los sectores  $F_1$  y  $F_0$  pero carece de todas las subunidades que conforman al brazo periférico así como aquellas encargadas de la oligomerización y de la regulación. No se ha estudiado si la estructura oligomérica del complejo le brinda características cinéticas diferentes al resto de los complejos ATP sintasa mitocondriales ya que las actividades de hidrólisis y de síntesis de ATP de esta enzima no se han caracterizado.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar la actividad hidrolítica (actividad ATPasa) de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. De manera particular se evaluará el efecto de surfactantes (detergentes no iónicos) y proteasas sobre dicha actividad y se explorarán posibles mecanismos regulatorios de la actividad enzimática.

### Objetivos particulares

Profundizar en el estudio de la actividad de ATPasa de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa del alga incolora *Polytomella* sp., llevando a cabo experimentos de cinética enzimática.

Obtener las constantes  $V_{max}$  y  $K_m$  para la enzima dimérica y el sector  $F_1$  tanto para la síntesis como para la hidrólisis de Mg-ATP.

Estudiar el posible mecanismo a través del cual se activa la enzima en presencia de detergentes no-iónicos.

Caracterizar la actividad de síntesis de ATP en un sistema de partículas submitocondriales o bien en un sistema reconstituido, incorporando el complejo a membranas modelo como liposomas.

Identificar el (los) polipéptido(s) responsable(s) de la regulación de la actividad ATPasa de la enzima.

Establecer si existe o no una posible participación de la extensión N-terminal de las subunidades  $\beta$  en la baja actividad de hidrólisis de la enzima.

## RESULTADOS

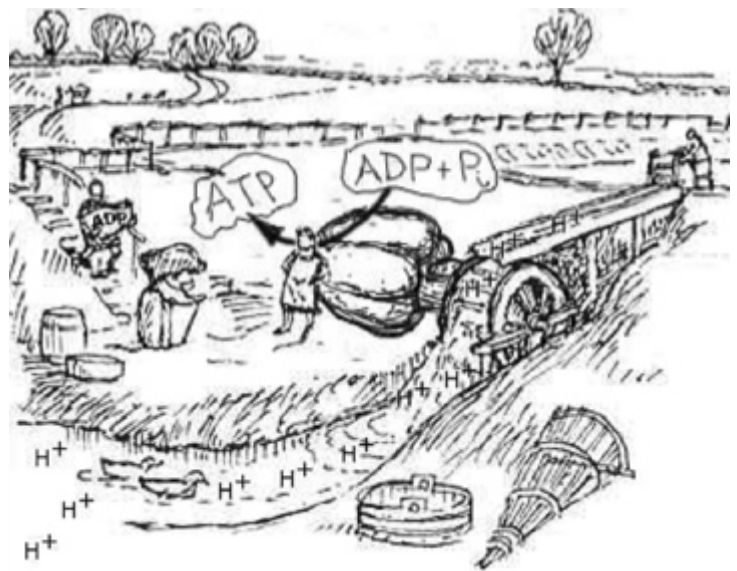


Figura C. (1)

## HIDRÓLISIS DE ATP

Para evaluar la actividad hidrolítica de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. se llevaron a cabo ensayos de actividad con dos protocolos; el sistema acoplado de piruvato cinasa - deshidrogenasa láctica (PK/LDH) (método de Pullman) (74) y el método colorimétrico de Chifflet (75) modificado por González-Romo (76), descritos en la sección de Métodos.

### PRUEBAS PARA ESTANDARIZAR LAS CONDICIONES DEL ENSAYO POR EL MÉTODO DE PULLMAN

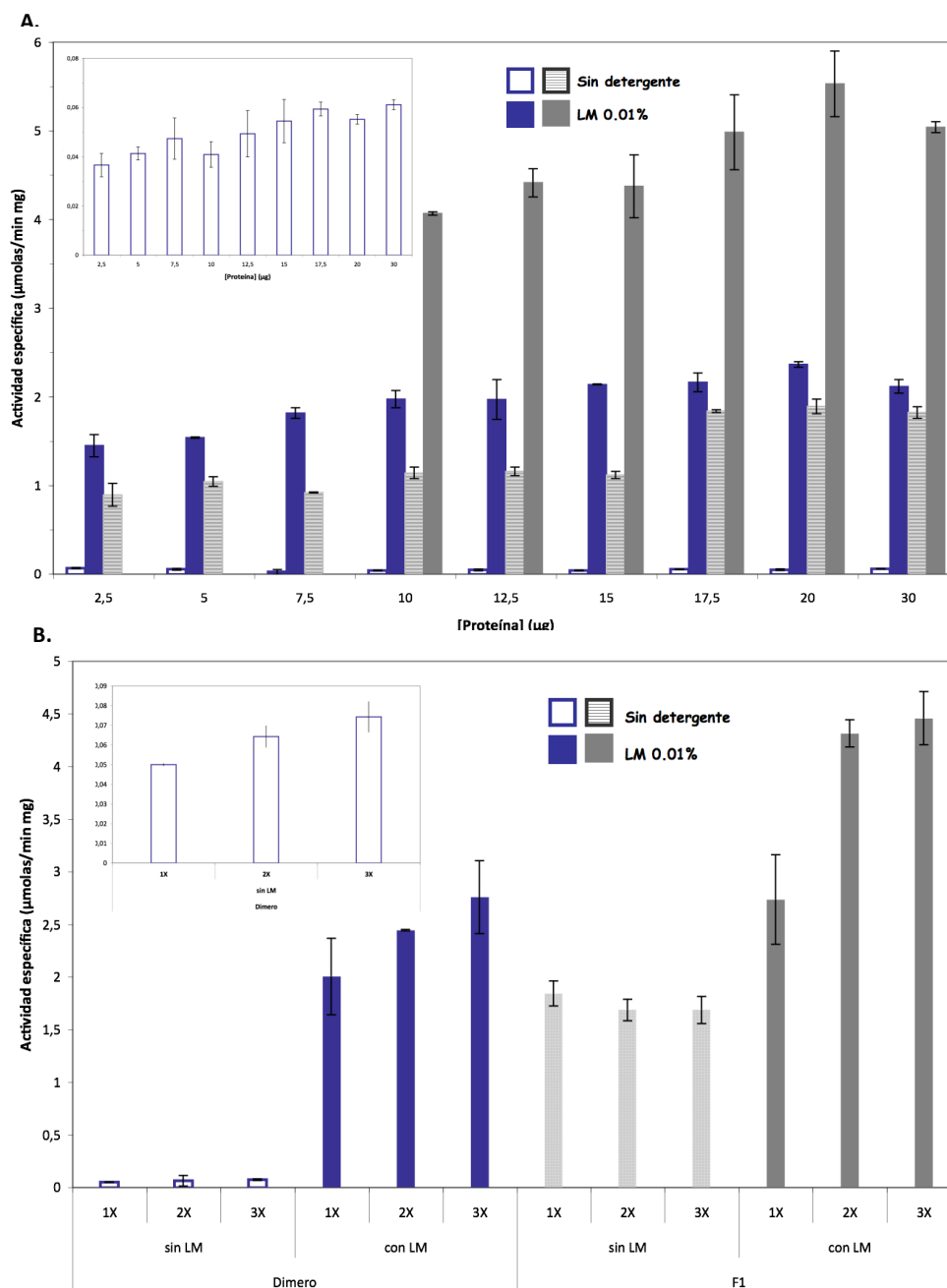
#### Curva de concentración de proteína

Para determinar la concentración óptima de proteína, para los ensayos posteriores, tanto de la ATP sintasa dimérica como del sector  $F_1$ , se realizó una curva de actividad de hidrólisis de ATP de diferentes concentraciones de proteína. En la purificación se obtiene a la enzima dimérica (Ver apéndice 1), por lo que no se requiere mayor tratamiento de la enzima para realizar el ensayo. El sector  $F_1$  se obtuvo calentando a la enzima dimérica a 60°C por un periodo de 2 minutos; en estas condiciones la enzima se disocia liberando al sector  $F_1$  y a las subunidades individuales (30). El ensayo se realizó con concentraciones crecientes de proteína (2.5 a 30  $\mu\text{g}$ ). En la figura 10A, se muestra la actividad específica obtenida para estas dos formas de la enzima, en ausencia y presencia del detergente no iónico lauril maltósido. Se observa que la actividad específica se incrementó de manera lineal con la concentración de proteína; en el caso de la actividad específica para las concentraciones de 2.5  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  y 7.5  $\mu\text{g}$  del sector  $F_1$ , ésta no pudo determinarse debido a que en el trazo se apreciaba una pendiente multifásica, lo cual puede indicar histéresis en la enzima a bajas concentraciones.

#### Concentración de enzimas acoplantes

Se probaron 3 concentraciones de las enzimas acoplantes, PK y DHL: iniciando con 3U de PK y 4.5U de DHL (1X); se exploró si duplicando y triplicando ésta concentración (6U PK/9U DHL) y (9U PK/13.5U DHL) se apreciaba un incremento en la actividad específica. En el ensayo se probaron tanto la enzima dimérica como al sector  $F_1$  en ausencia y presencia de 0.01% de lauril maltósido. En la figura 10B, se muestran los resultados obtenidos en estas tres condiciones para ambas formas de la enzima.

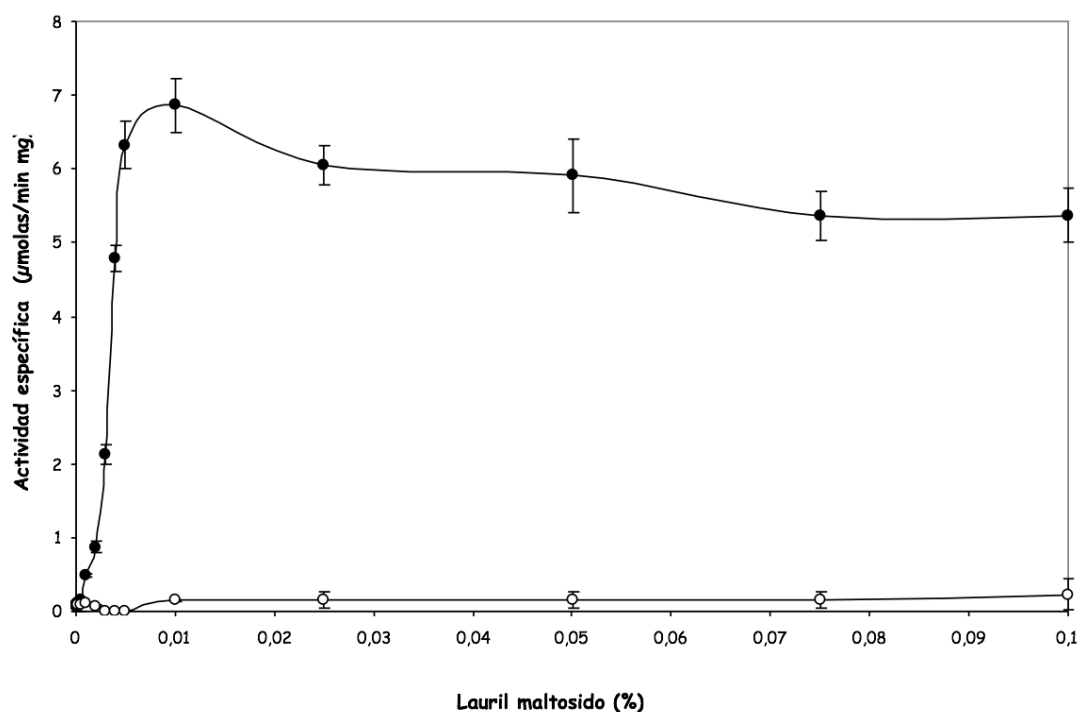
Se decidió realizar los ensayos subsecuentes con 20  $\mu\text{g}$  de enzima, tanto dimérica como de sector  $F_1$  y con la concentración 2X de las enzimas acoplantes PK y LDH, dado que se observó que no había una diferencia significativa entre las concentraciones 2X y 3X.



**Figura 10.** Estandarización de la concentración de ATP sintasa y de enzimas acoplantes. **A.** Curva de actividad de hidrólisis de ATP con concentraciones crecientes de enzima dimerica (barras azules) y sector  $F_1$  (barras grises). El ensayo se realizó sin detergente (barras vacías) y en presencia de 0.01% de lauril maltósido (barras rellenas). **B.** Curva de actividad de hidrólisis de ATP con 3 concentraciones de enzimas acoplantes piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa (PK/LDH), se ensayaron la enzima dimerica (barras azules) y sector  $F_1$  (barras grises). El ensayo se realizó sin detergente (barras vacías) y en presencia de 0.01% de lauril maltósido (barras rellenas). En ambos paneles el inserto muestra un acercamiento a las barras correspondientes al ensayo realizado con la enzima dimerica en ausencia de detergente.

### Curva de concentración de lauril maltósido

Para determinar la concentración óptima de lauril maltósido que se utilizará en ensayos posteriores se realizó una curva de concentración del detergente, determinando la actividad de hidrólisis de ATP mediante el método de Pullman. Para llevar a cabo el ensayo se utilizó enzima dimérica y se ensayó en concentraciones crecientes de lauril maltósido desde 0.0001 hasta 0.1 %. En la figura 11 se muestra la actividad específica obtenida para la enzima en ausencia y presencia de oligomicina. Se observa que la actividad específica se incrementó de manera lineal en el intervalo de 0.001 a 0.005 % y alcanza un máximo que se mantiene de 0.01 hasta 0.1 %, congruente con la CMC del lauril maltósido que es 0.08%. En todas las concentraciones evaluadas se mantuvo la sensibilidad a oligomicina, lo que es indicativo de que la enzima no se disocia durante los ensayos, al menos en el intervalo evaluado.



**Figura 11.** Curva de concentración de lauril maltósido. Curva de actividad de hidrólisis de ATP con concentraciones crecientes del detergente en ausencia (círculos negros) y presencia de oligomicina (círculos vacíos). El ensayo se realizó adicionando el detergente en la celda y comenzando la reacción con la enzima dimérica.

## EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP

### Oligomicina

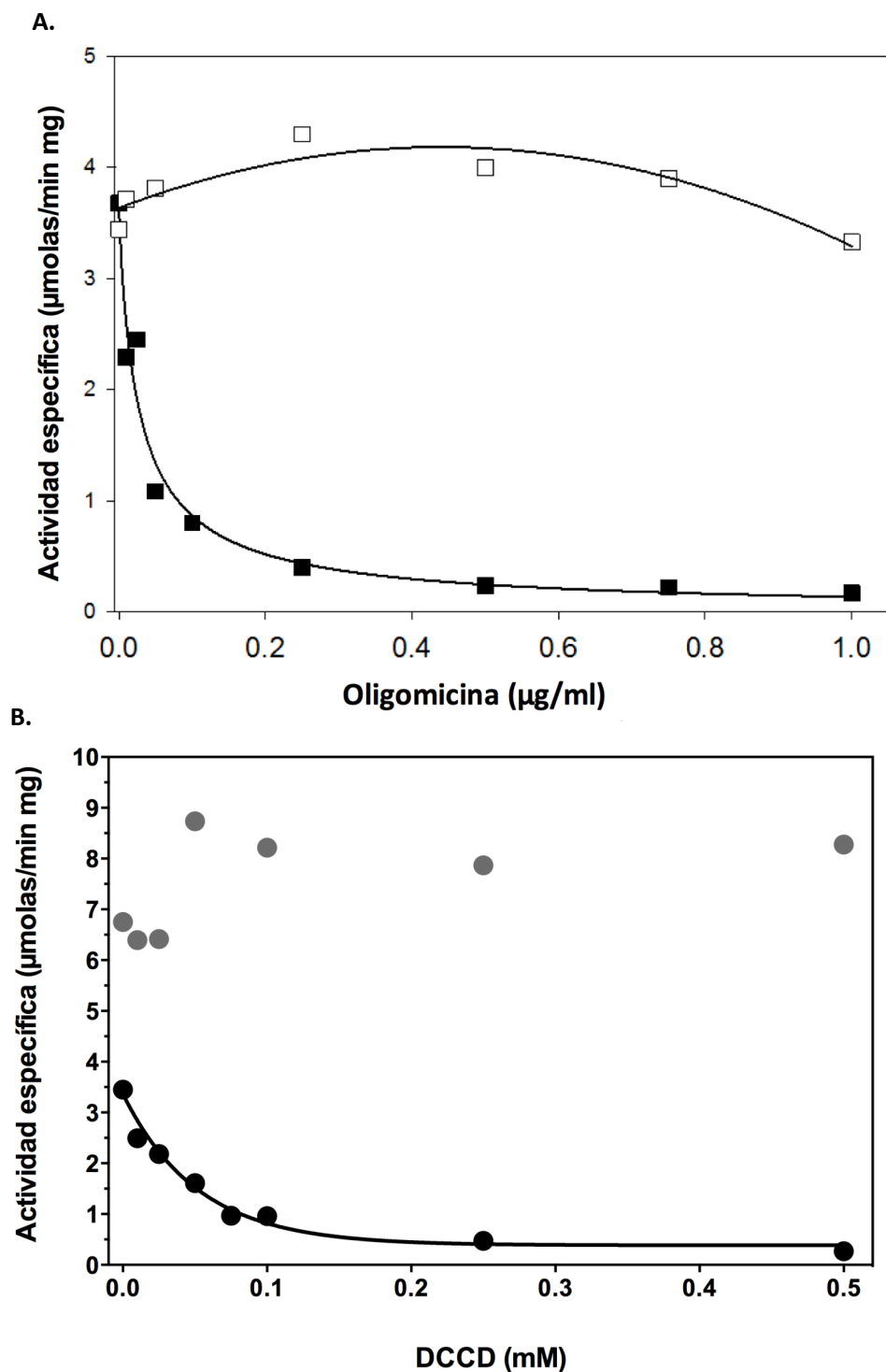
La oligomicina ha sido reconocida como un potente inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial desde 1958 con los reportes de Lardy *et al.* (77). Esta molécula es un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces* que actúa bloqueando la translocación de los protones cuando se une en la interface entre la subunidad *a* y y el anillo de subunidades *c*, en el canal de acceso que se encuentra en el sector  $F_0$  (78). La oligomicina es un indicador de la integridad estructural del complejo V ya que la actividad de ATPasa del sector  $F_1$  es insensible al inhibidor.

Se determinó previamente que la concentración  $I_{50}$  para la ATP sintasa de *Polytomella sp.* es de  $0.05 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  (72). De manera general para realizar los ensayos de inhibición con oligomicina es suficiente incubar a la enzima en presencia del inhibidor y medir posteriormente la actividad residual. Para la enzima dimérica del alga se realizó el ensayo en dos condiciones: preincubando a la enzima con concentraciones crecientes (0 a  $1 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) del inhibidor y adicionando la misma concentración de oligomicina en la celda o adicionando sólo el solvente DMSO (fig. 12A).

Cuando la enzima se preincubó con el inhibidor y se midió la actividad residual, se observó una inhibición muy pequeña de la enzima dimérica, en comparación de la enzima que se preincubó y se ensayó en presencia de la misma concentración de oligomicina, en donde se observó una inhibición completa. La  $K_i$  determinada para la oligomicina fue de  $28 \text{ nM}$ . Lo anterior indica que para observar una inhibición completa de la ATPasa de *Polytomella sp.* es necesario pre-incubar a la enzima y mantener la concentración del inhibidor en el medio de reacción, lo que indica que la oligomicina actúa como un inhibidor que no parece estar fuertemente unido dado que la dilución es suficiente para revertir la inhibición.

### DCCD

La N,N-diciclohexil-carbodiimida (DCCD) es un compuesto orgánico que actúa sobre la ATP sintasa de bacterias y eucariontes. Previene la translocación de los protones al reaccionar de manera covalente con el grupo carboxilo de un residuo de aspártico presente en las subunidades *c* del sector  $F_0$  (79) (fig. 14). Para evaluar el efecto del DCCD sobre la hidrólisis de ATP se incubaron tanto a la enzima dimérica como al sector  $F_1$  en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor ( $10 \mu\text{M}$  a  $2 \text{ mM}$ ) disuelto en etanol, con lauril maltósido en la celda (0.01% final) y en los controles se adicionó etanol. La preincubación de la ATP sintasa dimérica de *Polytomella sp.* con DCCD fue suficiente para que se observara una inhibición completa de la hidrólisis de ATP. Al igual que con la oligomicina, el sector  $F_1$  es insensible al DCCD (fig 12B).

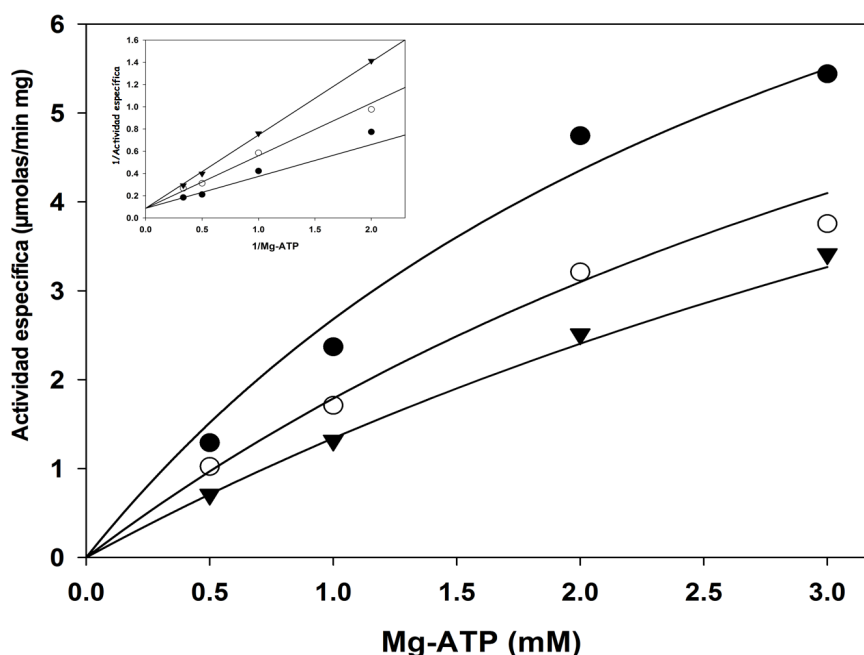


**Figura 12.** Efecto de la oligomicina y el DCCD sobre la ATP sintasa de *Polytomella* sp. **A.** Para medir el efecto de la oligomicina sobre la ATPasa dimérica se preincubó a la enzima con la concentración indicada del inhibidor por al menos 30 minutos en hielo y posteriormente se probaron dos condiciones; en una se mantuvo la misma concentración de inhibidor en la celda (cuadros rellenos) y en otra solo se adicionó el solvente (DMSO) (cuadros vacíos), todos los ensayos se hicieron con lauril maltósido a una concentración final de 0.01%. **B** Para medir el efecto del DCCD sobre la ATPasa dimérica (círculos negros) y sobre el sector  $F_1$  (círculos grises), se preincubaron ambas preparaciones con la concentración indicada del inhibidor por al menos 30 minutos en hielo y posteriormente se determinó la actividad residual en presencia de lauril maltósido a una concentración final de 0.01%. Los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado.



## Mg-ADP

El ADP es al mismo tiempo sustrato e inhibidor en la reacción de síntesis de ATP por el complejo V; la preincubación de la enzima con ADP y  $Mg^{2+}$  da como resultado una inhibición histerética (80-82) que surge cuando el  $Mg^{2+}$  que está presente en el medio se combina, en ausencia de  $P_i$ , con el ADP que está unido de manera uni-sitio al sector  $F_1$ . Esta inhibición es lenta (segundos a minutos) y puede ser revertida parcialmente por la adición de ATP en ausencia de  $Mg^{++}$ . La recuperación de la actividad de hidrólisis por la enzima requiere la unión de ATP en un sitio no catalítico. Esta inhibición puede darse en el sitio catalítico como inhibición por producto durante la hidrólisis de ATP (83). Esta inhibición se presenta en las ATPasas de origen mitocondrial (84, 85), cloroplastídica (86, 87) y bacteriana (88, 89). La figura 13 muestra el efecto de 0.5 mM y 1 mM de Mg-ADP sobre la hidrólisis de Mg-ATP; los datos se ajustaron a los modelos competitivo y no competitivo utilizando el programa DynaFit (90) y se observó que el modelo competitivo prevalecía sobre el no competitivo con un análisis de Akaike de 0.9 competitivo versus 0.09 no competitivo, lo que indica que el ADP actúa como un inhibidor competitivo, como se había reportado previamente para otras ATPasas.

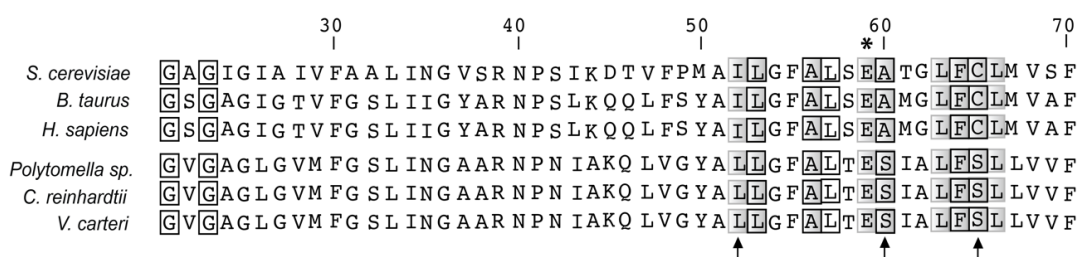


**Figura 13.** Efecto del ADP en la hidrólisis de ATP de la ATPasa dimérica. Se evaluó la hidrólisis de Mg-ATP a 25 °C, utilizando el método colorimétrico de Chifflet, el medio contenía lauril maltósido (LM) a una concentración final de 0.01 %. Se evaluaron tres concentraciones de Mg-ADP: 0 mM (círculos llenos); 0.5 mM (círculos vacíos) y 1 mM (triángulos invertidos). La hidrólisis se dejó proceder por 50 minutos antes de detener la reacción. El inserto muestra el gráfico de doble recíproco de los datos en el panel principal. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con duplicados.

## ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE LA SUBUNIDAD c

Se ha reportado que el sitio de unión de la oligomicina se encuentra en la interface entre el anillo c y la subunidad a y que el antibiótico actúa previniendo la translocación de los protones ya que su unión bloquea el acceso a un grupo carboxilo esencial para el proceso. Los residuos que componen el sitio de unión de la oligomicina constituyen un motivo en común de unión para otros compuestos, entre ellos la osamicina y la venturicidina (78).

Con la finalidad de identificar si estos residuos se encuentran en la secuencia de la subunidad c de *Polytomella sp.* y *C. reinhardtii*, se llevó a cabo un alineamiento múltiple a partir de la secuencia de la subunidad c de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus*, *Homo sapiens* y las algas *Polytomella sp.*, *C. reinhardtii* y *Volvox carteri* utilizando el programa MUSCLE (figura 14). Se observó que los residuos que componen al sitio de unión del inhibidor están conservados en *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus* y *Homo sapiens*. Sin embargo, en las algas *Polytomella sp.*, *C. reinhardtii* y *Volvox carteri*, se encontraron las mutaciones puntuales Ala61Pro, Ala61Met y Cys65Ser; en contraste, el residuo que reacciona con el DCCD (Glu59) está conservado en todos los organismos evaluados.



**Figura 14.** Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad c de la ATP sintasa. Se alinearon secuencias de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus*, *Homo sapiens* y las algas *Polytomella sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Volvox carteri* utilizando el programa MUSCLE, se muestra sólo el carboxilo terminal que es la porción de la subunidad donde se localiza el sitio en común de oligomicina, osamicina y venturicidina. Los residuos importantes para la unión de oligomicina se destacan en gris, aquellos residuos que al ser mutados confieren resistencia al inhibidor están señalados por un recuadro negro. Las flechas señalan las posiciones que no están conservadas en las algas y el asterisco muestra al residuo de glutámico al que se unen los protones y con el que reacciona el inhibidor DCCD.

### CURVAS DE SATURACIÓN DE Mg-ATP

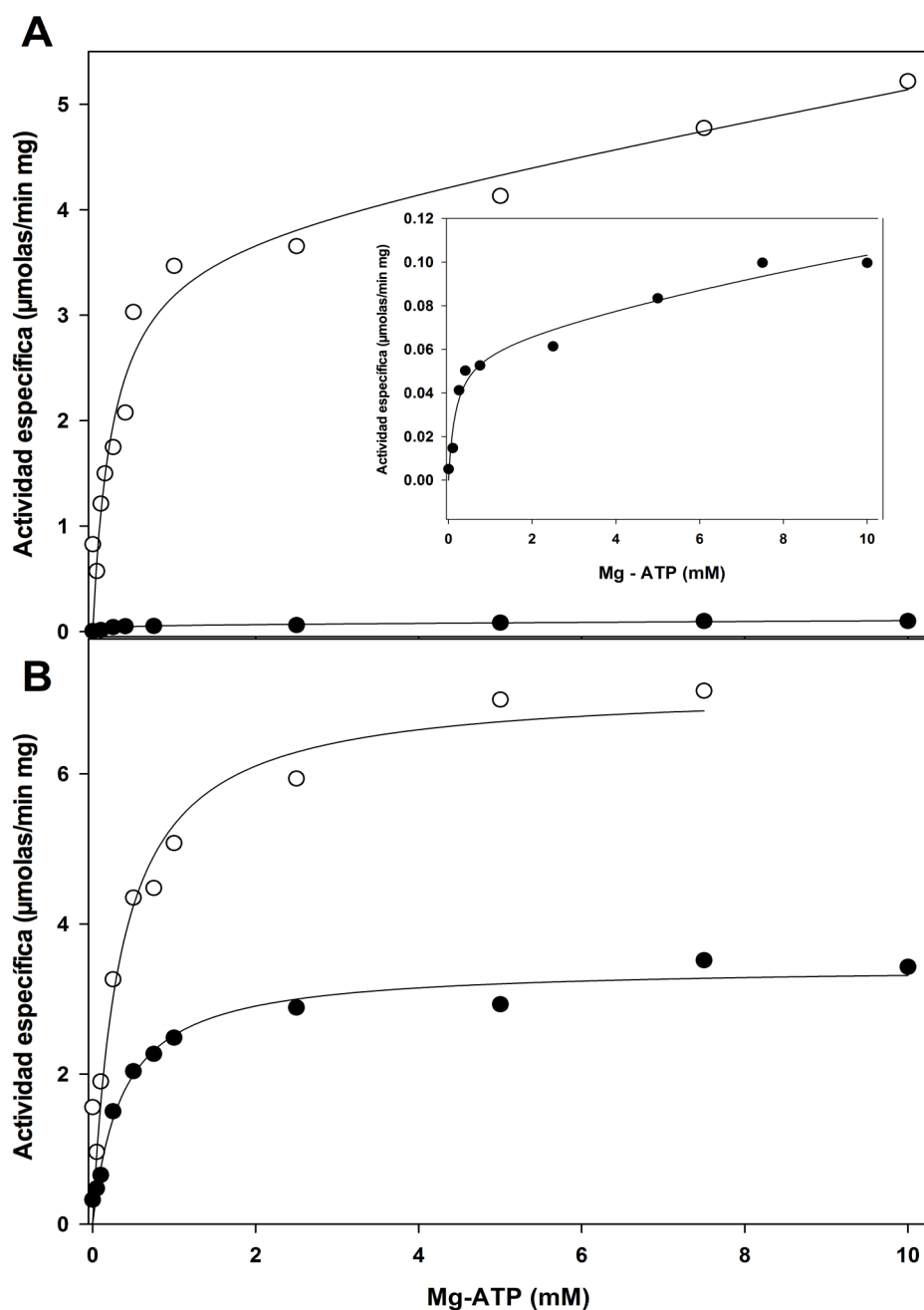
Para determinar las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  de la enzima dimérica y del sector  $F_1$ , se realizaron ensayos de saturación con el sustrato Mg-ATP. En la figura 15 se muestran los datos que se obtuvieron para ambas preparaciones en ausencia o presencia del detergente no iónico lauril maltósido al 0.01%.

La actividad específica reportada corresponde a la actividad sensible a oligomicina ya que para todos los trazos se realizó un control con oligomicina a una concentración de  $5 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ . Para la ATP sintasa dimérica los datos se ajustaron inicialmente a la ecuación de Michaelis-Menten y a un modelo de cooperatividad pero el mejor ajuste fue con la ecuación  $V_1 = (V_{max}[S]/K_m + [S]) + a[S]$ , en la que el término  $(a[S])$  corresponde a un componente de difusión. Los datos correspondientes a la hidrólisis de Mg-ATP por el sector  $F_1$  en presencia y ausencia de detergente se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten.

El análisis cinético mostró que la  $F_1$ - $F_0$  ATP sintasa dimérica en ausencia de detergente presenta una  $V_{max}$  de  $0.065 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y una  $K_m$  por Mg-ATP de  $0.19 \text{ mM}$ , en comparación con el dímero en presencia de detergente cuya  $V_{max}$  es de  $3.77 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y una  $K_m$  por Mg-ATP de  $0.24 \text{ mM}$ . Esto implica que en presencia del detergente la  $V_{max}$  del dímero se incrementa 60 veces. En ambos casos los valores corresponden al componente de alta afinidad. El sector  $F_1$  en ausencia de detergente presenta una  $V_{max}$  de  $3.4 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y una  $K_m$  por Mg-ATP de  $0.36 \text{ mM}$ , si el ensayo se realiza en presencia de detergente la  $V_{max}$  del sector  $F_1$  es de  $7.15 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y una  $K_m$  por Mg-ATP de  $0.34 \text{ mM}$ , esto implica que en presencia del detergente la  $V_{max}$  del sector  $F_1$  se duplica. En la tabla 4 se pueden ver las constantes  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  para la enzima dimérica y para el sector  $F_1$ .

Enzima	Lauril Maltosido 0.01%	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$K_m$ (M)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Dímero $F_1 - F_0$	-	$0.065 \pm 0.009$	$(1.9 \pm 0.08) \times 10^{-4}$	0.043	$0.228 \times 10^3$
	+	$3.77 \pm 0.49$	$(2.4 \pm 0.8) \times 10^{-4}$	2.52	$10.47 \times 10^3$
$F_1$	-	$3.40 \pm 0.113$	$(3.6 \pm 0.52) \times 10^{-4}$	1.145	$3.18 \times 10^3$
	+	$7.15 \pm 0.456$	$(3.4 \pm 0.88) \times 10^{-4}$	2.385	$7.01 \times 10^3$

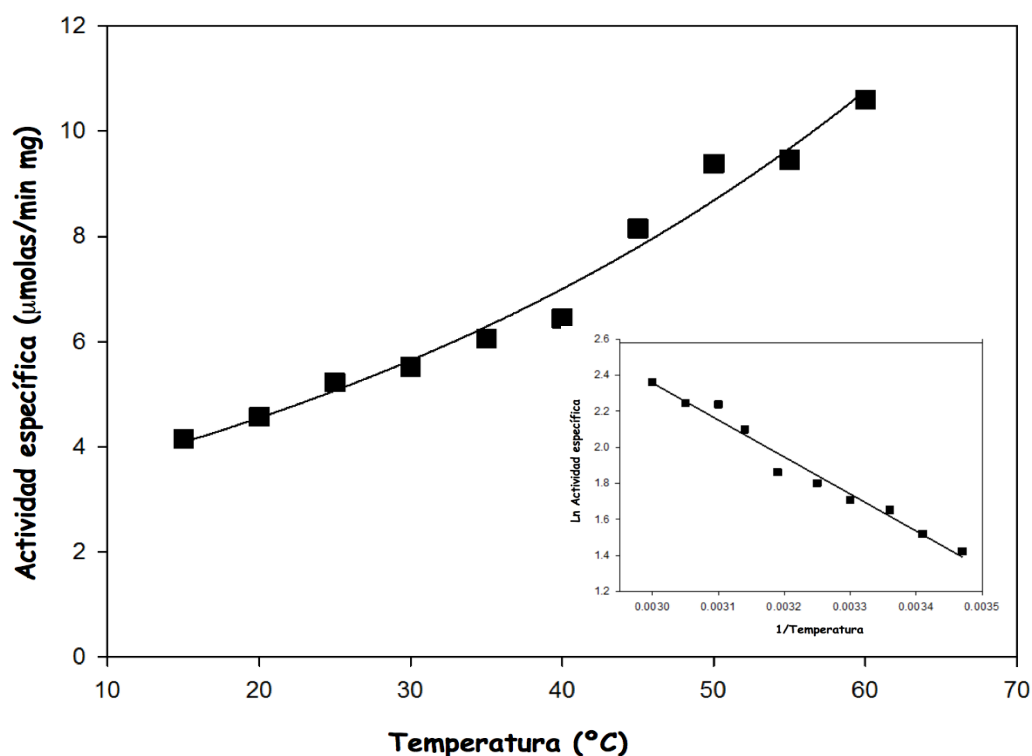
**Tabla 4.** Constantes cinéticas para la ATP sintasa dimérica y el sector  $F_1$ . Los parámetros se calcularon mediante el ajuste de los datos a diferentes ecuaciones. La enzima dimérica se ajustó a la siguiente ecuación:  $V_1 = (V_{max}[S]/K_m + [S]) + a[S]$ , donde el término  $(a[S])$  corresponde a un componente de difusión y el sector  $F_1$  se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores de  $k_{cat}$  están dados por sitio activo y se calcularon utilizando una masa molecular estimada de  $1,600 \text{ kDa}$  para la enzima dimérica y  $400 \text{ kDa}$  para la porción  $F_1$ .



**Figura 15.** Curva de saturación de Mg-ATP. Se determinó la actividad de hidrólisis de Mg-ATP de la ATP sintasa dimerica (**A**) y del sector  $F_1$  (**B**) a 25 °C. **A.** La ATPasa dimerica fue ensayada en presencia (círculos vacíos) o ausencia (círculos rellenos) del detergente lauril maltósido a una concentración final de 0.01%. El inserto en el panel A corresponde a un acercamiento de la actividad del dímero en ausencia del detergente con una escala ampliada. La actividad específica reportada corresponde a la actividad sensible a oligomicina. Los datos se ajustaron a la ecuación  $V_1 = (V_{\max}[S]/K_m + [S]) + a[S]$ , en la que el término  $(a[S])$  corresponde a un componente de difusión **B.** El sector  $F_1$  se obtuvo calentando la enzima dimerica por 2 minutos a 60 °C, los círculos vacíos corresponden al ensayo en presencia del detergente y los círculos rellenos en ausencia del detergente. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten.

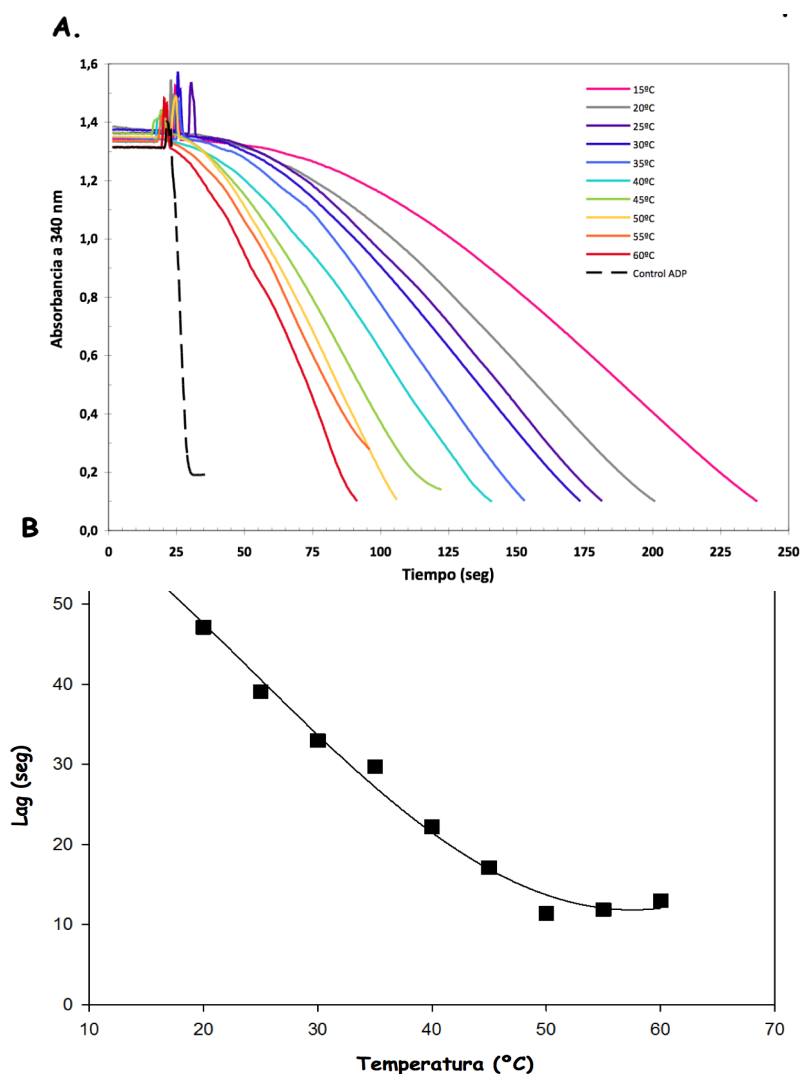
## EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP DE LA ENZIMA DIMÉRICA

Se evaluó la hidrólisis de ATP de la enzima dimérica en un intervalo de temperatura de 15 °C hasta 60 °C en presencia de detergente a una concentración final de 0.01%. El experimento se realizó controlando la temperatura del medio del ensayo y del espectrofotómetro, utilizando un baño de temperatura regulada. En la figura 16 se puede observar que la enzima dimérica permaneció activa en todo el intervalo de temperatura que se ensayó y que la hidrólisis de ATP se incrementó al aumentar la temperatura. El incremento de la actividad no puede ser atribuido a la liberación del sector  $F_1$ , dado que la sensibilidad al inhibidor oligomicina se mantuvo en todas las temperaturas (dato no mostrado). Utilizando los datos obtenidos se calculó la energía de activación asociada al proceso de hidrólisis de ATP utilizando la ecuación de Arrhenius [ $k(T)=A \cdot e^{-E_a/RT}$ ] (inserto en la figura 16). A partir de la pendiente de la recta se calculó una energía de activación de 4.1 Kcal/mol.



**Figura 16.** Hidrólisis de ATP en un intervalo amplio de temperaturas. Se determinó la actividad de hidrólisis de Mg-ATP de la ATP sintasa dimérica en presencia de 0.01% de lauril maltósido. el ensayo se realizó a temperaturas crecientes, de 15 °C a 60°C, incrementando 5 °C entre cada una. Se muestra la actividad sensible a oligomicina de la enzima dimérica a cada una de las temperaturas indicadas en el panel exterior y el inserto muestra el gráfico de Arrhenius de los datos del panel exterior donde se observa la dependencia de la actividad con respecto a la temperatura.

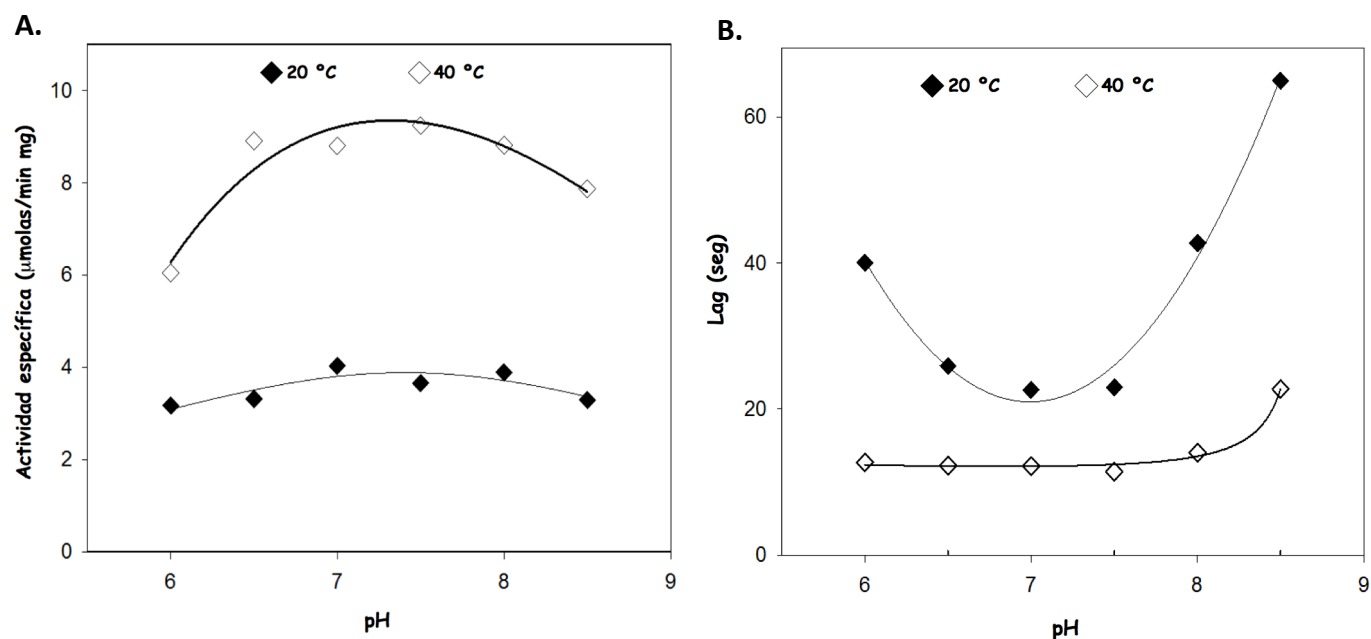
Al realizar los ensayos de hidrólisis de ATP a temperaturas crecientes, se encontró un comportamiento no lineal (fig. 17A); se observó que la enzima dimérica mostraba una cinética histerética, es decir presenta una fase inicial lenta seguida de una segunda fase lineal más rápida. Al tiempo que sucede entre una fase y otra se conoce como tiempo de retraso o lag. Este comportamiento se ha observado en diferentes sistemas y se ha atribuido a una transición lenta entre dos formas de la enzima que presentan propiedades cinéticas diferentes. Este comportamiento se observó tanto para la enzima dimérica como para el sector  $F_1$ . Se calculó el tiempo que pasaba entre la adición de la enzima en el ensayo y el alcance del estado estacionario y se determinó que la variación en el lag es inversamente proporcional a la temperatura (fig. 17B).



**Figura 17.** Comportamiento histerético de la enzima dimérica. **A.** Se muestran trazos representativos con la enzima dimérica a temperatura creciente. El tiempo desde que se añade la enzima al ensayo, hasta que se alcanza la velocidad de estado estacionario disminuye conforme se incrementa la temperatura, se muestra la actividad sensible a oligomicina en presencia de lauril maltósido 0.01%. **B.** Se calculó el tiempo de retraso o lag a partir de los datos que se muestran en el panel A, utilizando la ecuación  $((V_{ss}-V_i)/V_{ss})\tau$ , como se describe en materiales y métodos.

## EFFECTO DEL pH SOBRE LA HIDRÓLISIS DE Mg-ATP.

Se evaluó la hidrólisis de Mg-ATP en la enzima dimérica en un intervalo de pH de 6.0 a 8.5 para determinar el pH óptimo. El experimento se realizó a dos temperaturas: 20 °C y 40 °C, esto se hizo para evaluar si el retraso que se observó en la sección anterior se veía modificado por el pH. En la figura 18A se muestran los resultados obtenidos, a diferencia de otras ATPasas que muestran un pH óptimo alrededor de 8.0 (91), la enzima de *Polytomella* sp. no presenta un pH óptimo sino que puede hidrolizar Mg-ATP en todo el intervalo de pH que se evaluó. A 40 °C la actividad específica es mayor, como ya se había observado en el ensayo a diferentes temperaturas. Al calcular el retraso o lag de manera similar a lo hecho en el ensayo de temperatura, se pudo apreciar que si bien la hidrólisis no muestra un pH óptimo, a 20 °C el tiempo lag disminuye de pH 6.5 a 7.5 y se incrementa entre 8.0 y 8.5, en contraste con lo que se observó a 40 °C donde el lag parece ser independiente del pH (fig. 18B).



**Figura 18.** La hidrólisis puede proceder en un intervalo de pH amplio. **A.** La hidrólisis de ATP se midió en presencia de lauril maltósido a una concentración final de 0.01% ( $P/V$ ) a valores crecientes de pH. Esto se realizó a dos temperaturas: 20 °C (diamantes negros) y 40 °C (diamantes blancos). En todos los casos la actividad fue completamente sensible al inhibidor oligomicina. **B.** Se calculó el tiempo lag para alcanzar la velocidad de estado estacionario en la ATPasa dimérica, a partir de los datos que se muestran en el panel A como se describe en materiales y métodos, la simbología es igual al panel A.

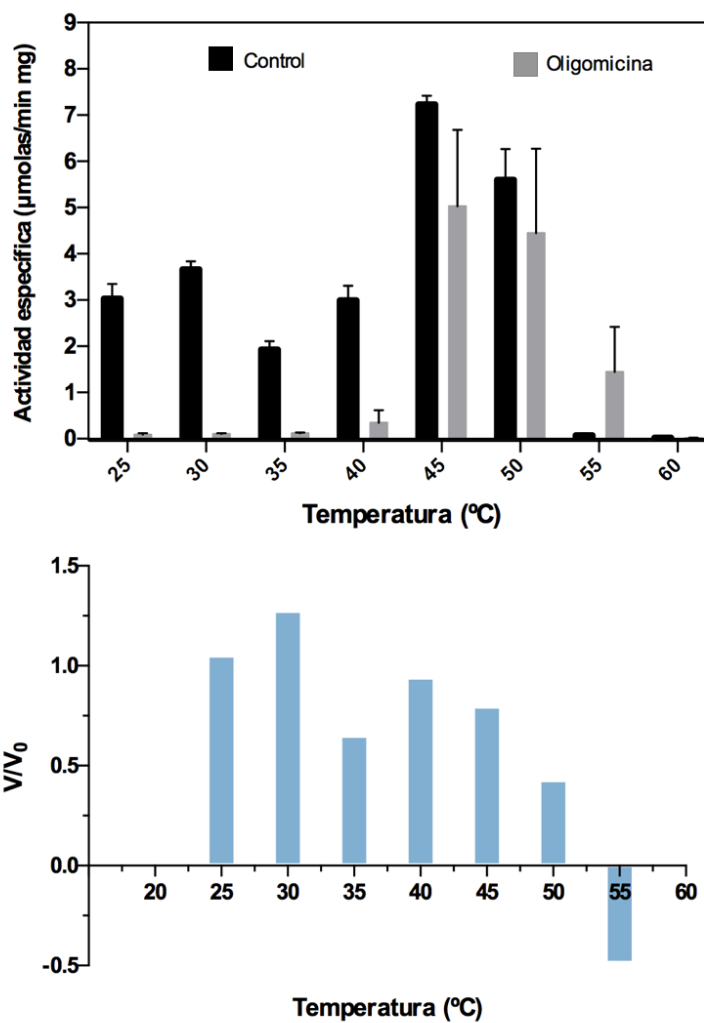
## **ENSAYOS PARA CALCULAR EL PORCENTAJE DE INACTIVACIÓN IRREVERSIBLE DE LA ATP SINTASA DIMÉRICA DE *Polytomella*. sp**

Se observó en los ensayos de hidrólisis de ATP que la enzima mantiene su capacidad hidrolítica hasta 60 °C, lo cual se contrapone a lo observado con otras ATPasas en las cuales la enzima se inactiva desde temperaturas bajas, debido a disociación. Por lo anterior, se decidió calcular la temperatura a la que el 50 % de la enzima dimérica de *Polytomella* sp. se inactiva de manera irreversible.

El ensayo se realizó incubando a la enzima a temperaturas crecientes (25 a 60 °C) durante 10 minutos en un baño de temperatura controlada, en tubos de ensayo. Posteriormente se enfrió la muestra en un baño de agua a temperatura ambiente y se midió la hidrólisis de ATP de la muestra en presencia de 0.01 % (p/v) de lauril maltósido en la celda por el método de Pullman.

En todas las condiciones se hicieron controles con oligomicina, incubando a la enzima con el inhibidor por al menos 20 minutos, después de la incubación a la temperatura correspondiente (fig. 19A). A partir de los datos obtenidos se calculó la proporción de enzima que mantiene sensibilidad al inhibidor oligomicina con respecto a la temperatura (fig. 19B) y se determinó que 38 °C se inactiva de manera irreversible el 50 % de la enzima dimérica.

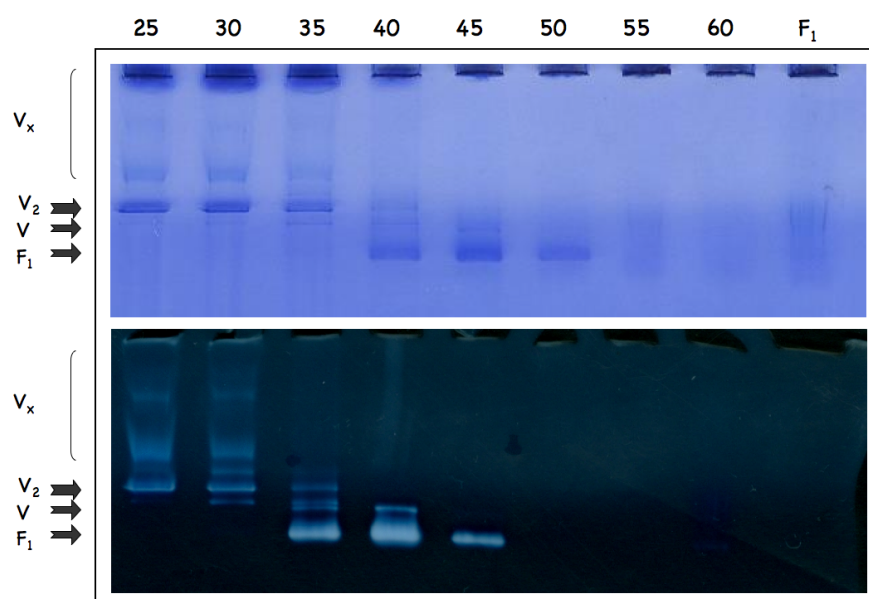




**Figura 19.** Hidrólisis de Mg-ATP de ATPasa dimérica incubada a temperaturas crecientes. La enzima dimérica se incubó a la temperatura indicada en la parte superior del panel, durante 10 minutos. **A.** Actividad de hidrólisis de ATP de la enzima en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de oligomicina (5  $\mu\text{g/ml}$ ). **B.** Relación de la actividad sensible a oligomicina con la actividad insensible al inhibidor.

De manera simultánea, se reservó una alícuota de la enzima incubada para realizar una electroforesis en gel nativo y se corrieron dos geles: un gel azul (BN-PAGE) para visualizar el patrón electroforético de la enzima en la curva de temperatura y un gel claro (CN-PAGE) para medir la hidrólisis de ATP *in gel* por el método de Zerbetto (92).

Como se observa en la figura 20, entre 25 y 30 °C la enzima se encuentra mayoritariamente como dímero ( $V_2$ : 1,600 KDa) y se observan formas multiméricas superiores ( $V_x$ ). Entre 35 y 40 °C aparece la forma monomérica de la enzima ( $V$ : 800 KDa) y comienza a disociarse al sector  $F_1$  (400 KDa). Desde 50 °C y hasta 60 °C no se observan bandas ni por tinción con azul de coomassie ni por tinción de actividad, lo cual es consistente con lo que se observa en la figura 19.



**Figura 20.** BN-PAGE y CN-PAGE de la enzima dimérica incubada a temperaturas crecientes. La enzima dimérica se incubó en un baño a la temperatura indicada en la parte superior del panel, durante 10 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota y se realizaron electroforesis nativa azul (panel superior) y clara (panel inferior). El gel BN-PAGE se tiñó con azul de Coomassie para visualizar los complejos y el gel claro se sometió a un ensayo de hidrólisis por el método de Zerbetto, en el que la actividad de hidrólisis puede seguirse mediante la formación de un precipitado blanquecino.

## EXTENSIÓN CARBOXILO TERMINAL DE LA SUBUNIDAD $\beta$ .

### Amplificación de la extensión

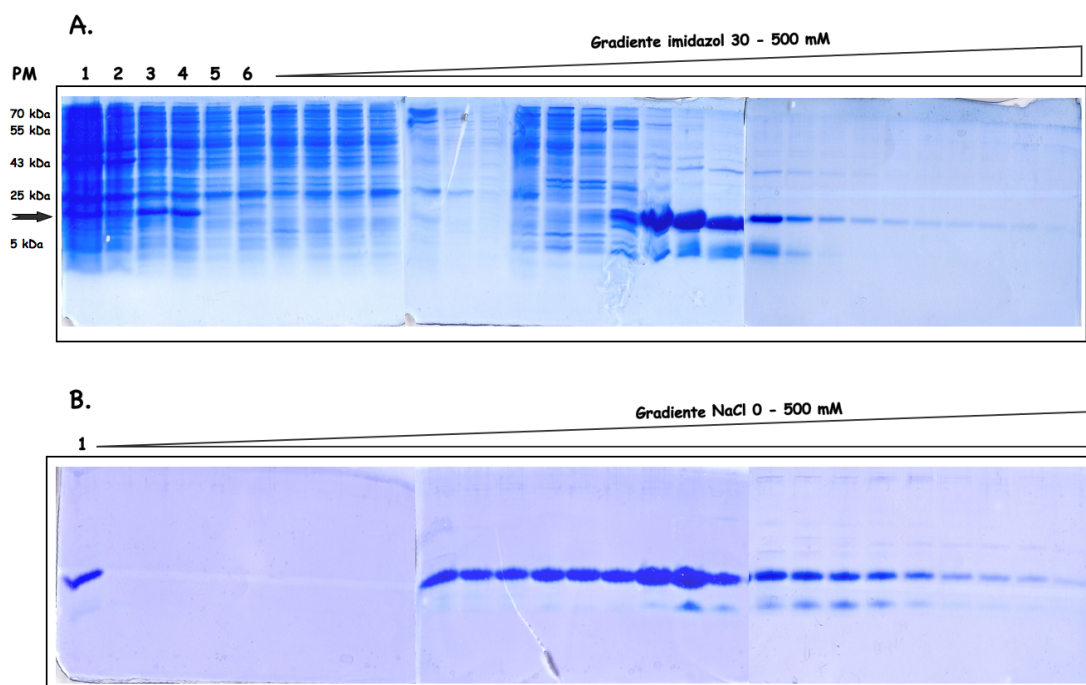
Se reportó previamente que las subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$ , en *C. reinhardtii* y en *Polytomella* sp., presentan extensiones en sus regiones amino y carboxilo, respectivamente. El análisis de estructura primaria mostró que esta diferencia se debe a la presencia de una extensión de 15 a 18 residuos en el extremo N-terminal de  $\alpha$  y de 60 a 70 residuos en el extremo C-terminal de  $\beta$  (figura 7) (53, 54). Dado que se ha propuesto que la extensión en  $\beta$  pudiera funcionar como la proteína inhibidora IF<sub>1</sub>, cuyo homólogo funcional no ha sido encontrado en las algas clorofíceas (55), se determinó evaluar si la extensión en la porción carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  tenía algún efecto sobre la hidrólisis de ATP. Para hacerlo, la secuencia correspondiente a la extensión se amplificó a partir de una genoteca de cDNA, se clonó en los vectores pGEM y pET28(a), que le confiere una etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal y se transformó en la cepa BL21-Codon plus de *Escherichia coli* para sobre expresarla utilizando IPTG como sustrato de inducción. Como producto de la sobre-expresión se espera una proteína con un peso estimado de 11.6 KDa.

### Purificación de la proteína sobre-expresada

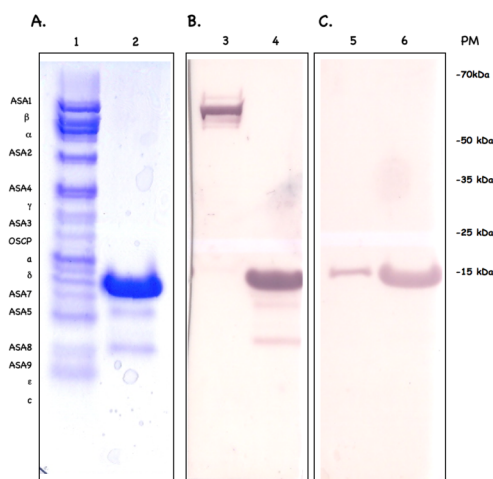
Mediante ensayos de sobre-expresión se determinó que las condiciones óptimas para la obtención de la proteína se lograban al incubar a las bacterias a 37 °C con 0.1 mM de IPTG durante toda la noche. Las bacterias se rompieron por sonicación y mediante pruebas de centrifugación diferencial se determinó que la proteína se encontraba mayoritariamente en la fracción soluble (carril 3, figura 21A). Por tanto, para obtenerla se partió de esta fracción y se purificó mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos utilizando níquel como sustrato (Panel A, figura 21). Esto permitió obtener una fracción enriquecida de la proteína y posteriormente se eliminaron los contaminantes de alto peso molecular mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando un gradiente de cloruro de sodio (Panel B, figura 21).

### Inmunodetección de la proteína purificada

La proteína purificada se analizó en un ensayo de inmuno-detección (Figura 22), utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a la subunidad  $\beta$  de *Polytomella* sp. (fig. 22B) y un anticuerpo policlonal que reconoce a la etiqueta de histidinas de proteínas sobre-expresadas en el vector pET28(a) (fig. 22C). Se muestra como referencia el patrón electroforético de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. en un gel SDS-PAGE. Como se puede observar en la figura 22, el primer anticuerpo reconoce a la proteína purificada y a la subunidad  $\beta$  endógena del complejo y el segundo anticuerpo reconoce a la proteína purificada y también a la subunidad ASA7. Ambos anticuerpos reconocieron a la banda correspondiente a la extensión purificada.



**Figura 21.** Purificación de la extensión carboxilo- terminal de la subunidad  $\beta$ . La cepa BL21-codon plus de *Escherichia coli* se creció a 37 °C durante toda la noche en presencia de 0.1 mM de IPTG; posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación y el botón se resuspendió en amortiguador de lisis y se sonicó para romper a las células. **A.** Purificación por afinidad a níquel. El código es el siguiente: extracto total (1); pastilla (2); sobrenadante (3); lo que se cargó a la columna (4); lo que no se unió a la columna (5); Lavado con 30 mM de imidazol (6). La proteína de interés se eluyó con un gradiente lineal de imidazol de 30 a 500 mM. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína sobre-expresada, cuya MM estimada es de 11.6 KDa. **B.** Purificación por intercambio iónico. En el carril 1 se muestra lo que se cargó a la columna. La proteína fue eluida mediante un gradiente lineal de NaCl (0-500 mM).

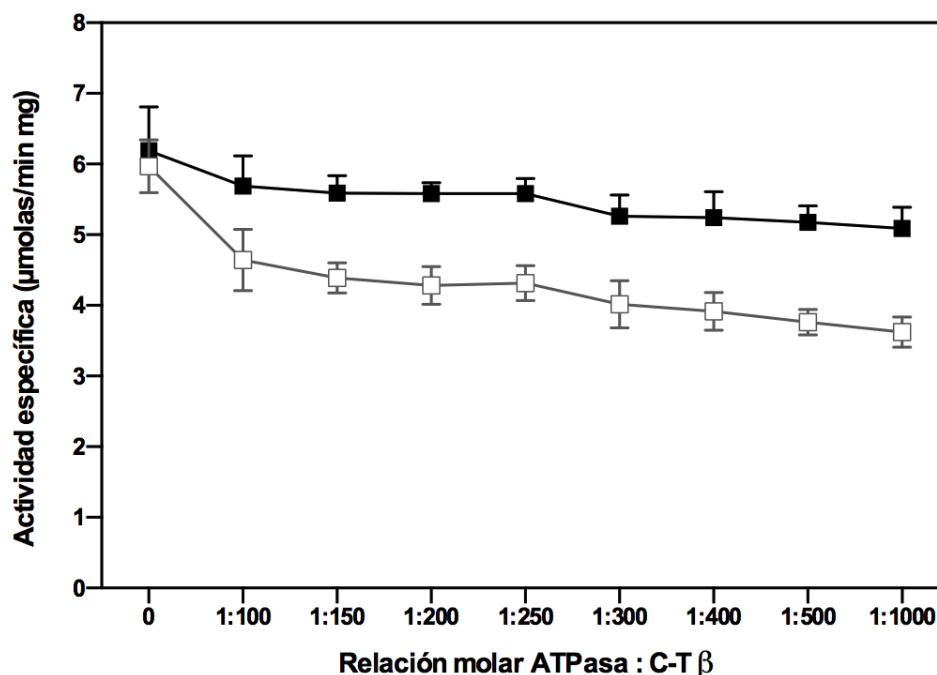


**Figura 22.** Inmunodetección de la extensión carboxilo- terminal de la subunidad  $\beta$ . La proteína purificada se corrió en geles SDS PAGE y se transfirió a una membrana de nitro celulosa para su detección mediante anticuerpos. **A.** Gel SDS -PAGE teñido con azul de Coomassie. La ATP sintasa de *Polytomella* sp (carriles 1, 3 y 5) se colocó como control y la proteína purificada (carriles 2,4 y 6). **B.** Membrana incubada con un anticuerpo policlonal que reacciona con la subunidad  $\beta$  de *Polytomella* sp., se observa el reconocimiento de la extensión purificada y la subunidad  $\beta$  endógena del complejo. **C.** Membrana incubada con un anticuerpo policlonal que reconoce la etiqueta de histidinas de la extensión purificada y de manera inespecífica con la subunidad ASA7 del complejo. El anticuerpo se produjo utilizando como antígeno la subunidad Asa7 con etiqueta de histidinas.

### Ensayos de hidrólisis en presencia de la de la extensión C-T de la subunidad $\beta$ purificada

Se evaluó si la extensión carboxilo-terminal de la subunidad  $\beta$  tenía algún efecto sobre la hidrólisis de ATP de la enzima dimérica. El ensayo se realizó utilizando el método de Pullman en dos condiciones: incubando, por al menos 30 minutos, la ATPasa en presencia de detergente lauril maltósido (0.01%) y la extensión en proporciones molares crecientes o adicionando la proteína directamente en la celda del ensayo sin pre-incubarlas y en presencia de 0.01% de lauril maltósido en el medio.

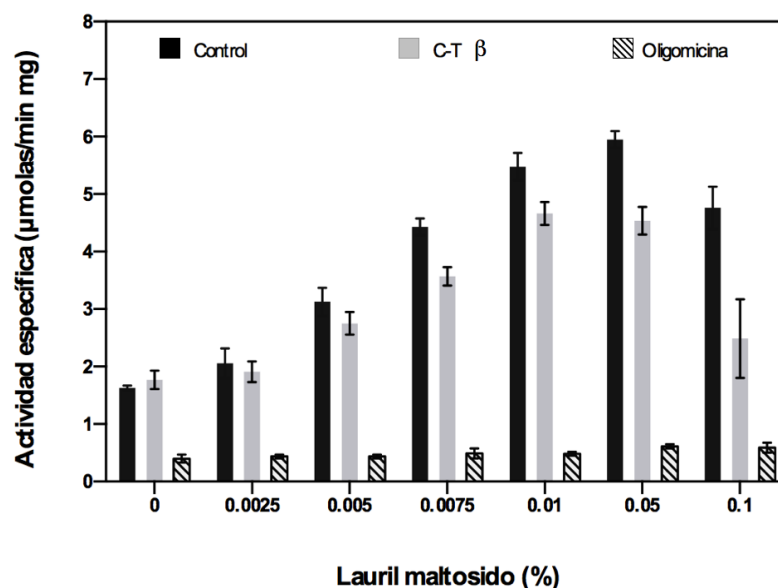
En la figura 23 se puede observar que en ambas condiciones se obtuvo una inhibición, de entre 10 y 15% al adicionar la proteína en la celda y de 20 a 30% al preincubar las proteínas juntas. En ambos casos se contó con un control de sensibilidad a oligomicina cuya inhibición fue de al menos 97% (dato no mostrado).



**Figura 23.** Efecto de la extensión C-T de la subunidad  $\beta$  purificada en la hidrólisis de ATP. Se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de la extensión purificada sobre la hidrólisis de ATP en la enzima dimérica; se incubaron 50 nm de ATPasa dimérica con concentraciones crecientes ( $\mu\text{M}$ ) de la extensión purificada por al menos 20 minutos (cuadros negros) o se adicionó la extensión en la celda durante el ensayo (cuadros grises). La actividad se midió utilizando el método de Pullman en un medio que contenía 0.01% (p/v) de lauril maltósido. En el control sin extensión Carboxilo terminal purificada, la enzima fue incubada con Tris 20 mM como vehículo.

Se ensayó el efecto de la extensión de beta purificada sobre la ATPasa dimérica en un intervalo de concentración de lauril maltósido de 0 a 0.1%, para tratar de ver si en alguna concentración de detergente la extensión tenía un mayor efecto sobre la enzima. Se realizó el ensayo de hidrólisis de ATP manteniendo la concentración de la extensión carboxilo-terminal en exceso (1:1000) y se tituló con el detergente lauril maltósido (0 a 0.1 %). Se probaron tres condiciones; en la condición control se ensayó a la enzima dimérica incubada con Tris 20 mM como vehículo y con las concentraciones señaladas del detergente en la celda. En el caso de la extensión C-T, la ATP sintasa dimérica de *Polytomella* sp. se incubó con un exceso de la proteína purificada, por al menos 30 minutos y posteriormente, se realizó el ensayo con las concentraciones indicadas de lauril maltósido. De manera paralela, se realizó un control negativo en el que la enzima dimérica fue incubada con oligomicina (5 µg/ml) y se ensayó de la misma manera.

En la figura 24 se puede observar que el control (ATPasa dimérica), muestra una activación por el detergente como ya se había establecido previamente. En contraste con lo anterior, la enzima incubada con la extensión C-T muestra una activación menos, comparada con la enzima que solo se ensayó con detergente y en ausencia de la extensión purificada. Al incubarse a la enzima con la extensión, se observó una inhibición de entre 20 a 40 %, con respecto al control. Como control de inhibición, la enzima se incubó con el inhibidor oligomicina, en todas las concentraciones de detergente se inhibe en un 97%.



**Figura 24.** Efecto de la extensión C-T de la subunidad β purificada en la hidrólisis de ATP con concentraciones crecientes de LM. Se evaluó el efecto de un exceso de la extensión purificada sobre la hidrólisis de ATP en la enzima dimérica. La enzima fue incubada con Tris 20 mM como vehículo (barras negras); extensión carboxilo terminal en una relación 1:1000 (ATPasa – extensión C-T) (barras grises) y con oligomicina (barras con diagonales). La actividad se midió utilizando el método de Pullman en un medio con concentraciones crecientes de lauril maltósido (% p/v).

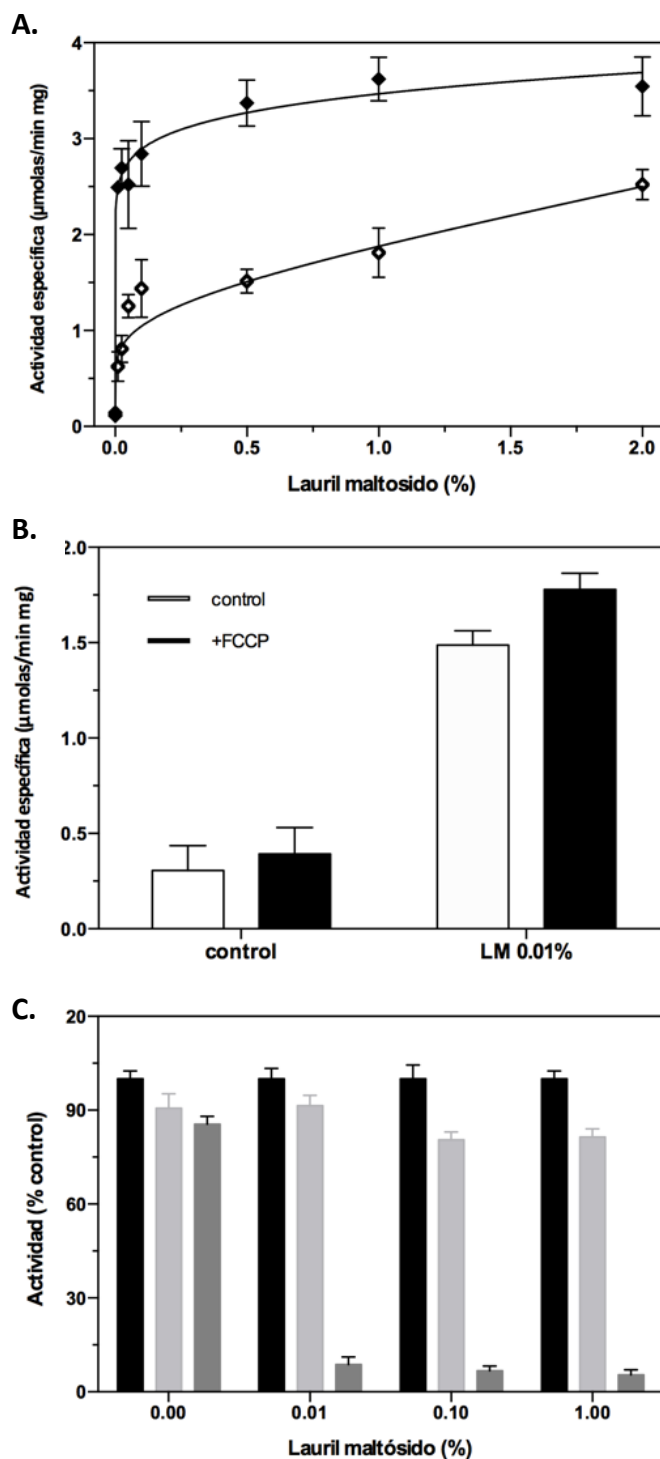
## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP DE LA ENZIMA DIMÉRICA RECONSTITUIDA EN LIPOSOMAS

La baja actividad de hidrólisis que se ha descrito para el dímero de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. podría deberse a la falta de un ambiente lipídico. Para evaluar esto, la enzima fue reconstituida en liposomas de asolectina de soya y se midió la hidrólisis de ATP de la enzima purificada como control y de la enzima dimérica reconstituida.

Se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de lauril maltósido (LM) en ensayos de hidrólisis de Mg-ATP (Panel A figura 25). Como se reportó previamente (72), la actividad de hidrólisis de la enzima se estimula 60 veces con el detergente a una concentración de 0.01%. Al reconstituir a la enzima en liposomas, la actividad se incrementó 20 veces con el detergente, es decir de 0.13  $\mu$ molas ATP/min mg a 2.52  $\mu$ molas ATP/min mg. El desacoplante FCCP no mostró algún efecto sobre la hidrólisis de ATP de la enzima reconstituida, lo que sugiere que los proteoliposomas no estaban acoplados (Panel B figura 25).

Se evaluó también el patrón de inhibición de la oligomicina en los proteoliposomas con la enzima reconstituida, ya que en la enzima purificada, la oligomicina parecía estar actuando como un inhibidor clásico que se une débilmente en su sitio de unión y se consideró que esto pudiera atribuirse a la falta de ambiente lipídico. Para realizar los ensayos se incubaron los proteoliposomas en presencia de 5  $\mu$ g/ml del inhibidor y después se midió la hidrólisis de Mg-ATP en un medio con y sin inhibidor (Panel C figura 25).

En ausencia del inhibidor, se observó solo una inhibición parcial de la actividad. La inhibición sólo fue completa cuando el inhibidor fue preincubado y colocado en el medio de ensayo, de manera similar a lo que se observa con la enzima aislada.



**Figura 25.** Evaluación de la hidrólisis de ATP en liposomas y efecto de la oligomicina. El lauril maltósido activa a la enzima reconstituida en liposomas y la oligomicina muestra el mismo patrón de inhibición que la enzima purificada. **A.** La actividad de hidrólisis de ATP se midió en la enzima purificada (diamantes llenos) y en la enzima incorporada en liposomas (diamantes vacíos) en presencia de concentraciones crecientes (p/v) de lauril maltósido (LM). En todos los casos, la actividad de ATPasa fue completamente sensible a oligomicina. **B.** Se evaluó el efecto del FCCP en los proteoliposomas; las muestras se incubaron al menos por 30 minutos con 10  $\mu$ M de FCCP y se ensayaron en ausencia y presencia de lauril maltósido (0.01%). **C.** Se determinó la sensibilidad a oligomicina en los proteoliposomas en presencia de concentraciones crecientes de lauril maltósido; las muestras se preincubaron por al menos 30 minutos con 5  $\mu$ g/ml de oligomicina y se ensayaron en ausencia (barras gris claro) o presencia (barras gris oscuro) de la misma concentración del inhibidor. Los controles se preincubaron y ensayaron en con el vehículo DMSO (barras negras).



## SÍNTESIS DE ATP

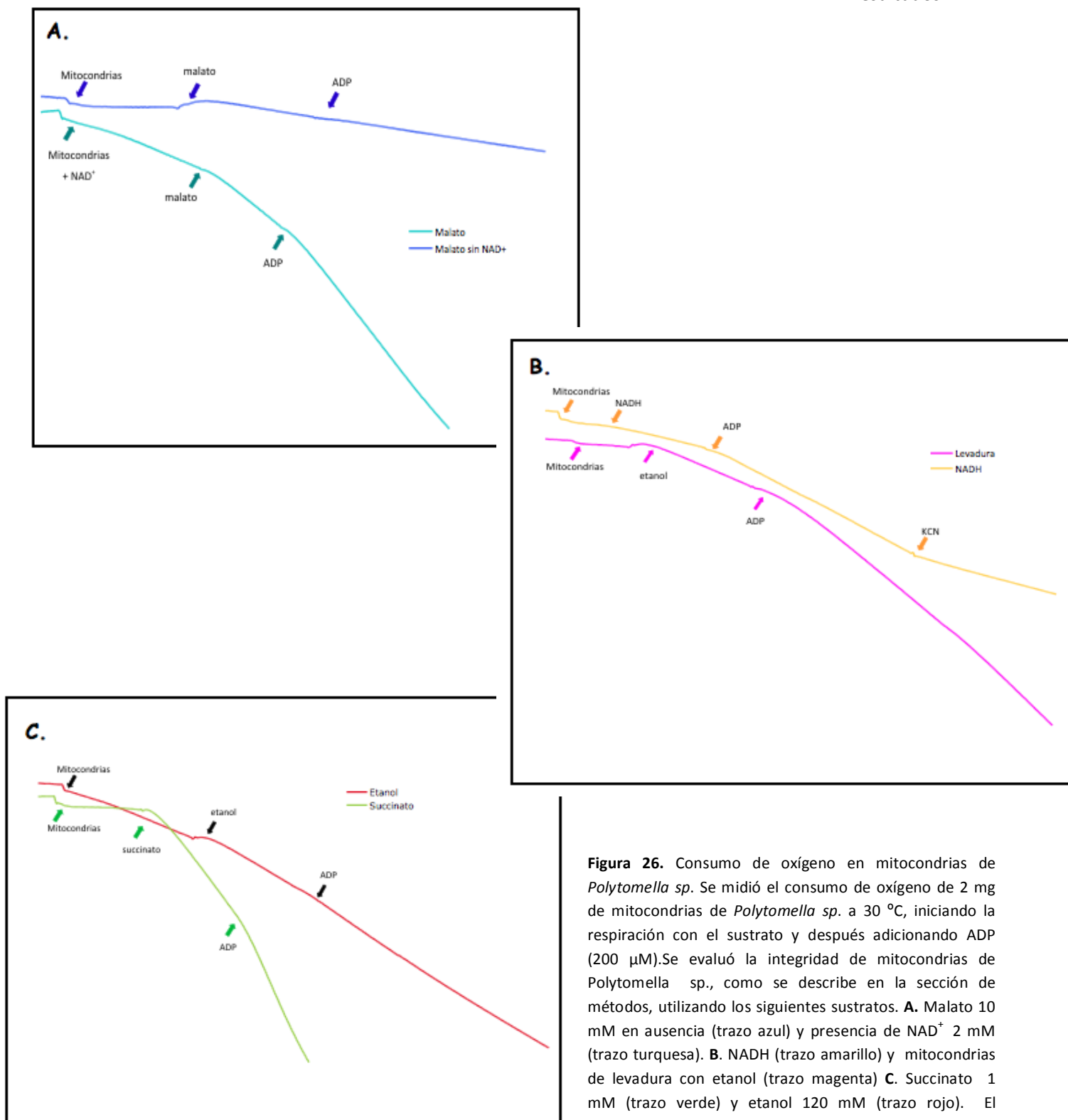
### DETERMINACIÓN DE COCIENTE RESPIRATORIO DE MITOCONDRIAS PURIFICADAS DE *Polytomella* sp.

Se obtuvieron mitocondrias acopladas de *Polytomella* sp. por el método de Guérin (93), descrito en la sección de materiales y métodos. Para corroborar la integridad de las mismas se midió el consumo de oxígeno con diferentes sustratos respiratorios: succinato, NADH, malato y etanol como se muestra en la figura 26). El cociente respiratorio (CR) se calculó utilizando las pendientes de los estados III y IV. Los cocientes respiratorios obtenidos fueron de 1.6 con malato; 1.8 con succinato; 2.2 con NADH y con etanol no se tuvo control respiratorio. Se realizó un control con mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (Panel B figura 26) utilizando etanol como sustrato respiratorio y se obtuvo un CR de 1.9.

Previamente, se reportó que este método permite obtener mitocondrias con potencial de membrana y con un cociente respiratorio entre 1.6 y 3.0, dependiendo del sustrato y la preparación (94).

Se observó que la actividad de las NAD<sup>+</sup> deshidrogenasas de la matriz mitocondrial era baja (Panel A figura 26), lo que sugiere que durante el aislamiento la poza de NAD<sup>+</sup> se agotó, ya que para obtener un cambio en la pendiente al utilizar malato como sustrato respiratorio, fue necesario adicionar NAD<sup>+</sup> en el ensayo.

Aunque se obtuvo un buen control respiratorio con el NADH éste tiene el mismo coeficiente de extinción molar a 340nm que el NADPH, que se utiliza como parte del sistema acoplado para medir la síntesis de ATP. Por lo anterior, se decidió hacer los ensayos de síntesis utilizando succinato como sustrato.



**Figura 26.** Consumo de oxígeno en mitocondrias de *Polytomella sp.* Se midió el consumo de oxígeno de 2 mg de mitocondrias de *Polytomella sp.* a 30 °C, iniciando la respiración con el sustrato y después adicionando ADP (200  $\mu$ M). Se evaluó la integridad de mitocondrias de *Polytomella sp.*, como se describe en la sección de métodos, utilizando los siguientes sustratos. **A.** Malato 10 mM en ausencia (trazo azul) y presencia de NAD<sup>+</sup> 2 mM (trazo turquesa). **B.** NADH (trazo amarillo) y mitocondrias de levadura con etanol (trazo magenta) **C.** Succinato 1 mM (trazo verde) y etanol 120 mM (trazo rojo). El cociente respiratorio (CR) se calculó utilizando las pendientes de los estados III y IV.

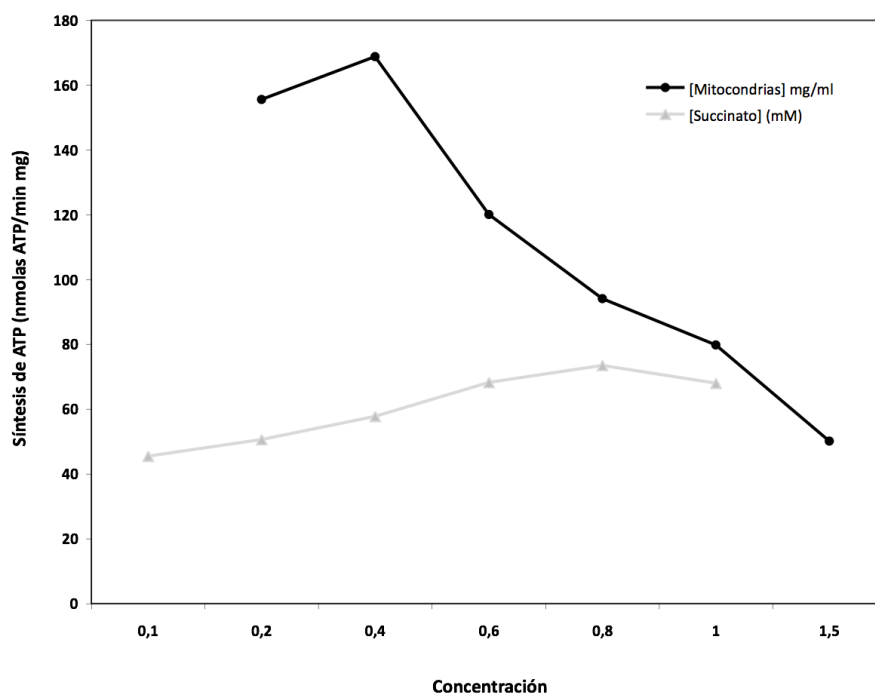
## PRUEBAS PARA ESTANDARIZAR LAS CONDICIONES DEL ENSAYO POR EL MÉTODO DE TRAUTSCHOLD

### Curva de concentración de proteína

Para determinar la concentración óptima de mitocondrias de *Polytomella* sp. para los ensayos de síntesis de Mg-ATP, se realizó una curva de concentración utilizando Succinato como sustrato, en mitocondrias cuyo CR se determinó previamente permitiendo establecer que estaban intactas. El ensayo se realizó con concentraciones crecientes de proteína; en la figura 27, se muestra la síntesis de Mg-ATP que se obtuvo en el ensayo. Se observa que la mayor síntesis de Mg-ATP se obtuvo con 0.4 mg/ml de mitocondrias.

### Curva de concentración de succinato

Como se observó en los ensayos de oximetría, utilizando succinato como sustrato, las mitocondrias presentan un CR de 1.8 y no es necesario añadir  $\text{NAD}^+$  ni NADH en el medio, por lo que se decidió hacer los ensayos de síntesis con succinato como sustrato. Para evaluar la concentración óptima a utilizar en ensayos posteriores, se realizó una curva de concentración del sustrato respiratorio. En la figura 27, se puede observar que el comportamiento que se aprecia es lineal hasta 0.6 mM, y a partir de 0.8mM se estabiliza el nivel de síntesis por lo que en los ensayos posteriores se utilizó una concentración de 1mM de succinato.



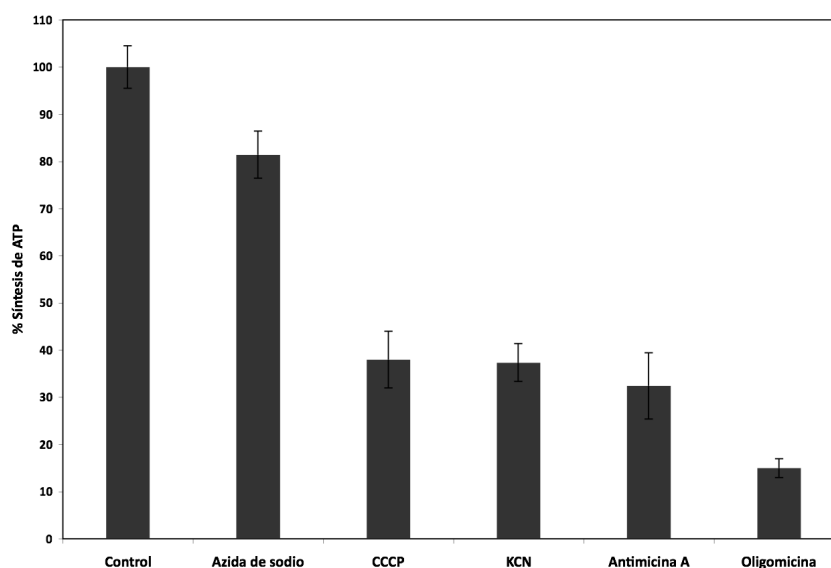
**Figura 27.** Condiciones para el ensayo de síntesis de ATP en mitocondrias de *Polytomella* sp. **A.** Curva de concentración de mitocondrias; los ensayos se realizaron en las siguientes condiciones: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, Glucosa 20 mM, Fosfato 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NADP}^+$  1.4 mM, 162.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HK, 2 U/mL G6PDH, se utilizó succinato como sustrato (10 mM) y la reacción se inició con la adición de 500  $\mu\text{M}$  de ADP. **B.** Curva de concentración de succinato, el ensayo se realizó en las mismas condiciones que el panel A utilizando 0.5 mg/ml de mitocondrias.

## EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA SÍNTESIS DE Mg-ATP

Se ha reportado el efecto de diversos compuestos sobre los complejos respiratorios de diversos organismos (95). Se decidió evaluar el efecto de algunos de los compuestos que más se han caracterizado sobre la síntesis de ATP. Los compuestos que se probaron fueron: oligomicina, cianuro de potasio (KCN), azida de sodio, carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y antimicina A.

La oligomicina es un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces* que actúa bloqueando la translocación de los protones cuando se une en la interface entre la subunidad  $\alpha$  y el anillo de subunidades c, en el canal de acceso que se encuentra en el sector  $F_0$ . El cianuro bloquea el paso de electrones del hemo  $a_3$  al oxígeno y la antimicina A es un antibiótico que actúa sobre el complejo III, inhibiendo la reoxidación del NADH y del  $FADH_2$ . Estos inhibidores detienen el paso de electrones de modo que no hay bombeo de protones y sin gradiente de protones, no hay síntesis de ATP. El CCCP es un compuesto que desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria por lo que la síntesis de ATP se abate.

Para evaluar el efecto de estos compuestos, se incubó a las mitocondrias en presencia de los inhibidores y posteriormente, se midió la síntesis de ATP utilizando succinato como sustrato respiratorio. Como se observa en la figura 28, todos los inhibidores que se evaluaron inhibieron entre 60 y 80 % de la síntesis de ATP en las mitocondrias, con respecto al control, excepto la azida de sodio, que inhibió únicamente el 20 % de la actividad de síntesis de ATP.

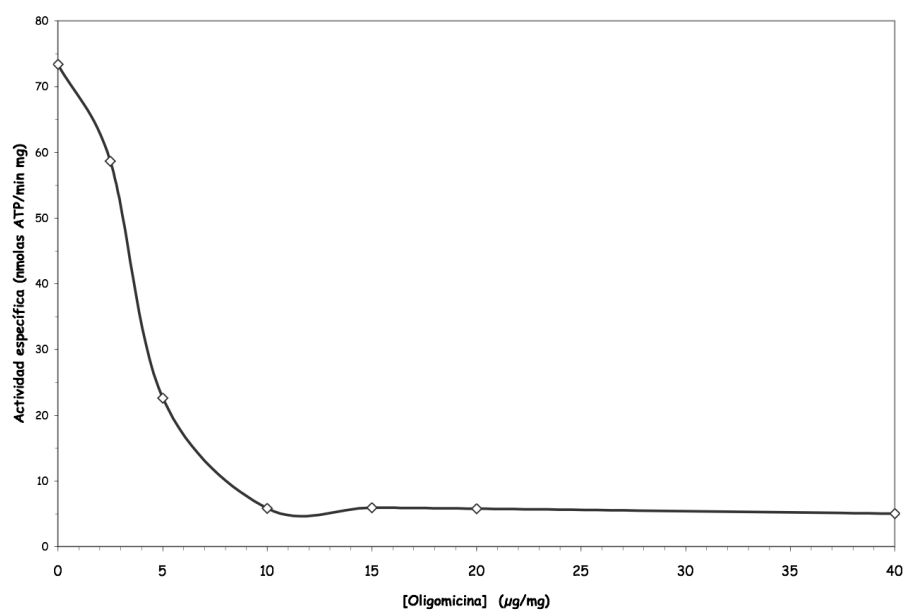


**Figura 28.** Evaluación del efecto de inhibidores sobre la síntesis de ATP. Se incubaron mitocondrias (0.5 mg/ml), en presencia de azida de sodio (200  $\mu$ M); CCCP (250 nM); KCN (200  $\mu$ M); antimicina A (25  $\mu$ M) y oligomicina (20  $\mu$ g/mg). Se utilizó succinato como sustrato (1 mM) y la reacción se inició con la adición de 500  $\mu$ M de ADP.

## CURVA DE CONCENTRACIÓN DE OLIGOMICINA

La oligomicina es un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces*, actúa específicamente bloqueando el paso de los protones a través del segmento  $F_0$  por lo que inhibe la fosforilación oxidativa.

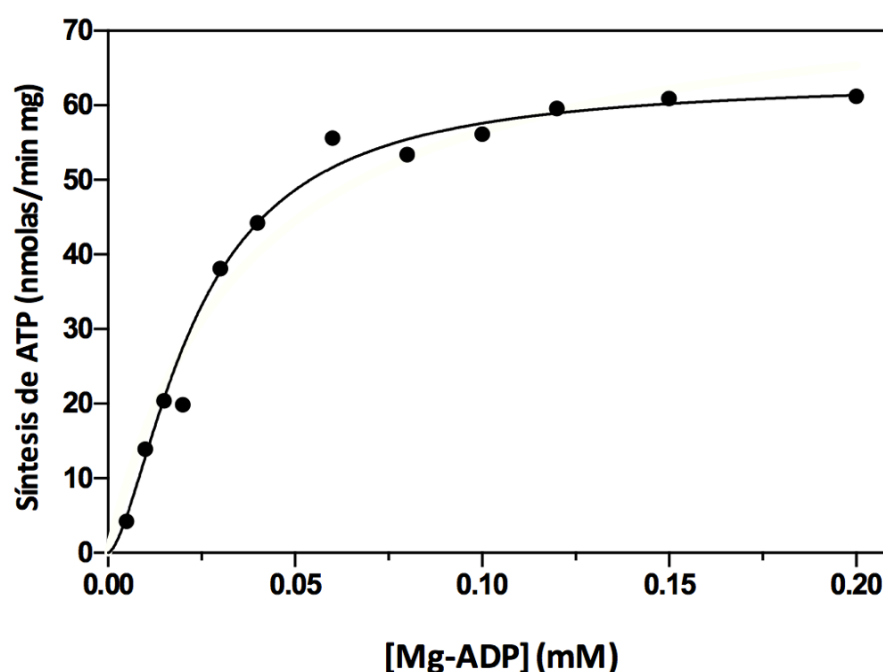
Se realizó una curva de concentración de oligomicina incubando a las mitocondrias por al menos 30 minutos y después evaluando la síntesis de ATP utilizando succinato como sustrato. Como se puede apreciar en la figura 29, desde concentraciones muy bajas del inhibidor ( $2.5\mu\text{g}/\text{mg}$ ), la actividad de síntesis de ATP se inhibe un 50%. La  $IC_{50}$  calculada para la oligomicina en la síntesis de ATP de mitocondrias de *Polytomella* sp. fue de  $4.1\mu\text{g}/\text{mg}$ .



**Figura 29.** Curva de oligomicina en mitocondrias de *Polytomella* sp. Para evaluar el efecto de la oligomicina sobre las mitocondrias del alga, se preincubaron ( $0.5\text{ mg}/\text{ml}$ ) de mitocondrias con la concentración indicada del inhibidor por al menos 30 minutos en hielo y posteriormente se realizó el ensayo, adicionando la misma concentración de inhibidor en la celda. Se utilizó succinato como sustrato ( $10\text{ mM}$ ) y la reacción se inició con la adición de  $500\mu\text{M}$  de ADP.

### CURVAS DE SATURACIÓN DE Mg-ADP

Para determinar las constantes cinéticas  $V_{\max}$  y  $K_m$  para la síntesis de ATP en mitocondrias de *Polytomella* sp. se realizaron ensayos de saturación del sustrato Mg-ADP. En la figura 30 se muestran los datos obtenidos para el ensayo. La reacción se inició con la adición de concentraciones crecientes de Mg-ADP y se realizó en paralelo un ensayo incubando a las mitocondrias con 20  $\mu\text{g}$  de oligomicina por cada miligramo de mitocondrias para determinar cuánto del valor obtenido corresponde a síntesis de ATP y cuánto a otros procesos que dan como resultado NADH o NADPH. Las constantes se obtuvieron ajustando los datos a un modelo cooperativo. La  $V_{\max}$  calculada a partir del ajuste fue de 63.45 nmolas/min y el coeficiente de Hill fue de 1.6.



**Figura 30.** Curva de saturación de Mg-ADP. Se determinó la actividad de síntesis de Mg-ATP en mitocondrias de *Polytomella* sp. Mitocondrias de *Polytomella* sp. fueron incubadas en presencia de oligomicina o del vehículo (DMSO) por al menos 30 minutos y posteriormente se midió la síntesis de ATP por el método de Trautshold (96). La reacción se inició con la adición del Mg-ADP. La actividad específica reportada corresponde a la actividad sensible a oligomicina. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill.

## DISCUSIÓN

### CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS

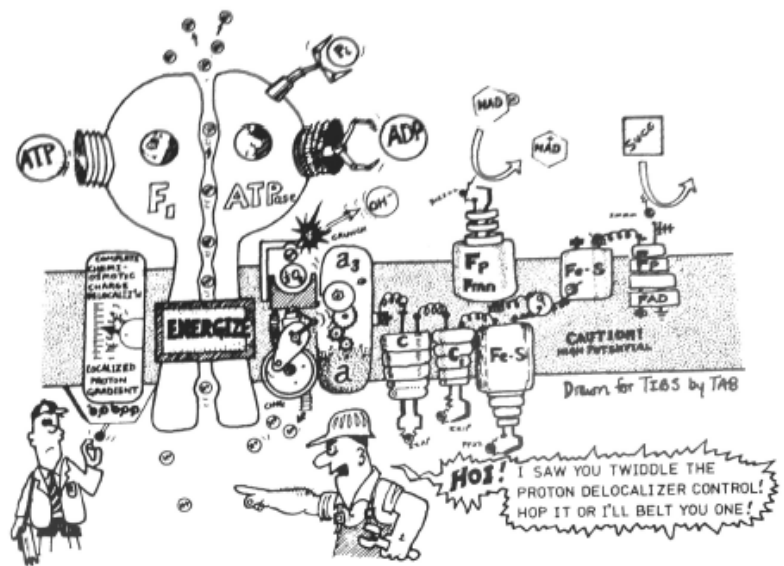


Figura D. (1)

## DISCUSIÓN

Se ha establecido que la forma totalmente activa de la ATP sintasa del alga incolora *Polytomella* sp. es el dímero y que el monómero presenta una actividad y una estabilidad menores. Dada su baja tendencia a disociarse es posible que el dímero sea la única forma fisiológicamente relevante de la enzima (72) y muy probablemente el monómero ni siquiera está presente en las crestas de las mitocondrias del alga *Polytomella* sp. (65).

En este trabajo se exploraron las características cinéticas de la enzima dimérica y del sector  $F_1$  del complejo V de *Polytomella* sp. La  $F_1F_0$ -ATP sintasa purificada de *Polytomella* sp. presenta una actividad de hidrólisis de ATP muy baja (0.03 U/mg) (72). Este fenómeno en que la hidrólisis de ATP es muy baja, en comparación con la síntesis de ATP, ha sido reportado para otras ATP sintasas como la de *Bacillus* sp. TA2.A1 (0.045 U/mg) (97) o *Mycobacterium bovis* BCG cuya actividad es indetectable (98). Estos valores son pequeños en comparación con los que se ha reportado para la hidrólisis de ATP en membranas de *Escherichia coli*, entre 2.9 U/mg (99) y 12.9 U/mg (100) o para el caso de la ATP sintasa mitocondrial de *Bos taurus* cuya actividad es de 3 a 8.5 U/mg (101) (91).

La ATP sintasa dimérica de *Polytomella* sp. purificada presenta una  $V_{max}$  de 0.095 U/mg y una  $K_m$  por Mg-ATP de 0.55 mM. Esta actividad puede incrementarse por la presencia de detergentes como lauril maltósido y Tween 20 (72), de manera particular, el detergente lauril maltósido ocasiona el incremento de 60 veces en la actividad de la enzima dimérica. Al ensayar la hidrólisis de ATP de la enzima dimérica en presencia de lauril maltósido la  $V_{max}$  se incrementó a 4.85 U/mg, (estimulación de 50X) en tanto que la  $K_m$  se mantuvo igual (0.4 mM). El ajuste de los datos mostró que la enzima dimérica no sigue un comportamiento cinético simple, ya que no pudo hacerse un ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten ni tampoco a un modelo de cooperatividad negativo, lo que sugiere que los monómeros presentan un comportamiento cinético asimétrico.

Para disecar si el efecto del detergente era sobre la porción membranal del complejo ( $F_0$ ) o sobre la fracción soluble ( $F_1$ ), se evaluó la hidrólisis de ATP del sector  $F_1$  obtenido mediante disociación por calor de la enzima dimérica. Los resultados mostraron que la actividad de éste era mayor que la de la enzima dimérica y que incluso ésta puede activarse con 0.01 % de lauril maltósido con una estimulación de dos veces la actividad



del sector ensayado sin detergente. La  $V_{\max}$  calculada para el sector  $F_1$  fue de 3.43 U/mg y 7.15 U/mg, en ausencia y presencia de detergente, respectivamente; en contraste, la  $K_m$  no se modificó (0.36 mM y 0.34 mM).

Estos resultados muestran que incluso el sector catalítico de la enzima puede activarse por el detergente, lo que sugiere que éste último actúa al mismo nivel. Resulta interesante que la adición de lauril maltósido duplica la  $V_{\max}$  del sector  $F_1$  sin que la  $K_m$  por Mg-ATP se modifique, similar a lo que se observa con los inhibidores no competitivos, lo que sugiere la liberación de un inhibidor no competitivo de la enzima mediada por el detergente. Este inhibidor podría ser la extensión presente en la porción carboxilo-terminal de la subunidad  $\beta$ .

Los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima dimérica y el sector  $F_1$  están resumidos en la tabla 4. Se puede observar que los valores de  $K_m$  se encuentran en el intervalo de lo que se ha reportado para la preparación membranal (0.315 mM) y soluble (0.79 mM) de *Bos taurus* (102) y que los valores de  $k_{\text{cat}}$  y  $k_{\text{cat}}/K_m$  son iguales para la enzima dimérica y para el sector  $F_1$ .

La baja actividad de hidrólisis que se ha descrito para el dímero de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* no puede atribuirse a la falta de un ambiente lipídico, ya que al reconstituir a la enzima en liposomas su actividad no se incrementa sólo por la reconstitución. De igual manera, el efecto del detergente no puede explicarse sólo por la falta de ambiente lipídico ya que en los proteoliposomas el lauril maltósido aun estimula la actividad 20 veces .

Durante décadas de investigación se han descrito y descubierto inhibidores que actúan sobre el complejo V por diferentes mecanismos; entre estos inhibidores se encuentran la oligomicina, el DCCD y el ADP. Al evaluar el efecto de estos inhibidores se encontró que, de manera análoga a lo que se observa en otros organismos, la oligomicina inhibe la hidrólisis de Mg-ATP, en concentraciones similares a las usadas con las enzimas de *Bos taurus* (101) y *E. coli* (79). Sin embargo, a diferencia de lo que se ha observado en otros organismos, el antibiótico no se une fuertemente a la enzima, ya que la dilución es suficiente para liberar al inhibidor del sitio de unión, lo que sugiere que la oligomicina actúa como un inhibidor rápido no fuertemente unido.

Se propuso recientemente que el sitio de unión de la oligomicina se encuentra en la interfaz entre el anillo c y la subunidad a y que actúa previniendo la translocación de los protones al bloquear el acceso a un grupo carboxilo esencial para el proceso (78). Al realizar un alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad c de diferentes organismos (figura 13), se observó que los residuos que componen al sitio de unión del inhibidor están conservados en *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus* y *Homo sapiens*. Sin embargo, en las algas *Polytomella sp.*, *C. reinhardtii* y *Volvox carteri*, se encontraron residuos no conservados que se han reportado

que confieren resistencia al antibiótico; las mutaciones puntuales Ala61Pro y Ala61Met confieren resistencia a la droga R207910 (TMC207) en *Mycobacterium tuberculosis* (103) (104) y la mutación Cys65Ser afecta la estructura del sitio de unión de oligomicina en *Saccharomyces cerevisiae* (105). Estos cambios podrían explicar la unión débil de la oligomicina a la ATP sintasa de *Polytomella* sp. así como la insensibilidad al antibiótico que se ha observado *in vivo* en *Chlamydomonas reinhardtii* y en especies de los cuatro órdenes de algas clorofíceas (68).

En contraste, el DCCD abolió completamente la hidrólisis de ATP en concentraciones similares a las que se han reportado para las enzimas de *Bos taurus* (106) y *E. coli* (79). Esto es congruente dado que el residuo que reacciona con el DCCD (Glu59) está conservado en *Polytomella* sp. y se ha reportado que la modificación de una subunidad *c* del anillo es suficiente para bloquear la rotación del anillo y prevenir la hidrólisis de ATP (79). El ADP actúa como inhibidor competitivo con una  $K_i$  de 1.2 mM, que está en el intervalo de lo que se ha reportado para otras  $F_1F_0$ -ATPasas mitocondriales (0.3 mM) (107).

Se evaluó también el patrón de inhibición de la oligomicina en la enzima reconstituida, ya que en la enzima purificada, la oligomicina parecía estar actuando como un inhibidor clásico que se une débilmente en su sitio de unión, se consideró que esto pudiera atribuirse a la falta de ambiente lipídico. Para realizar los ensayos se incubaron los proteoliposomas en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  del inhibidor y después se midió la hidrólisis de Mg-ATP en un medio con y sin inhibidor (Panel C figura 24). En ausencia del inhibidor se observó solo una inhibición parcial de la actividad. La inhibición sólo fue completa cuando el inhibidor era preincubado y colocado en el medio de ensayo, de manera similar a lo que se observa con la enzima aislada.

La enzima de *Polytomella* sp. purificada al ser ensayada en ausencia de detergente, presenta una actividad de hidrólisis de ATP muy pequeña, que podría ser el resultado de una regulación muy estricta del complejo. Atteia *et. al.* plantearon la hipótesis de que la extensión presente en la región carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  podría ser el análogo funcional de la subunidad regulatoria  $IF_1$  en mitocondrias o la subunidad  $\epsilon$  de *E. coli*, ya que esta extensión presenta similitud de secuencia con la  $IF_1$  de varios organismos.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de la extensión carboxilo terminal sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima dimérica por lo que el fragmento correspondiente se clonó, sobre-expresó y purificó, corroborándose su identidad mediante anticuerpos. Al evaluar el efecto de la proteína sobre la hidrólisis de ATP en la enzima dimérica, se observó una inhibición de la actividad de entre 20 a 30%, en contraste con lo que se ha reportado para *Bos taurus*, donde la titulación con la proteína inhibidora  $IF_1$  induce una inhibición completa de la actividad (101). Dado que el complejo V mitocondrial de *Polytomella* sp. presenta 3 extensiones C-T por cada monómero (6 en la enzima dimérica), en contraste con la enzima de *E. coli* que posee sólo un inhibidor por enzima (una subunidad  $\epsilon$ ) (108). El hecho de que la inhibición haya sido

incompleta puede explicarse porque la dinámica de la interacción entre el C-T de la subunidad  $\beta$  con el sitio de inhibición resulta más difícil de evaluar *in vitro*. Es relevante mencionar que en los ensayos realizados el complejo V aún tenía las extensiones endógenas, lo que podría afectar la interacción de la proteína purificada con su sitio de inhibición. Es posible también que el plegamiento de la proteína purificada no fuera el adecuado para mimetizar los efectos de la extensión nativa. Otra posibilidad es que estas extensiones no jueguen un papel regulatorio dentro de la proteína.

Al realizar el ensayo de hidrólisis en un intervalo de temperatura de 15 °C a 60 °C, se observó que la enzima dimérica es capaz de hidrolizar ATP en todo el intervalo evaluado y que el incremento de la temperatura conlleva un aumento en la actividad del complejo, que no es debido a la disociación o la aparición del sector  $F_1$  libre, ya que se mantiene la sensibilidad a oligomicina en todas las condiciones. A partir de estos ensayos, se calculó que la energía de activación asociada a este proceso es de 4.08 Kcal/mol, que es similar a lo reportado para la ATP sintasa mitocondrial (91).

La temperatura a la que se inactiva de manera irreversible la enzima dimérica fue de aproximadamente 38 °C en un periodo de incubación de 10 minutos. Si bien esto contrasta con lo que se observa en curvas de actividad en las que, hasta 60 °C la enzima sigue siendo activa, sería necesario realizar las curvas de incubación de la enzima en periodos más cortos de tiempo y evaluar la actividad enzimática y realizar en paralelo geles azules y claros para evaluar el porcentaje de enzima inactivo en esas condiciones.

Se determinó que la enzima presentó un retraso en los ensayos de actividad asociado a una transición de una forma inactiva a otra totalmente activa; dado que la transición fue relativamente lenta, utilizamos la terminología propuesta por Frieden (109) y le denominamos una respuesta histerética. El fenómeno de la histéresis ha sido descrito previamente para diferentes enzimas y se sabe que puede deberse a cambios conformacionales inducidos por ligando, a la liberación de ligandos o inhibidores o a eventos de polimerización/despolimerización en las enzimas (110). Dado que el complejo V de *Polytomella* sp. es un dímero robusto, la despolimerización o disociación puede descartarse como la causa de la histéresis.

La histéresis en la hidrólisis de ATP se ha descrito para la  $F_1F_0$ -ATP sintasa de *E. coli* (111) y para la  $F_1$ -ATPasa de *Bos taurus* (85). En el caso de *Bos taurus* este comportamiento se ha atribuido, al menos parcialmente, a la unión de ADP en un sitio no catalítico en el sector  $F_1$ , que induce un cambio conformacional a una estructura más compacta (112). En *E. coli*, la histéresis ha sido también atribuida a la unión de ADP y a la transición de la subunidad  $\epsilon$  de una conformación extendida a un estado compacto (113).

El hecho de que el retraso o lag muestra una marcada dependencia con la temperatura sugiere fuertemente que la histéresis en el complejo V de *Polytomella* sp. podría deberse a cambios conformacionales

de la enzima o a la liberación de un péptido inhibitorio del sector  $F_1$ , lo cual concuerda con lo que se ha reportado para la ATPasa mitocondrial de bovino en la que la transición al estado activo es atribuida a la liberación del inhibidor  $IF_1$  (114).

Se ha planteado que la histéresis es relevante *in vivo* ya que provee un mecanismo de amortiguación que permite a la célula responder cuando hay cambios repentinos en las concentraciones de sustratos, lo que previene fluctuaciones grandes en las concentraciones de metabolitos (110), por lo que este fenómeno, observado *in vitro*, podría jugar un papel importante en la regulación *in vivo*.

La enzima dimérica de *Polytomella* sp. es capaz de hidrolizar ATP en un intervalo de pH de 6.0 a 8.5 sin presentar un pH óptimo, a diferencia de la enzima de *Bos taurus* (91) y de bacterias termofílicas (97) que exhiben un pH óptimo alrededor de 8.0. Debido a la histéresis observada previamente, se decidió realizar el ensayo a dos temperaturas: 20 °C y 40 °C para evaluar el efecto del pH sobre el lag o retraso; a 20 °C el lag disminuyó entre pH 6.5 y 7.5 y se incrementó por arriba de 8.0; en contraste, a 40 °C la actividad fue mayor (como se había determinado en los ensayos a temperaturas crecientes) pero el lag fue independiente del pH. Es interesante señalar que el retraso fue dependiente de la temperatura pero no del pH, lo que correlaciona con la gran estabilidad de la enzima dimérica de *Polytomella* sp.

Al evaluar la síntesis de ATP en mitocondrias de *Polytomella* sp. se corroboró que se encontraban integras, evaluando el consumo de oxígeno con diferentes sustratos. Los cocientes respiratorios obtenidos fueron de 1.6 con malato; 1.8 con succinato; 2.2 con NADH y con etanol no se tuvo control respiratorio. Se observó que la actividad de las  $NAD^+$  deshidrogenasas de la matriz mitocondrial era baja, lo que sugiere que durante el aislamiento la poza de  $NAD^+$  se agota (94), por lo que es necesario adicionar  $NAD^+$  en el ensayo para obtener un CR.

Al evaluar el efecto de inhibidores clásicos como oligomicina, cianuro de potasio (KCN), azida de sodio, carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y antimicina A, se encontró que todos los inhibidores que se evaluaron inhibieron entre 60 y 80 % la síntesis de ATP en las mitocondrias; una excepción fue la azida de sodio, que inhibió únicamente el 20 % de la actividad de síntesis de ATP. Es probable que la actividad residual que se detecta se deba a otros procesos no asociados a la cadena respiratoria, como la actividad de la adenilato cinasa.

Las mitocondrias de *Polytomella* sp. son capaces de llevar a cabo la síntesis de ATP, utilizando succinato como sustrato respiratorio. Las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_s$  calculadas para este proceso, a partir de un ajuste a un modelo cooperativo fueron:  $V_{max}$  de 63.45 nmolas/min y  $K_s$  de 23.63 nM con un coeficiente de Hill fue de 1.6, que indica cooperatividad positiva en el complejo.

La mayoría de los estudios cinéticos que se han llevado a cabo con la enzima  $F_1-F_0$  ATP sintasa monomérica o con el sector  $F_1$  libre, han sido realizados con la suposición explícita o no, de que la enzima funciona *in vivo* como un monómero. Si bien se cree que la forma preponderante de la enzima en procariontes es el monómero, se han encontrado dímeros y oligómeros superiores de la enzima en organismos como levadura (15), varias especies de plantas (58), bovino (63) y corazón de rata (115).

La conformación oligomérica del complejo V ha cobrado importancia más allá de su implicación en la síntesis de ATP. Trabajos recientes han demostrado que la enzima se acomoda en las crestas mitocondriales como hileras propiciando el plegamiento de las mismas (61, 116), éstas se han observado en mitocondrias de papa, hongos (62), bovino y rata (61). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la formación de las crestas mitocondriales depende del ensamblaje oligomérico del complejo (62), ya que se ha reportado que la desestabilización de la interacción entre monómeros afecta la organización de la membrana interna mitocondrial así como su estructura (117).

Strauss et al. (61) simularon el campo eléctrico que es generado por la cadena respiratoria en una membrana curvada y propusieron que la oligomerización de la ATP sintasa se traduce en una curvatura local pronunciada en la membrana interna mitocondrial, lo que a su vez favorece el incremento local del  $\Delta\mu H^+$ , optimizando la síntesis de ATP.

Reportes recientes han planteado que al afectar la oligomerización de la ATP sintasa en células de mamífero disminuye la actividad de la fosforilación oxidativa y por tanto la producción de ATP y esto tiene un gran impacto en la ultraestructura mitocondrial (118). Se ha planteado también la hipótesis de que el dímero de la ATP sintasa forma parte del complejo del poro de la transición de la permeabilidad (mPTCP) (119), esto sugiere que la ATP sintasa podría jugar papeles que no se habían sospechado anteriormente en la fisiología celular.

## CONCLUSIONES

- La  $V_{\max}$  de la ATP sintasa dimérica de *Polytomella* sp. purificada se incrementa 50X con la adición de 0.01 % de lauril maltósido en tanto que la  $K_m$  se mantiene igual.
- La enzima dimérica no sigue un comportamiento cinético simple, lo que sugiere que los monómeros presentan un comportamiento cinético asimétrico.
- El sector soluble  $F_1$  presenta una actividad de hidrólisis mayor que la de la enzima dimérica y puede activarse también con 0.01 % de lauril maltósido. La  $V_{\max}$  se duplica en presencia de detergente y la  $K_m$  no se modificó.
- La ATP sintasa dimérica de *Polytomella* sp. se inhibe por DCCD, Mg-ADP y oligomicina.
- La oligomicina actúa como un inhibidor rápido no fuertemente unido, lo que podría explicarse por la presencia de sitios no conservados en residuos que se ha reportado confieren resistencia al antibiótico.
- La extensión carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  inhibe pobremente la actividad de la enzima dimérica entre 20 y 30% en ensayos de hidrólisis de ATP.
- La enzima dimérica es capaz de hidrolizar ATP entre 15 °C y 60 °C con una energía de activación asociada de 4.08 Kcal/mol.
- La  $T_m$  para la enzima dimérica es de 38 °C en un periodo de incubación de 10 minutos.
- La enzima dimérica tiene un comportamiento histerético asociado a una transición de una forma inactiva a otra totalmente activa que podría deberse a cambios conformacionales de la enzima o a la liberación de un péptido inhibitorio del sector  $F_1$ .
- La enzima dimérica de *Polytomella* sp. es capaz de hidrolizar ATP en un intervalo de pH de 6.0 a 8.5.
- Las mitocondrias de *Polytomella* sp. tienen un buen cociente respiratorio con malato, succinato, NADH y con etanol no se tuvo control respiratorio.
- Las síntesis en mitocondrias de *Polytomella* sp. puede abatirse con inhibidores clásicos como oligomicina, cianuro de potasio (KCN), azida de sodio, carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y antimicina A.
- Las mitocondrias de *Polytomella* sp. son capaces de llevar a cabo la síntesis de ATP, utilizando succinato como sustrato respiratorio

## **PERSPECTIVAS**

- Evaluar si el estado oligomérico de la enzima incide en las constantes cinéticas; purificando oligómeros de la enzima y evaluando las constantes.
- Realizar mutagénesis dirigida para eliminar las extensiones del extremo carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  por biología molecular.
- Identificar el mecanismo mediante el cual se activa la enzima con detergente.
- Evaluar porqué la enzima se agrega en ausencia de detergente, lo que se traduce en que esté inactiva.
- Establecer si el detergente libera algún inhibidor de la enzima o tiene algún otro efecto.
- Evaluar si el comportamiento asimétrico que se observa en los monómeros durante la hidrólisis se observa también durante la síntesis.

## MATERIALES Y MÉTODOS



Figura DE (1)



## 1. CULTIVO DE *Polytomella sp.*

Las algas del género *Polytomella* pueden crecer en mezclas de acetato de sodio con triptona y extracto de levadura, ya que pueden obtener nitrógeno de las sales de amonio y el carbono a partir del acetato u otros ácidos orgánicos, siempre y cuando haya tiamina en el medio. *Polytomella sp.* produce almidón en ausencia de acetato y esta producción es independiente de la utilización de ácidos orgánicos (120). El alga *Polytomella sp.* fue cultivada en medio MAP [acetato de sodio 0.4%; MES-ácido 0.78%; solución de Beijerincks ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.008%;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.001%;  $\text{MgSO}_4$  0.0013%); elementos traza ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  0.000025%;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.000002%;  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.00001%;  $\text{MnSO}_4$  0.00002%;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.00001%;  $\text{ZnSO}_4$  0.00002%) y fosfato de potasio 1 mM. Se utilizaron matraces de fondo ancho de 2.5 litros de capacidad. Simultáneamente a la inoculación se adicionaron al medio vitaminas (tiamina ( $\text{B}_1$ ) 0.000002%; cianocobalamina ( $\text{B}_{12}$ ) 0.0000001%), esterilizadas mediante un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Las células se cultivaron durante 48 horas a 25 °C sin agitación, en condiciones aeróbicas.

## 2. OBTENCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

### 2.1 Mitocondrias desacopladas

Se cosecharon las células de *Polytomella sp.* retirando el medio por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos en el rotor JA-10 marca Beckman. Se lavaron con amortiguador de sacarosa (sacarosa 0.3 M, K-EDTA 4 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.4) y se centrifugaron a 2000 x g por 5 minutos en el mismo rotor. El paquete obtenido se resuspendió en el mismo amortiguador y se procedió a romper las células mecánicamente con un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón, con 5 a 8 golpes. El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 2000 x g, la pastilla se homogeneizó nuevamente para romper las células que mantuvieron su integridad en el primer paso, repitiendo también la centrifugación a 2000 x g. El sobrenadante, que es donde se encuentran las mitocondrias, se recuperó en un tubo limpio y se centrifugó a 17000 x g en un rotor JA-25.50 durante 10 minutos. El botón resultante de la centrifugación a alta velocidad corresponde a la fracción mitocondrial, que se resuspende en una pequeña cantidad de amortiguador (entre 1 y 3 mL) y se congela a -70 °C hasta su uso.

### 2.2 Mitocondrias con control respiratorio

Para obtener mitocondrias con control respiratorio se procedió a realizar el aislamiento utilizando el método de Guérin et al. (93), con las modificaciones descritas en Jiménez et al. (94). Las células se cultivaron como se describió en el punto 1 y transcurrido el tiempo de crecimiento se cosecharon por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos en el rotor JA-10 marca Beckman; todos los pasos subsecuentes se realizaron a 4 °C. El botón obtenido se resuspendió en el amortiguador A (Sorbitol desionizado 0.375 M; manitol desionizado 0.2 M; Tris-maleico 10 mM pH 6.8; BSA libre de ácidos grasos 0.1 %) y se centrifugó nuevamente a 2000 x g por 5 minutos en el mismo rotor. El paquete obtenido se resuspendió nuevamente en el mismo amortiguador adicionado con PMSF

(2 mM) y EDTA (1 mM, pH 8.1), manteniendo la relación 0.5 g de peso húmedo por cada ml. Se procedió entonces a romper las células mecánicamente con un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón con 3 golpes, evitando hacer espuma. El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 2000 x g y el sobrenadante se recuperó en un tubo limpio y se centrifugó a 17000 x g en un rotor JA-25.50 durante 10 minutos. Este procedimiento se llevó a cabo 2 veces, obteniendo así un botón de mitocondrias, que se resuspendió en 200 µl de amortiguador A, con ayuda de un pincel con cerdas de pelo fino. Se determinó la concentración de proteína de las mitocondrias aisladas mediante el método de Biuret (121)

### **3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR LOS MÉTODOS DE LOWRY Y BIURET**

#### **3.1 Método de Lowry (122)**

La muestra problema y los estándares (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg) de albúmina sérica bovina (BSA) se aforaron a 1 ml con agua destilada. Se adicionaron 3 ml de una mezcla 100:1 de la solución A (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.4 % NaOH, 0.16% tartrato Na-K y 1 % SDS) y la solución B (4 % CuSO<sub>4</sub>) a cada muestra y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para generar complejos cobre-proteína. Transcurrido el tiempo se adicionaron 300 µl de reactivo Folin-Cicolteau (Sigma) diluido 1:1 con agua destilada y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Durante este tiempo se desarrolla un color azul debido a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (reactivo de Folin), por los complejos cobre-proteína. La absorbencia de las muestras se leyó a una longitud de 540 nm, y se utilizó la curva estándar para interpolar los datos obtenidos de las muestras problema.

#### **3.2 Método de Biuret (121)**

La muestra problema y los estándares (20, 40, 60, 80, 100, 150 y 200 µg) de albúmina sérica bovina (BSA) se aforaron a 100 µl con agua destilada. Se adicionó 1 ml de reactivo de Biuret (0.4 % CuSO<sub>4</sub>, 0.75 % EDTA-Na, 1 N NaOH, 0.1 % KI) a cada muestra y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de un complejo coloreado entre el Cu<sup>2+</sup> y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La absorbencia de las muestras se leyó a una longitud de 545 nm, y se utilizó la curva estándar para interpolar los datos obtenidos de las muestras problema.

### **4. ENSAYOS DE OXIMETRÍA**

Para evaluar si las mitocondrias estaban acopladas, es decir, si podían generar y mantener un potencial electroquímico, se midió el consumo de oxígeno. Se utilizó un oxímetro Oxygen Meter 782, Strathkelvin Instruments, UK. Las mediciones se hicieron en medio de oximetría (manitol 0.6 M, MES 5 mM pH 6.8, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 200 µM, NAD<sup>+</sup> 2 mM, ADP 200 µM). Como sustratos oxidable se ensayaron etanol (120 mM), malato

(10 mM) y succinato (1 - 10mM). Las reacciones se realizaron a 25 °C en un volumen final de 100 µl y el cociente respiratorio de las mitocondrias se calculó a partir del consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia del sustrato oxidable (estado II) y en el estado activo (estado III), en presencia de ADP (2 mM), donde se promueve el aumento en la transferencia de electrones, el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP. Se supuso que la tasa de respiración en el estado II es similar al estado IV, por lo que el control respiratorio mitocondrial (C.R.) se calculó a partir de la relación del consumo de oxígeno de los estados III y II. Todos los ensayos hechos con mitocondrias acopladas se realizaron con preparaciones frescas de mitocondrias, dado que éstas son incapaces de mantener el control respiratorios al ser congeladas y descongeladas.

##### **5. PURIFICACIÓN DE LA ATP SINTASA DE *Polytomella* sp.**

Se determinó la concentración de proteína de las mitocondrias mediante el método de Lowry (122). Las mitocondrias se diluyeron a una concentración final de 10 mg/ml de proteína, con amortiguador de solubilización (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; NaCl 100 mM; PMSF 1mM y TLCK 50 µg/ml). Se adicionó lentamente el detergente n-dodecil-β-D-maltósido (LM), disuelto en una pequeña cantidad de amortiguador de solubilización, en una relación final de 2 g de LM por 1 g de proteína, para solubilizar las membranas mitocondriales y liberar así los complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna. El solubilizado se dejó en agitación por 30 minutos a 4 °C y transcurrido el tiempo, se centrifugó a 90 000 x g por 35 minutos en el rotor 60 Ti. El sobrenadante se recuperó y se dializó en agitación, por al menos 5 horas en amortiguador de diálisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; MgSO<sub>4</sub> 1 mM), utilizando una membrana SpectraPor con un corte de 12 a 14000 Da, previamente hidratada en agua destilada.

El dializado se cargó en una columna de intercambio aniónico DEAE-Biogel A con un volumen de columna de aproximadamente 80 ml, equilibrada previamente con amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; lauril maltósido 0.1 mg/ml; PMSF 1 mM y TLCK 50 µg/ml). Una vez cargada la muestra, se lavó con 3 volúmenes de amortiguador de equilibrio, colectando todo el volumen de elución en un vaso de precipitado. La ATP sintasa se eluyó con un gradiente de 0 a 125 mM de cloruro de sodio disuelto en amortiguador de equilibrio. Se colectaron las fracciones y se midió la absorbencia a 280 nm para detectar los máximos correspondientes a las proteínas de interés. Simultáneamente, se corrió un gel de tricina-SDS con las diferentes fracciones recolectadas, principalmente con aquellas que presentaran máximos de absorción, de acuerdo al perfil obtenido a partir de la absorbencia a 280 nm (ver Apéndice I). La citocromo c oxidasa y el complejo bc<sub>1</sub> se eluyeron con 200 y 400 mM de cloruro de sodio, respectivamente. Las fracciones de interés se juntaron y se concentraron utilizando una unidad de filtración Centricon con una membrana de 3,500 Da. Para purificar ulteriormente a la ATP sintasa, una fracción de la muestra concentrada se cargó a un gradiente continuo de glicerol del 15 al 50% en amortiguador de Lutter

modificado (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; ATP 2 mM; lauril maltósido 0.1 mg/ml; EDTA-Na 1 mM; PMSF 1 mM y TLCK 50 µg/ml). El gradiente se centrifugó a 40 000 x g por 17 horas en el rotor SW-28. Se colectaron las fracciones y se detectó la ATP sintasa por medio de geles nativos y desnaturalizantes de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. Finalmente, se concentraron las fracciones donde se encontraba la enzima utilizando una unidad de filtración Centricon con una membrana de 10,000 Da. y se cuantificó la concentración final de proteína por el método de Lowry.

## **6. OBTENCIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS**

### **6.1 Preparación de proteoliposomas de ATP sintasa dimérica**

Se preparó una solución madre de asolectina de soya (10 mg/ml), sonicando en presencia de un amortiguador que contenía 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub> y 0.5% de colato de sodio. La solución se sonicó hasta que se encontraba totalmente clara y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Posteriormente, se mezcló ATP sintasa dimérica purificada con asolectina de soya en una relación molar 1:5 (proteína:lípido) y se añadió colato de sodio a una concentración final de 1.5%. La mezcla se incubó en hielo por al menos una hora y se dializó toda la noche en un cassette de diálisis con una membrana de 4KDa contra un amortiguador que contenía 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM KCl y 3 mM MgSO<sub>4</sub>. El dializado se recuperó utilizando una jeringa y las vesículas se prepararon utilizando una prensa de French estándar con un diámetro interno de 2.5 cm y una capacidad de 10 ml. La preparación se filtró utilizando una membrana de 200 nm a una temperatura controlada de 25 °C. La muestra se circuló diez veces a través del “extruder” y los liposomas se recuperaron en un tubo estéril y se almacenaron en hielo hasta su uso.

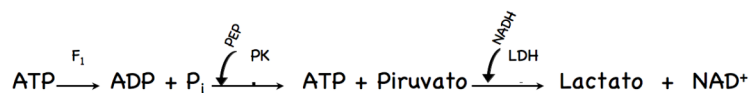
### **6.2 Ensayos de hidrólisis de ATP en proteoliposomas.**

Para evaluar la actividad de hidrólisis de ATP en los proteoliposomas se siguió el protocolo que se muestra en el inciso 7.1. Para los controles con oligomicina, los liposomas se preincubaron con 20 µg/mg de oligomicina por al menos 20 minutos en hielo y se ensayó la actividad en ausencia o presencia del inhibidor en la celda (ver inciso 8). Para evaluar el efecto del carbonil cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP), los liposomas se preincubaron en hielo con 10 µM del desacoplante, a partir de una solución en etanol, por al menos 20 minutos. Posteriormente, se evaluó la hidrólisis de ATP como se explica en el inciso 7.1.

## 7. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE Mg-ATP

### 7.1 Método de Pullman (acoplado)

Se utilizó el método reportado por Pullman et al., (74) optimizado por las Doctoras Mariel Zarco Zavala y Marieta Tuena de Gómez-Puyou (IFC-UNAM) para el estudio de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. El ensayo está basado en la reacción acoplada de las enzimas piruvato cinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) que muestra a continuación:



El ATP es hidrolizado por el sector  $F_1$  de la ATP sintasa, dando como productos ADP y  $P_i$ . El ADP, a su vez, es tomado como sustrato junto con el fosfoenolpiruvato (PEP) por la piruvato cinasa (PK) para dar como producto piruvato y ATP, manteniéndose así una concentración constante de ATP y una baja concentración de ADP, que es un potente inhibidor de la hidrólisis. El piruvato es a su vez tomado por la lactato deshidrogenasa (LDH) junto con NADH, dando como productos lactato y  $\text{NAD}^+$ . El NADH que es oxidado en la reacción es directamente proporcional al ATP que ha sido hidrolizado por la enzima. Al amortiguador de ensayo ( $\text{MgSO}_4$  3 mM, KCl 30 mM, Tris- $\text{SO}_4$  25 mM pH 8.0) se adicionaron: PEP 3 mM, Mg-ATP 3 mM, NADH 0.3 mM PK 3 U, DHL 4.5U. El Mg-ATP se disolvió en agua destilada y se ajustó a pH 8.0 con Tris-base en polvo. El PEP y NADH se disolvieron en amortiguador de ensayo. Las concentraciones de ATP y NADH de las soluciones madre se determinaron utilizando el coeficiente de extinción molar: ATP (15.4 mM/cm, 259nm) y NADH (6.22 mM/cm, 340nm). Todas las soluciones madre se alicuotaron y se almacenaron a  $-70$  °C por hasta 3 meses. Los trazos se comenzaron añadiendo la enzima o el sustrato en el caso de las curvas de saturación de Mg-ATP, la adición se hizo utilizando un agitador plano (gendarme de plástico).

La actividad específica ( $\mu\text{molas}/\text{min mg}$ ) de hidrólisis se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica} = [ (\Delta\text{Abs}_{340}/\text{tiempo}_{\text{min}}) ] / [ (\varepsilon C_{\text{enzima}}/V_f) ]$$

Donde:

$\Delta A_{340}$  : Cambio de absorbencia a 340 nm

$\varepsilon$  : coeficiente de extinción del NADH =  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$C_{\text{enzima}}$  = concentración de enzima utilizada en el ensayo ( 0.02 mg)

### 7.1.2 Evaluación de la hidrólisis a diferentes pHs

El experimento se realizó de manera similar a lo indicado en el inciso 6.1. El amortiguador Tris-HCl fue sustituido por una combinación de amortiguadores cuyos pKas se encuentran en el intervalo de pH que se estudió (6.0 a 8.5). Estos fueron Tris (pKa 8.06), MES (pKa 6.15) y MOPS (pKa 7.28). Se hizo una mezcla de los 3 amortiguadores a una concentración final de 25 mM cada uno y se ajustó al pH deseado para el ensayo final a temperatura ambiente. Todos los demás reactivos, así como el procedimiento del ensayo, fueron idénticos a los que se muestran en el inciso 6.1. Los ensayos se realizaron a 25 °C al menos por triplicado con duplicados en todas las condiciones.

### 7.1.3 Ensayos a diferentes temperaturas

El experimento se realizó de manera similar a lo indicado en el inciso 6.1. Para realizar el ensayo a diferentes temperaturas el amortiguador Tris-HCl fue ajustado al pH calculado utilizando la siguiente página: <http://www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html>, en la que introduciendo el tipo de amortiguador a usar, volumen, concentración final y temperatura a la que se hará el ajuste y el uso del amortiguador, se calcula a qué pH debe ajustarse para que al elevar la temperatura del mismo el pH final sea 8.0. El ensayo se realizó utilizando un espectrofotómetro Agilent Cary 60 acoplado a un baño de temperatura constante con recirculación, midiendo la temperatura con un termómetro. El medio de ensayo se introdujo en el baño de temperatura constante por al menos 20 minutos; posteriormente, se tomó 1 ml del medio y se añadió en la celda junto con los demás reactivos del ensayo (PEP 3 mM, Mg-ATP 3 mM, NADH 0.3 mM PK 3 U, DHL 4.5U) y el trazo se comenzó adicionando a la enzima utilizando un gendarme de plástico y agitando con el mismo. Como control de reacción para evaluar que el sistema de enzimas acoplantes siguiera funcional a 60 °C se realizó un control adicionando en lugar de enzima Mg-ADP, de forma tal que si las enzimas siguen siendo funcionales, se observaría un cambio rápido en la pendiente, como fue el caso. Los ensayos se realizaron a 25 °C al menos por triplicado con duplicados en todas las condiciones y se revisó que el pH fuera el esperado a la temperatura del ensayo, utilizando tiras de papel pH.

#### 7.1.3.1 Cálculo del tiempo de retraso o lag

Para determinar el tiempo de relajación o lag se utilizó la ecuación  $P_t = V_{ss}t - (V_{ss} - V_i)(1 - \exp(-t/\tau))\tau$  (110), donde;  $V_i$  es la velocidad inicial,  $V_{ss}$  la velocidad de estado estacionario y  $\tau$  el tiempo de relajación. El tiempo de retraso o lag se calculó utilizando la ecuación  $((V_{ss} - V_i)/V_{ss})\tau$  (110). Se introdujeron los datos obtenidos de los ensayos de hidrólisis a diferentes temperaturas y en diferentes pHs en el programa SigmaPlot y se realizó el ajuste a la ecuación mencionada anteriormente para obtener los parámetros.

## 7.2 Método de Chifflet (colorimétrico)

Para medir la hidrólisis de ATP, en presencia de ADP, se utilizó el método reportado por Chifflet et al. (75), modificado por González-Romo *et al.* (76) para llevar a cabo el ensayo en presencia de concentraciones altas de ATP. En este método se cuantifica el Pi que se libera en la reacción de hidrólisis de ATP y está basado en una reacción colorimétrica en la que se da la formación de un complejo de fosfomolibdato en medio ácido, seguido por la reducción con un tinte básico que da lugar a un complejo colorido.

El ensayo se realizó en tubos de vidrio lavados con ácido sulfúrico concentrado (ver apéndice II) y dado que el ATP se hidroliza rápidamente en condiciones ácidas se realizaron blancos para cada condición, El amortiguador en el que se llevó a cabo la reacción fue igual al utilizado para el ensayo acoplado ( $\text{MgSO}_4$  3 mM, KCl 30 mM, Tris- $\text{SO}_4$  2 M pH 8.0) con o sin la adición de ADP. En los tubos de vidrio se adicionó el volumen adecuado de la enzima y se llevó a un volumen final de 150  $\mu\text{l}$  con el amortiguador de reacción.

Los ensayos se llevaron a cabo en un baño de temperatura constante a 30 °C y la reacción se dejó proceder durante el tiempo indicado y se detuvo con 150  $\mu\text{l}$  de la solución A (SDS 12 %) y los tubos se pusieron en hielo. Concluido el experimento, se colocaron los tubos en baño maría para solubilizar el SDS (que se precipita al colocar los tubos en hielo) y se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de la solución D, que consiste en una mezcla 1:1 de las soluciones B (ácido ascórbico 12 % en HCl 1 N) y C (molibdato de amonio 2 % en HCl 1N). La reacción se dejó proceder de 3 a 7 minutos y transcurrido este tiempo se adicionaron 450  $\mu\text{l}$  de la solución E (citrato de sodio 2%, metarsenito de sodio 2% en ácido acético 2% en agua). La reacción se dejó por al menos 20 minutos a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se leyeron los tubos a una longitud de onda de 850 nm. De forma simultánea se preparó una curva estándar de Pi, a partir de una solución madre de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1mM. Se adicionaron alícuotas equivalente a 2 a 100 nmol en tubos de vidrio y se llevaron a un volumen final de 150  $\mu\text{l}$  con agua bidestilada y se siguió el mismo protocolo que con las muestras problema. La concentración de Pi se calculó interpolando los valores de absorbencia obtenidos para las muestras problema en la curva estándar de Pi, a partir de la ecuación obtenida para la recta:

$$y = mx + b$$

Donde:

y= Absorbencia a 850 nm

m= pendiente

x= concentración de Pi

b= intercepto en el eje de las abscisas

### **7.3 Método de Zerbetto para actividad *in gel***

Se utilizó el método reportado por Zerbetto et. al (92), modificado por Schägger. Las modificaciones fueron las siguientes: dado que se ha visto que el azul de Coomassie puede interferir se utilizaron geles claros (CN-PAGE) para evaluar sensibilidad a oligomicina y para incrementar la actividad, los geles se pre-incubaron los geles durante tres horas en el amortiguador descrito a continuación.

El principio de esta técnica se basa en la formación de precipitados de plomo al hidrolizarse el ATP. El nitrato de plomo que se adiciona en el amortiguador reacciona con el fosfato inorgánico liberado para formar fosfato de plomo, que se aprecia a simple vista como un precipitado blanquecino en el gel.

El procedimiento consistió en realizar electroforesis nativa o clara (BN/CN- PAGE) como se muestra en el inciso 9.1 y concluida la corrida, los geles se pre-incubaron por 3 horas en amortiguador de incubación (270 mM glicina, 35 mM Tris, pH 8.4) en agitación y en ausencia o presencia de oligomicina a una concentración final de 5 µg/ml. Posteriormente se retiró el amortiguador de incubación y se colocó amortiguador de actividad (270 mM glicina, 35 mM Tris, 8 mM ATP, 14 mM MgSO<sub>4</sub> y 0.2 % Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH 8.4). La reacción se dejó durante toda la noche y transcurrido el tiempo se detuvo con una solución de metanol 50 % y para retirar el excedente de precipitado se adicionó una solución de metanol 50 % y 10 % ácido acético. Al terminar se digitalizaron las imágenes de los geles en un escáner HP y se procedió a teñir con azul de Coomassie.

### **8. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y PRUEBAS DE OLIGOMICINA Y DCCD**

Para evaluar el efecto de la oligomicina sobre la ATPasa dimérica se incubó a la enzima en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor (0.01 µg/ml - 5 µg/ml) y se dejaron incubando en hielo por al menos 30 minutos; transcurrido este tiempo se procedió a realizar el ensayo de hidrólisis por el método de Pullman. En el caso de los trazos en los que se evaluó el efecto de la incubación, no se añadió el inhibidor en la celda sino únicamente el vehículo (DMSO); para los trazos en los que se evaluó la preincubación y la presencia del inhibidor en la celda, se añadió la misma concentración del inhibidor en la celda. Todos los ensayos se hicieron con lauril maltósido a una concentración final de 0.01%. En los controles se puso dimetilsulfóxido (DMSO) de forma análoga a los trazos problema.

Para evaluar el efecto del inhibidor DCCD (N,N-diciclohexilcarbodiimida) sobre la hidrólisis de ATP se incubó a la enzima dimérica por al menos 30 minutos en hielo con las siguientes concentraciones del inhibidor disuelto en etanol: 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM, 1 mM y 2 mM. Se adicionó lauril maltósido en la celda (0.01% final) y en los controles se puso etanol.



## **9. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)**

### **9.1 Geles nativos azules y claros (BN/CN-PAGE)**

Se realizó de acuerdo a Schägger (64) en mini geles de 84 x 73 x 1.5 mm. El gel concentrador se preparó al 4.2 % T, 3 % C con una composición (0.5 M ácido  $\epsilon$  amino caproico, 50 mM Bis-Tris- HCl, pH 7.0 ) y el separador fue un gradiente lineal continuo del 4 al 12 % T, 3 % C con composición (0.5 M ácido  $\epsilon$  amino caproico, 50 mM Bis-Tris- HCl, pH 7.0, 20 % glicerol). Ambos fueron polimerizados con persulfato de amonio y TEMED, el gel concentrador se añadió al separador sin permitir que se polimerizara el segundo para procurar que la interfase entre ambos fuera continua.

Los amortiguadores de corrida para los geles azules fueron los siguientes: cátodo (50 mM tricina, 15 mM bis-tris, 0.002 % azul de coomassie Serva G) y ánodo (50 mM bis-tris-HCl, pH 7.0). En el caso de los geles claros, la composición de los amortiguadores fue idéntica para el ánodo y para el cátodo, pero no se adició el azul de coomassie.

Antes de cargar las muestras se combinaron en una relación 1:5 carga-proteína con amortiguador de carga (50 mM ácido  $\epsilon$  amino caproico, 50 mM bis-tris-HCl, pH 7.0, 5% azul de coomassie Serva G). La electroforesis se realizó en cámaras mini-Protean de Bio Rad a 15 mAmp a temperatura de 4 °C por alrededor de 1.5 horas hasta que el frente se encontraba a 0.5 cm del borde del gel. Posteriormente los geles se fijaron y se tiñieron con azul de Coomassie. Las soluciones del concentrador y separador se prepararon a partir de las siguientes soluciones madre: acrilamida 48.5 % - bis-acrilamida 1.5 %; amortiguador electroforético (1.5M ácido  $\epsilon$  amino caproico, 150 mM Bis-Tris- HCl, pH 7.0 ); glicerol 80 %; APS 10%; TEMED (Sigma).

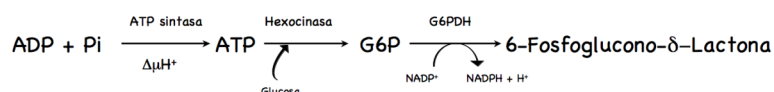
### **9.2 Geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Se realizó de acuerdo a Schägger (123) en mini geles de 84 x 73 x 1.5 mm. El gel concentrador se preparó al 4.13 % T, 3.14 % C con una composición (tris 1.2M, HCl 0.4 N, SDS 0.12 %) y el separador fue continuo al 14.45 % T, 3.16 % C con una composición (tris 1.2M, HCl 0.4 N, SDS 0.12 %, glicerol 10.6 %). Ambos fueron polimerizados con persulfato de amonio y TEMED. Los amortiguadores de corrida fueron: cátodo (tris 0.1 M, tricina 0.1 M, SDS 0.1%) y ánodo (tris-HCl 0.2 M pH 8.9). Antes de cargar las muestras se combinaron en una relación 1:5 carga-proteína con amortiguador de carga (SDS 10 %, glicerol 30 %, tris-HCl 100 mM , azul de bromo fenol 0.3 %,  $\beta$  mercapto etanol 4 %).

La electroforesis se realizó en cámaras mini-Protean de Bio Rad a 120 V a temperatura ambiente por alrededor de 2 horas hasta que el frente se encontraba a 0.5 cm del borde del gel. Los geles se tiñieron con azul de Coomassie o se transfirieron para realizar inmunorréplicas como se describe posteriormente. Las soluciones del concentrador y separador se prepararon a partir de las siguientes soluciones madre: acrilamida 30 % - bis-acrilamida 0.98 %; amortiguador electroforético (tris 3M, HCl 1 N, SDS 0.3 %); glicerol 79.5 %; APS 10%; TEMED (Sigma). Los amortiguadores de corrida se prepararon a una concentración 10 X y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

## 10. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE SÍNTESIS DE Mg-ATP

La síntesis de ATP se midió en mitocondrias aisladas mediante un ensayo acoplado a la reducción de NADP<sup>+</sup> (96). La mezcla de reacción fue 375 mM sorbitol desionizado; 200 mM manitol desionizado; 10 mM Tris-maleico, pH 6.8, 1 mM succinato, 0.5 mM Mg-ADP, 4 mM fosfato, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucosa, 0.2 mg/ml hexocinasa (HK), 2 U/ml glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), 1.5 mM NADP<sup>+</sup>. La reacción que se lleva a cabo se muestra a continuación:



La reacción se inició con la adición de mitocondrias ( 0.5 mg de proteína). Las velocidades iniciales de producción de NADPH (coeficiente de extinción molar 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), se siguieron a temperatura ambiente a 340 nm de absorbencia en 1 ml de mezcla de reacción y corresponden al ATP producido. En paralelo para cada trazo se realizó un trazo de mitocondrias incubadas con el inhibidor oligomicina ( 5 µg/ml) por al menos 20 minutos. La cantidad de ATP sintetizado se calculó utilizando la siguiente fórmula. La concentración de ATP se reporta como la actividad que fue sensible a oligomicina y se obtuvo al restar del trazo problema el trazo en presencia de oligomicina.

$$\text{Actividad específica} = [ (\Delta\text{Abs}_{340} / \text{tiempo}_{\text{min}}) ] / [ (\epsilon C_{\text{mitocondrias}} / V_f) ]$$

Donde:

$\Delta A_{340}$  : Cambio de absorbencia a 340 nm

$\epsilon$  : coeficiente de extinción micromolar del NAPDH = 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$C_{\text{mitocondrias}}$  = concentración de enzima utilizada en el ensayo (0.5 mg)

## 11. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENZIMA INACTIVADA IRREVERSIBLEMENTE

Para calcular la  $T_m$  de la enzima dimérica, se depositaron 200  $\mu\text{g}$  de enzima en tubos de precipitado, lavados con ácido sulfúrico; posteriormente se colocaron los tubos en hielo y se puso a temperar un baño maría a la temperatura indicada, monitoréandose con un termómetro. Se colocó el tubo dentro del baño por 10 minutos, siguiendo el tiempo con un cronómetro y transcurrido éste, se enfrió la muestra en un vaso con agua a temperatura ambiente. Se tomaron alicuotas de la muestra para medir actividad por el método de Pullman o para hacer geles nativos azules o claros de la enzima incubada a diferentes temperaturas

## 12. CARBOXILO TERMINAL SUBUNIDAD $\beta$

### 12.1 Clonación del fragmento C-T del gen *atp2* a partir de una genoteca de cDNA

El gen *atp2* de *Polytomella sp.* se amplificó a partir de una genoteca de cDNA en fago lambda utilizando los cebadores descritos a continuación que incluyen tanto el codón de inicio como el codón de terminación:

Cebador en Sentido: 5'- gcg **gga tcc** atg gcc aag gat att gct tcc -3'

Cebador Antisentido: 5'-gcg **aag ctt** att gag aat taa ttg gac gaa caa caa tga caa c-3'

En ambos cebadores se incluyeron los sitios de restricción *Bam*HI (negritas) y *Hind*III (gris) para su posterior clonación. El gen se amplificó por PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, posteriormente, se realizaron 30 ciclos de reacción diseñados como sigue: desnaturalización del DNA a 94°C por 30 segundos, seguido de 60 segundos de alineamiento a 65°C y 90 segundos de extensión a 72°C; finalmente, incubamos la mezcla de reacción a 72°C durante 10 minutos.

El producto de PCR resultante de alrededor de 230 pares de bases, se purificó mediante el sistema comercial de extracción de gel (Quiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto de PCR se clonó entonces en el vector pGEM (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  para su mantenimiento. Se purificó DNA de las colonias seleccionadas para comprobar la presencia del gen que corresponde al fragmento C-T de *atp2* de *Polytomella sp.* mediante restricción; además se secuenciaron un par de clonas en la Unidad de Biología Molecular del IFC y comprobamos 100% de identidad entre las clonas que obtuvimos y las secuencias reportadas en la literatura para este gen. El inserto del vector pGEM fue cortado y religado al vector pET28 previamente cortado y desfosforilado; el vector pET28 codifica para una etiqueta de 6 histidinas que se utilizó posteriormente para purificar a la proteína correspondiente. Esta construcción se transformó en las cepas de *E. coli* DH5a para almacenarla y en la cepa BL21 codon plus para la sobreexpresión de la proteína.

Las bacterias competentes se transformaron por choque térmico a 42°C por 45 segundos. Se analizaron ocho clonas transformadas con el pET28-b y se observó que todas ellas tenían al inserto presente. Se decidió seguir trabajando con dos de ellas para evaluar la sobreexpresión de la proteína.

### **12.2 Ensayos de sobre expresión en *Escherichia coli* BL21**

Se cultivó a las bacterias en medio LB (1% bactotripton, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl) adicionado con 50 µg/ml cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina. Se inocularon 2 litros de medio con la cepa transformada y se dejaron crecer a 25, 30 y 37 °C hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de 0.6. Se añadió entonces, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 0.1 mM para inducir la sobre-expresión y se dejó creciendo por 12 horas más. De las tres temperaturas evaluadas se observó que a 37 °C se tenía la mejor sobre-expresión, que comienza desde las 3 horas post inducción y alcanza un máximo a las 10 horas.

#### **12.2.1 Determinación de la localización de la proteína**

Para conocer si la proteína sobre-expresada se mantenía de forma soluble o se iba a cuerpos de inclusión se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en PBS (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl) con 10 mM de imidazol y se rompieron por sonicación (3 ciclos de 1 minuto de ruptura con 1 minuto de incubación en hielo) a 5W, con 50% de señal de salida. Después se centrifugó lo sonificado y se cargó en un gel de tricina-SDS una alícuota del sobrenadante (fracción soluble) y de la pastilla (fracción insoluble). La fracción insoluble se calentó a 60 °C por 5 minutos. Se colocó como control la misma cepa transformada con el vector pET28 vacío.

#### **12.3 Purificación de la proteína a partir de *Escherichia coli* BL21 transformada con el vector.**

El análisis del perfil electroforético mostró que la proteína se encontraba en la fracción soluble, por ello el acercamiento experimental para su purificación consistió en cosechar las células de un cultivo de 2L inducido durante toda la noche con 0.1mM de IPTG, resuspenderlas en PBS y romperlas por sonicación (7 ciclos de 1 minuto de ruptura/1 minuto de descanso). La fracción soluble se obtuvo centrifugando a 10,000 rpm durante 20 minutos. Se adicionaron al sobrenadante los inhibidores de proteasas TLCK y PMSF (1 mM) y se recirculó durante toda la noche con la resina de níquel-sefarosa (His-Trap) a 4 °C. Posteriormente, se lavó la columna con 3 volúmenes de columna de Imidazol 30 mM y después se colocó un gradiente de 0 a 500 mM de Imidazol y se colectaron fracciones, se corrieron en un gel de tricina-SDS, aquellas donde se observaba la proteína se dializaron para eliminar la sal y posteriormente se cargó a una columna de intercambio iónico (Source 15Q), se eluyó a la proteína con un gradiente de 0-500 mM de NaCl, nuevamente se detectó en qué fracciones se encontraba la proteína mediante un gel de tricina-SDS y se procedió a concentrar con una unidad de filtración centricon de 10

kDa, de acuerdo al perfil electroforético se concentraron 3 picos y se determinó la concentración de los 2 primeros por el método de Lowry, para los ensayos subsecuentes se utilizó el primer pico.

Para realizar pruebas de inmunodetección de la proteína, se transfirió uno de los geles utilizando una cámara semi seca a una membrana de PVDF por 1.5 horas utilizando el amortiguador de transferencia (25 mM tris pH 8.3, 190 mM glicina y 20% metanol). La membrana se tiñó con Ponceau S (0.2% w/w de rojo de Ponceau Sen 5% de acético glacial) para evaluar la transferencia y posteriormente se bloqueó con gelatina al 0.3%, disuelta en amortiguador TBST (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.1% Tween 20). La membrana se incubó, a temperatura ambiente por al menos 2 horas con los anticuerpos siguientes: anti  $\beta$  de *Polytomella sp.* (1:100, 000) y anti-etiqueta de hexahistidinas (1:15,000), diluidos en amortiguador TBST.

#### 12.4 Evaluación del efecto de la extensión purificada sobre la hidrólisis de ATP

Para evaluar el efecto de la proteína purificada sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima dimérica, se incubó a la enzima en presencia de concentraciones crecientes (en relación molar) del péptido purificado en tris- HCl 20 mM pH 8.0 por al menos 20 minutos en hielo. Posteriormente se evaluó la actividad de la enzima utilizando el método de Pullman, en las condiciones que se indican, adicionando lauril maltósido a una concentración final de 0.01 %.

### 13. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

#### 13.1 Alineamiento de secuencias de la subunidad $\alpha$

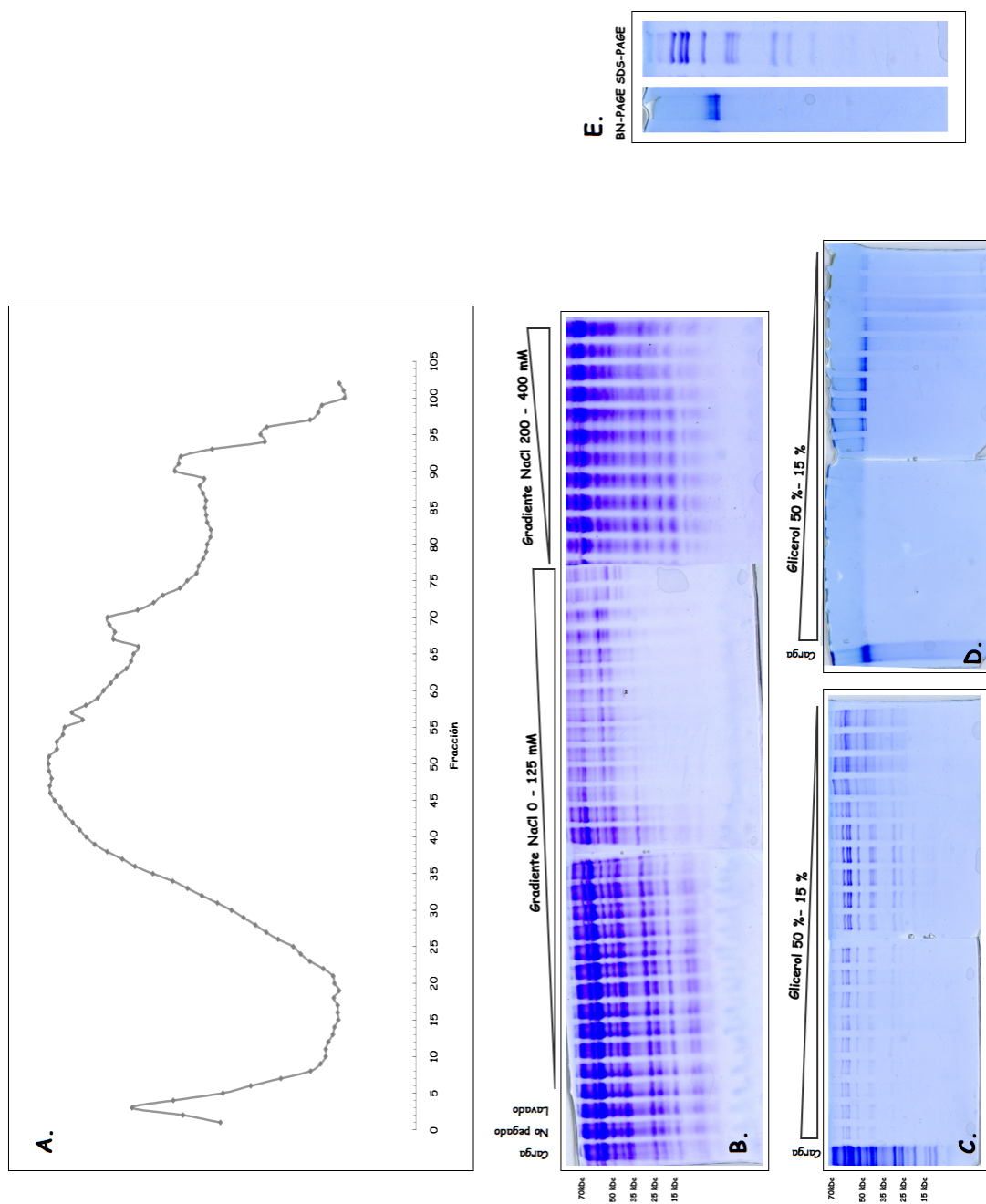
Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* (GI:6226533); *Bos taurus* (GI:84202593); *Homo sapiens* (GI:50659074) y las algas *Polytomella sp.* (GI:294494193); *Chlamydomonas reinhardtii* (GI:158271592) y *Volvox carteri* f. nagariensis (GI:302850172) utilizando el programa Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation (MUSCLE) ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle)) (124) para identificar a los aminoácidos conservados, así como a los que conforman el sitio de unión de múltiples antibióticos y aquellos involucrados en la translocación de protones y en la unión a DCCD.

#### 13.2 Alineamiento de secuencias de la subunidad $\beta$

Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *Escherichia coli* (GI: 930122600); *Bos taurus* (GI:28461221) y las algas *Polytomella sp.* (GI:119416492); *Chlamydomonas reinhardtii* (GI:158278978) y *Ostrecoccus tauri* (GI: 145342447) utilizando el programa Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation (MUSCLE) (124) para identificar a la parte correspondiente a la extensión en la región carboxilo terminal de la proteína

## APÉNDICE I

### PURIFICACIÓN DE ATP SINTASA DE *Polytomella* sp.



**Apéndice I.** Purificación de ATP sintasa de *Polytomella* sp. a partir de mitocondrias. **A.** Se muestra el perfil cromatográfico obtenido de la purificación de ATP sintasa utilizando un gradiente de NaCl 0-125 mM. **B.** Gel SDS-PAGE de las fracciones que se muestran en el panel A. Geles SDS-PAGE (**C.**) y BN-PAGE (**D.**) de las fracciones que se colectaron al someter a la enzima concentrada del panel A a un gradiente de glicerol del 15 al 50%. **E.** Geles SDS y BN - PAGE de la enzima concentrada después del gradiente de glicerol.

**APÉNDICE II****TÉCNICA DE LAVADO DE TUBOS CON ÁCIDO SULFÚRICO**

El lavado del material a emplear mediante esta técnica permite que los recipientes de vidrio estén libres de fosfatos, provenientes principalmente de los detergentes usados en el lavado del material. Los fosfatos si no son removidos pueden afectar la cuantificación de hidrólisis de ATP medida por la técnica de Chifflet modificada por la Doctora Marina Gavilanes Ruiz y colaboradores (Facultad de Química) (76).

- Se debe lavar el material de manera normal, con escobillón y detergente libre de fosfatos, como Extran.
- Posteriormente, se sumerge por completo el material totalmente seco en una tina con ácido sulfúrico de grado técnico. Éste paso se debe llevar a cabo con MUCHO CUIDADO y teniendo precaución de colocar el material poco a poco en el ácido, evitando que éste salpique. Vestir bata, careta y guantes de uso doméstico.
- Se debe dejar el material dentro del ácido por al menos 24 horas.
- Transcurrido el tiempo se sacan los tubos de la tina con cuidado, escurriendo el ácido en la tina y evitando salpicaduras.
- Cuando los tubos se han escurrido del ácido, se ponen lentamente en un recipiente con agua corriente para remover el exceso de ácido.
- Después se enjuagan los tubos con agua destilada para eliminar las sales del agua corriente y el ácido residual y se meten a secar los tubos a un horno.
- El material de vidrio se almacena hasta su uso en un lugar cerrado.

**Notas importantes:**

- El recipiente para el ácido debe ser de plástico grueso y flexible.
- El recipiente con el ácido debe colocarse en la campana de extracción, en un lugar aislado, para que los vapores se concentren ahí.
- Debajo del recipiente se debe colocar un tapete de plástico, como los de baño, para evitar la corrosión de las superficies subyacentes. Colocar otro tapete sobre el recipiente para evitar el contacto de los usuarios de la campana con el mismo.
- El vaciado del ácido debe hacerse dentro de la campana, diluyéndolo 1:4 (ácido : agua destilada). Adicionando el ácido poco a poco al agua, la reacción es exotérmica, CUIDADO!!!
- La tina para el ácido debe ponerse en baño maría, de hielo con poco agua y sal.
- Cuando el ácido se torne amarillo debe desecharse, para lo cual se coloca en botellas de vidrio, se etiqueta y se entrega a la QFB. Isabel Arce Camacho para su tratamiento en la dirección de Gestión Ambiental.
- El ácido que se utiliza es el ácido comercial de Química Barsa: ácido sulfúrico de grado técnico, concentrado.







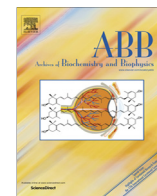
1. S. J. F. David G. Nicholls, *Bioenergetics 3*. (Elsevier Science, Academic Press, 1992), pp. 297.
2. T. G. Frey, C. A. Mannella, *Trends Biochem Sci* 25, 319 (Jul, 2000).
3. C. A. Mannella, *Biochim Biophys Acta* 1763, 542 (May-Jun, 2006).
4. J. Bereiter-Hahn, M. Voth, *Microsc Res Tech* 27, 198 (Feb 15, 1994).
5. D. Lloyd, in *London, U.K. Academic*. (1974).
6. L. Margulis, *Symp Soc Exp Biol*, 21 (1975).
7. M. Muller, W. Martin, *Bioessays* 21, 377 (May, 1999).
8. W. Kuhlbrandt, *BMC Biol* 13, 89 (2015).
9. P. Rich, *Nature* 421, 583 (Feb 6, 2003).
10. P. Mitchell, *Nature* 191, 144 (Jul 8, 1961).
11. D. Stock, C. Gibbons, I. Arechaga, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Curr Opin Struct Biol* 10, 672 (Dec, 2000).
12. P. L. Pedersen, *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37, 349 (Dec, 2005).
13. H. Kanazawa, T. Kayano, K. Mabuchi, M. Futai, *Biochem Biophys Res Commun* 103, 604 (Nov 30, 1981).
14. C. von Ballmoos, G. M. Cook, P. Dimroth, *Annu Rev Biophys* 37, 43 (2008).
15. I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart, H. Schagger, *EMBO J* 17, 7170 (Dec 15, 1998).
16. T. R. Golden, P. L. Pedersen, *Biochemistry* 37, 13871 (Sep 29, 1998).
17. Y. H. Ko, J. Hullihen, S. Hong, P. L. Pedersen, *J Biol Chem* 275, 32931 (Oct 20, 2000).
18. J. E. Walker, V. K. Dickson, *Biochim Biophys Acta* 1757, 286 (May-Jun, 2006).
19. R. A. Capaldi, R. Aggeler, *Trends Biochem Sci* 27, 154 (Mar, 2002).
20. J. Weber, A. E. Senior, *FEBS Lett* 545, 61 (Jun 12, 2003).
21. J. Weber, S. Wilke-Mounts, A. E. Senior, *J Biol Chem* 278, 13409 (Apr 11, 2003).
22. R. H. Fillingame, C. M. Angevine, O. Y. Dmitriev, *FEBS Lett* 555, 29 (Nov 27, 2003).
23. R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita, Jr., F. Motojima, M. Yoshida, *Journal of bioenergetics and biomembranes* 29, 207 (Jun, 1997).
24. W. Junge, H. Sialaff, S. Engelbrecht, *Nature* 459, 364 (May 21, 2009).
25. J. Habersetzer *et al.*, *Int J Biochem Cell Biol* 45, 99 (Jan, 2013).
26. C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, P. Dimroth, *Annu Rev Biochem* 78, 649 (2009).
27. I. N. Watt, M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16823 (Sep 28, 2010).
28. M. Allegretti *et al.*, *Nature* 521, 237 (May 14, 2015).
29. J. E. Walker, M. J. Runswick, M. Saraste, *FEBS Lett* 146, 393 (Sep 20, 1982).
30. M. Vazquez-Acevedo *et al.*, *Journal of bioenergetics and biomembranes* 38, 271 (Dec, 2006).
31. J. P. Abrahams, A. G. Leslie, R. Lutter, J. E. Walker, *Nature* 370, 621 (Aug 25, 1994).
32. J. P. Abrahams *et al.*, *EMBO J* 12, 1775 (May, 1993).
33. K. Braig, R. I. Menz, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Structure* 8, 567 (Jun 15, 2000).
34. E. Cabezon, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Nat Struct Biol* 10, 744 (Sep, 2003).
35. J. Carroll *et al.*, *Mol Cell Proteomics* 4, 693 (May, 2005).
36. T. M. Duncan, V. V. Bulygin, Y. Zhou, M. L. Hutcheon, R. L. Cross, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10964 (Nov 21, 1995).
37. C. Gibbons, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Nat Struct Biol* 7, 1055 (Nov, 2000).
38. J. R. Gledhill, J. E. Walker, *Biochem J* 386, 591 (Mar 15, 2005).
39. R. I. Menz, J. E. Walker, A. G. Leslie, *Cell* 106, 331 (Aug 10, 2001).
40. G. L. Orriss, A. G. Leslie, K. Braig, J. E. Walker, *Structure* 6, 831 (Jul 15, 1998).

41. H. Itoh *et al.*, *Nature* 427, 465 (Jan 29, 2004).
42. P. D. Boyer, *Biochim Biophys Acta* 1140, 215 (Jan 8, 1993).
43. P. D. Boyer, *FASEB J* 3, 2164 (Aug, 1989).
44. J. Weber, S. Nadanaciva, A. E. Senior, *FEBS Lett* 483, 1 (Oct 13, 2000).
45. Y. Hirano-Hara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13649 (Nov 20, 2001).
46. T. Nakada, K. Misawa, H. Nozaki, *Mol Phylogenet Evol* 48, 281 (Jul, 2008).
47. L. A. Lewis, R. M. McCourt, *Am J Bot* 91, 1535 (Oct, 2004).
48. G. Michaelis, C. Vahrenholz, E. Pratje, *Mol Gen Genet* 223, 211 (Sep, 1990).
49. S. S. Merchant *et al.*, *Science* 318, 245 (Oct 12, 2007).
50. K. L. Kindle, K. L. Richards, D. B. Stern, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1721 (Mar 1, 1991).
51. R. van Lis, D. Gonzalez-Halphen, A. Atteia, *Biochim Biophys Acta* 1708, 23 (Jun 1, 2005).
52. R. E. Lee, *Phycology*. (Cambridge University Press, ed. 4th, 2008), pp. 547.
53. L. G. Franzen, G. Falk, *Plant molecular biology* 19, 771 (Aug, 1992).
54. G. Nurani, L. G. Franzen, *Plant molecular biology* 31, 1105 (Sep, 1996).
55. A. Atteia, G. Dreyfus, D. Gonzalez-Halphen, *Biochim Biophys Acta* 1320, 275 (Jul 4, 1997).
56. A. Atteia *et al.*, *Mol Genet Genomics* 268, 637 (Feb, 2003).
57. R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernandez, D. Gonzalez-Halphen, *Plant Physiol* 132, 318 (May, 2003).
58. H. Eubel, L. Jansch, H. P. Braun, *Plant Physiol* 133, 274 (Sep, 2003).
59. R. C. Edgar, *Nucleic Acids Res* 32, 1792 (2004).
60. R. D. Allen, C. C. Schroeder, A. K. Fok, *J Cell Biol* 108, 2233 (Jun, 1989).
61. M. Strauss, G. Hofhaus, R. R. Schroder, W. Kuhlbrandt, *EMBO J* 27, 1154 (Apr 9, 2008).
62. K. M. Davies, C. Anselmi, I. Wittig, J. D. Faraldo-Gomez, W. Kuhlbrandt, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13602 (Aug 21, 2007).
63. H. Schagger, *Biochim Biophys Acta* 1555, 154 (Sep 10, 2002).
64. H. Schagger, W. A. Cramer, G. von Jagow, *Anal Biochem* 217, 220 (Mar, 1994).
65. N. V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E. J. Boekema, H. P. Braun, *FEBS Lett* 579, 5769 (Oct 24, 2005).
66. F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens, J. J. Garcia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12356 (Aug 30, 2005).
67. P. Cardol *et al.*, *Plant Physiol* 137, 447 (Feb, 2005).
68. A. Cano-Estrada *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1797, 1439 (Aug, 2010).
69. H. Miranda-Astudillo *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1837, 1 (Jan, 2015).
70. P. L. Pedersen, *Biochem Biophys Res Commun* 64, 610 (May 19, 1975).
71. V. K. Vambutas, E. Racker, *J Biol Chem* 240, 2660 (Jun, 1965).
72. A. Villavicencio-Queijeiro *et al.*, *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41, 1 (Feb, 2009).
73. M. Lapaille *et al.*, *Mol Biol Evol* 27, 1630 (Jul, 2010).
74. M. E. Pullman, H. S. Penefsky, A. Datta, E. Racker, *J Biol Chem* 235, 3322 (Nov, 1960).
75. S. Chifflet, A. Torriglia, R. Chiesa, S. Tolosa, *Anal Biochem* 168, 1 (Jan, 1988).
76. P. Gonzalez-Romo, S. Sanchez-Nieto, M. Gavilanes-Ruiz, *Anal Biochem* 200, 235 (Feb 1, 1992).
77. H. A. Lardy, D. Johnson, M. W. Mc, *Arch Biochem Biophys* 78, 587 (Dec, 1958).
78. J. Symersky, D. Osowski, D. E. Walters, D. M. Mueller, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13961 (Aug 28, 2012).
79. M. Toei, H. Noji, *J Biol Chem* 288, 25717 (Sep 6, 2013).
80. I. B. Minkov, A. F. Fitin, E. A. Vasilyeva, A. D. Vinogradov, *Biochem Biophys Res Commun* 89, 1300 (Aug 28, 1979).

81. A. Di Pietro, F. Penin, C. Godinot, D. C. Gautheron, *Biochemistry* 19, 5671 (Dec 9, 1980).
82. D. Bar-Zvi, N. Shavit, *Journal of bioenergetics and biomembranes* 14, 467 (Dec, 1982).
83. J. Moyle, P. Mitchell, *FEBS Lett* 56, 55 (Aug 1, 1975).
84. A. F. Fitin, E. A. Vasilyeva, A. D. Vinogradov, *Biochem Biophys Res Commun* 86, 434 (Jan 30, 1979).
85. I. Y. Drobinskaya, I. A. Kozlov, M. B. Murataliev, E. N. Vulfson, *FEBS Lett* 182, 419 (Mar 25, 1985).
86. K. R. Dunham, B. R. Selman, *J Biol Chem* 256, 212 (Jan 10, 1981).
87. R. I. Feldman, P. D. Boyer, *J Biol Chem* 260, 13088 (Oct 25, 1985).
88. M. Yoshida, W. S. Allison, *J Biol Chem* 258, 14407 (Dec 10, 1983).
89. D. J. Hyndman, Y. M. Milgrom, E. A. Bramhall, R. L. Cross, *J Biol Chem* 269, 28871 (Nov 18, 1994).
90. P. Kuzmic, *Methods Enzymol* 467, 247 (2009).
91. P. Swanlung, L. Frigeri, K. Ohlson, L. Ernster, *Biochim Biophys Acta* 305, 519 (Jun 28, 1973).
92. V. L. Zerbetto E, Dabbeni-Sala F., *Electrophoresis*. 18, 2059 (1997).
93. B. Guerin, P. Labbe, M. Somlo, *Methods Enzymol* 55, 149 (1979).
94. A. Jimenez-Suarez *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1817, 819 (May).
95. S. Hong, P. L. Pedersen, *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 590 (Dec, 2008).
96. I. Trautschold, *UV method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase*. *Methods of Enzymatic Analysis* (Germany, ed. 2, 1965), pp. 346-357.
97. G. M. Cook *et al.*, *Journal of bacteriology* 185, 4442 (Aug, 2003).
98. A. C. Haagsma, N. N. Driessen, M. M. Hahn, H. Lill, D. Bald, *FEMS Microbiol Lett* 313, 68 (Dec, 2010).
99. H. R. Lotscher, C. deJong, R. A. Capaldi, *Biochemistry* 23, 4140 (Aug 28, 1984).
100. R. H. Fillingame, D. L. Foster, *Methods Enzymol* 126, 545 (1986).
101. F. Zanotti, A. Gnoni, R. Mangiullo, S. Papa, *Biochem Biophys Res Commun* 384, 43 (Jun 19, 2009).
102. H. S. Penefsky, *J Biol Chem* 249, 3579 (Jun 10, 1974).
103. K. Andries *et al.*, *Science* 307, 223 (Jan 14, 2005).
104. S. Petrella *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2853 (Aug, 2006).
105. W. Sebald, E. Wachter, A. Tzagoloff, *Eur J Biochem* 100, 599 (Oct 15, 1979).
106. E. Glaser, B. Norling, J. Kopecky, L. Ernster, *Eur J Biochem* 121, 525 (Jan, 1982).
107. A. D. Vinogradov, *J Exp Biol* 203, 41 (Jan, 2000).
108. G. Dreyfus, M. Satre, *Arch Biochem Biophys* 229, 212 (Feb 15, 1984).
109. C. Frieden, *J Biol Chem* 245, 5788 (Nov 10, 1970).
110. K. E. Neet, G. R. Ainslie, Jr., *Methods Enzymol* 64, 192 (1980).
111. P. P. Laget, *Arch Biochem Biophys* 192, 474 (Feb, 1979).
112. B. Fleury, A. Di Pietro, C. Godinot, D. C. Gautheron, *Biochimie* 62, 733 (1980).
113. B. A. Feniouk, T. Suzuki, M. Yoshida, *J Biol Chem* 282, 764 (Jan 5, 2007).
114. A. Gomez-Puyou, M. T. de Gomez-Puyou, L. Ernster, *Biochim Biophys Acta* 547, 252 (Aug 14, 1979).
115. I. Wittig, R. Carrozzo, F. M. Santorelli, H. Schagger, *Biochim Biophys Acta* 1757, 1066 (Sep-Oct, 2006).
116. J. Velours, A. Dautant, B. Salin, I. Sagot, D. Brethes, *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1783 (Oct, 2009).
117. G. Arselin *et al.*, *J Biol Chem* 279, 40392 (Sep 24, 2004).
118. J. Habersetzer *et al.*, *PLoS One* 8, e75429 (2013).
119. V. Giorgio *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5887 (Apr 9, 2013).
120. E. G. Pringsheim, *J. Protozool* 2, 137 (November, 1955, 1955).

121. A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J Biol Chem* 177, 751 (Feb, 1949).
122. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J Biol Chem* 193, 265 (Nov, 1951).
123. H. Schagger, H. Aquila, G. Von Jagow, *Anal Biochem* 173, 201 (Aug 15, 1988).
124. R. C. Edgar, *BMC Bioinformatics* 5, 113 (Aug 19, 2004).

**APÉNDICE III**  
ARTÍCULOS PUBLICADOS



## Kinetic and hysteretic behavior of ATP hydrolysis of the highly stable dimeric ATP synthase of *Polytomella* sp.



Alexa Villavicencio-Queijeiro<sup>a</sup>, Juan Pablo Pardo<sup>b</sup>, Diego González-Halphen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 November 2014  
and in revised form 20 March 2015  
Available online 2 April 2015

#### Keywords:

Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase  
Dimeric complex V  
Chlorophycean algae  
Hysteresis  
*Polytomella* sp.

### ABSTRACT

The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase of the colorless alga *Polytomella* sp. exhibits a robust peripheral arm constituted by nine atypical subunits only present in chlorophycean algae. The isolated dimeric enzyme exhibits a latent ATP hydrolytic activity which can be activated by some detergents. To date, the kinetic behavior of the algal ATPase has not been studied. Here we show that while the soluble F<sub>1</sub> sector exhibits Michaelis–Menten kinetics, the dimer exhibits a more complex behavior. The kinetic parameters ( $V_{\max}$  and  $K_m$ ) were obtained for both the F<sub>1</sub> sector and the dimeric enzyme as isolated or activated by detergent, and this activation was also seen on the enzyme reconstituted in liposomes. Unlike other ATP synthases, the algal dimer hydrolyzes ATP on a wide range of pH and temperature. The enzyme was inhibited by oligomycin, DCCD and Mg-ADP, although oligomycin induced a peculiar inhibition pattern that can be attributed to structural differences in the algal subunit-c. The hydrolytic activity was temperature-dependent and exhibited activation energy of 4 kcal/mol. The enzyme also exhibited a hysteretic behavior with a lag phase strongly dependent on temperature but not on pH, that may be related to a possible regulatory role *in vivo*.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

F-type ATPases are highly conserved oligomeric complexes that play a central role in energy transduction in mitochondria, chloroplasts and bacterial membranes [1]. In particular, mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase (H<sup>+</sup>-translocating adenosine triphosphatase, EC 3.6.3.14) is a key participant in oxidative phosphorylation. It functions as a molecular motor that couples the electrochemical proton gradient built up by the respiratory chain to ATP synthesis, using ADP and inorganic phosphate as substrates. The enzyme can also hydrolyze ATP to build an electrochemical H<sup>+</sup> gradient [2–4]. One of the best-characterized ATP synthases from both the structural and functional point of view is the bovine heart enzyme. It consists of a hydrophilic F<sub>1</sub> sector (subunits  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) containing the nucleotide and P<sub>i</sub> binding sites, and a hydrophobic F<sub>0</sub> subcomplex (abc<sub>8</sub>) containing the proton binding sites [5–7]. The F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> sectors are structurally and functionally associated by a central rotary element (subunits  $\gamma\delta\epsilon$ ) and by a peripheral stalk (subunits b, d, f, A6L, and F6) that works as a stator. In addition, subunits e

and g and other polypeptides are involved in the dimerization of the ATP synthase. Regulation of the enzyme is carried out by the IF<sub>1</sub> inhibitor protein, which binds at an  $\alpha/\beta$  interface preventing ATP hydrolysis [8,9].

The mitochondrial ATP synthases from the chlorophycean algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp., are isolated as highly stable dimers with a mass of 1600–1700 kDa [10–14]. Its polypeptide composition starkly differs from the mitochondrial ATP synthases found in the vast majority of eukaryotes. While it contains the eight conserved subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $a$  (Atp6),  $c$  (Atp9), and OSCP, it also exhibits nine atypical polypeptides only found in the chlorophycean algal lineage that were named Asa1 to Asa9 [13,15]. Some of the Asa subunits are the building blocks of a distinct and robust peripheral stalk [16], while others seem to participate in the dimerization of the complex (Asa6 and Asa9) [11,16].

The isolated enzyme from *Polytomella* sp. exhibits a very low ATPase activity that increases upon heat treatment due to the release of the F<sub>1</sub> sector. The hydrolytic activity of the dimeric enzyme can also be unmasked by several non-ionic detergents (lauryl maltoside, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, Tween 20, Tween 80, and n-dodecanoyl sucrose) [17]. Previous studies have shown that the fully functional form of the enzyme is the dimer and that the monomeric assembly represents a labile form with reduced ATPase activity and diminished

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

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

oligomycin sensitivity [17]. In this study we carried out a preliminary kinetic characterization of both the highly stable dimeric  $F_1F_0$ -ATP synthase and the soluble  $F_1$  sector of the colorless alga.

## Materials and methods

### Algal strains and growth conditions

*Polytomella* sp. (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].

### Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich Co. For inhibition experiments, a mixture of oligomycin A, B and C was used, containing 65% of oligomycin A.

### *Polytomella* ATP synthase purification

The algal ATP synthase was purified according to the described procedure [13] with the following modifications: the fractions enriched in *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase were recovered and concentrated by centrifugation using a Centricon Centrifugal Filter Unit with a cut-off membrane of 100 kDa. The concentrated sample was loaded onto seven-ml tubes containing 15–40% glycerol gradients in 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1 mM sodium EDTA, 2 mM ATP and 0.1 mg/ml of n-dodecyl- $\beta$ -D maltoside (LM). The gradients were centrifuged at 40,000 $\times$ g for 18 h in a swing-out rotor. The purified ATP synthase complex was recovered in a band migrating around 25% glycerol. To obtain the  $F_1$  subcomplex, the dimeric ATP synthase was heated at 60 °C for 2 min. This treatment releases the  $F_1$  sector as previously reported [13]. No further purification of the  $F_1$  subcomplex was made.

### Protein analysis

All of the ATP synthase preparations were routinely checked for purity; they were analyzed by sodium dodecyl sulfate (SDS)<sup>1</sup>–14% polyacrylamide gels (PAGE) using the buffer system of Schagger et al. [19]. Protein concentrations were estimated according to Markwell et al. [20].

### ATPase activity measurements

ATPase activity was measured spectrophotometrically at 25 °C following the oxidation of NADH at 340 nm [21], unless stated otherwise. The mixture contained an ATP-regenerating system in a 25 mM Tris–sulfate (pH 8.0) buffer containing 30 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 U of pyruvate kinase, 4.5 U of lactate dehydrogenase, 1.5 mM of phosphoenol pyruvate, 0.3 mM NADH, and 0.01% LM. Reactions were started by the addition of the  $F_1$  subcomplex or the dimeric ATPase, and the full time course of the reaction was followed in order to obtain the steady-state velocity. When experiments were carried out at higher temperatures, controls adding Mg-ADP were performed to ensure that the enzymatic ATP-regenerating system was active. Specific activity values reported in this work were calculated from the latter phase. One unit of activity is defined as the amount of protein that oxidizes 1  $\mu$ mol NADH per min at the established temperature. In this work, all reported specific activities correspond to oligomycin-sensitive

activities. To assay oligomycin sensitivity 25 nM of purified ATP synthase were preincubated on ice for at least 30 min in the presence of 10  $\mu$ g/ml oligomycin (12.5  $\mu$ M), unless stated otherwise. The inhibitor was also added from a stock solution in DMSO to the assay medium at the same final concentration. To perform the oligomycin curve assay, samples were preincubated on ice for at least 30 min in the presence of increasing concentrations of oligomycin (0–1.25  $\mu$ M). In addition, the inhibitor was added from a stock solution in DMSO to the assay medium, which contained the same buffer as the control experiments [25 mM Tris–sulfate (pH 8.0), 30 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 U of pyruvate kinase, 4.5 U of lactate dehydrogenase, 1.5 mM of phosphoenol pyruvate, and 0.3 mM NADH] with or without detergent. DynaFit version 4 [22] was used for model discrimination between non-competitive and competitive inhibition by Mg-ADP, and for the calculation of the dissociation constant for oligomycin–ATP synthase interaction, assuming non-competitive inhibition.

To assay N,N-dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) sensitivity, samples were pre-incubated on ice for at least 20 min in the presence of the inhibitor added from an ethanolic stock solution. To study the effect of carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), liposomes were pre-incubated on ice with 10  $\mu$ M of the inhibitor added from an ethanolic stock solution. Apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values were obtained by fitting the initial velocity data to the Michaelis–Menten equation or to the following equation:  $V_1 = (V_{max}[S]/(K_m + [S])) + (a[S])$ , where the term  $(a[S])$  corresponds to a linear component that might correspond to the initial increase in activity of a very low affinity component. The relaxation time was determined using the equation  $P_t = V_{ss}t - (V_{ss} - V_i)(1 - \exp(-t/\tau))\tau$  [23], where  $V_i$  is the initial velocity,  $V_{ss}$  the steady state velocity, and  $\tau$  the relaxation time. The lag time was calculated using equation  $((V_{ss} - V_i)/V_{ss})\tau$  [23]. The effect of pH on the magnitude of the lag time was analyzed in buffers with pKa values covering the pH range of 6.0–8.5 (TRIS/MES/MOPS). The pH adjustment was done on a mixture of the three buffers at a final concentration of 25 mM each, and the assay was performed at 25 °C. All experiments were carried out at least three times in duplicates and the means and standard deviations were plotted.

### Orthophosphate determination

A modification of the original method [24] proposed by [25] was used to quantify  $P_i$  when inhibition by Mg-ADP was assayed. The buffer was the same as in the ATP-regenerating system assays [25 mM Tris–sulfate (pH 8.0) containing 30 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% LM and increasing concentrations of Mg-ATP] except for the presence of the coupling enzymes DHL/PK. Reactions were started by the addition of dimeric ATPase and were allowed to proceed for 2–50 min at 30 °C, and stopped by the addition of 150  $\mu$ l of 12% sodium dodecyl sulfate, followed by 300  $\mu$ l of a solution prepared by mixing 1 ml of 12% ascorbic acid in 1.0 N HCl with 1 ml of 2% ammonium molybdate in HCl. After 3–7 min, 450  $\mu$ l of a solution containing 2% sodium citrate and 2% sodium meta-arsenite in 2% acetic acid were added and mixed. Samples were incubated for at least 20 min at room temperature and readings were made at 850 nm. Blanks were made for each condition in the same buffer at equivalent times of incubation and were subtracted from the final absorbance values. Also, a standard  $P_i$  curve was prepared by using a 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> stock solution; aliquots equivalent to 2–100 nmol  $P_i$  were taken to a final volume of 150  $\mu$ l with double-distilled water.

### Reconstitution into liposomes

A soybean asolectin stock (10 mg/ml) was sonicated in the presence of a buffer containing 25 mM Tris–HCl (pH 8.0), 30 mM KCl,

<sup>1</sup> Abbreviations used: SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gels; DCCD, N,N-dicyclohexyl carbodiimide; FCCP, carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone.



3 mM MgSO<sub>4</sub> and 0.5% sodium cholate until the suspension became clear. Dimeric ATP synthase, obtained as described previously, was added to this mixture at a 1:5 M ratio (protein:lipid) and sodium cholate was added at a final concentration of 1.5%. The mixture was incubated on ice for at least one hour and was dialyzed overnight against a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub>. Afterwards, vesicles were prepared with a Northern Lipids standard French press cell (2.5 cm inner diameter, 10 ml capacity) using a 200 nm membrane at a controlled chamber-temperature of 25 °C. The sample was cycled 10 times and liposomes were recovered and stored on ice until use.

### In silico protein analysis

Sequence alignment of subunit-c from *Saccharomyces cerevisiae* (GI:6226533); *Bos taurus* (GI:84202593); *Homo sapiens* (GI:50659074) and the algae *Polytomella* sp. (GI:294494193); *C. reinhardtii* (GI:158271592) and *Volvox carteri* f. nagariensis (GI:302850172) were carried out with the program Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) [26].

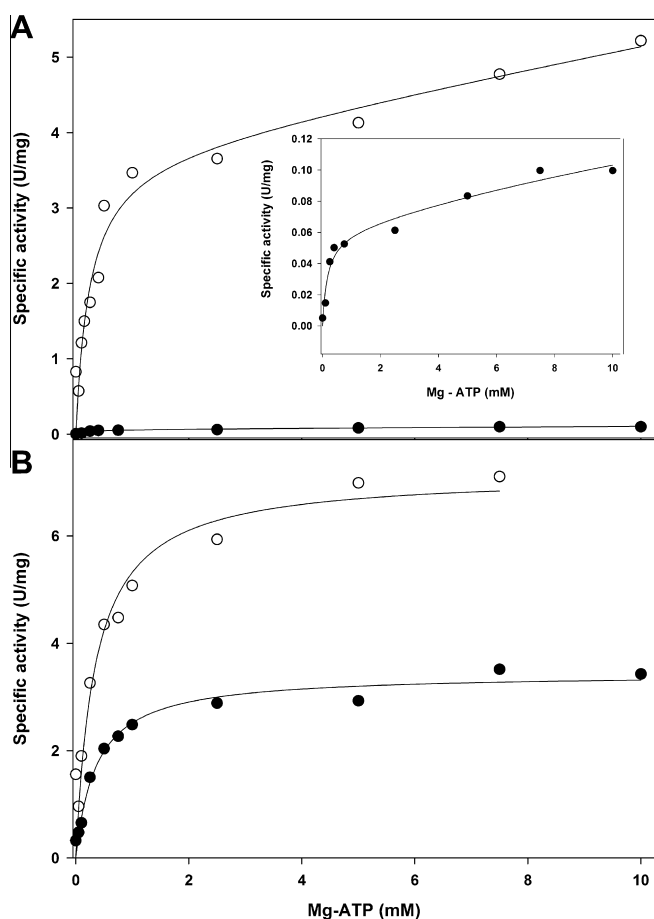
## Results

### The mitochondrial dimeric ATP synthase from *Polytomella* sp. and its F<sub>1</sub> sector exhibit distinct kinetic behaviors

ATP hydrolysis by the algal F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase was determined at several ATP concentrations ranging from 500 μM to 10 mM. The rate of hydrolysis measured for the *Polytomella* sp. dimeric ATP synthase was 0.08 U/mg of protein. It has been previously reported that some detergents can activate the algal enzyme, particularly LM at a final concentration of 0.01% [17]. Saturation curves with Mg-ATP as substrate were performed for the dimeric ATP synthase and for the F<sub>1</sub> sector obtained after heat-treatment of the intact enzyme [13], with or without detergent in the assay medium (Fig. 1). The hydrolytic rate of the dimeric form did not follow a Michaelis–Menten-type kinetics as observed in the curve obtained after plotting activity against ATP concentration with and without LM (panel A, see also S.Fig. 1). Kinetic analysis indicated that the dimeric ATPase exhibited an apparent K<sub>m</sub> for Mg-ATP of 0.19 mM and a V<sub>max</sub> of 0.065 U/mg in the absence of detergent. In contrast, the dimeric enzyme in the presence of detergent showed a K<sub>m</sub> of 0.24 mM and a V<sub>max</sub> of 3.77 U/mg. Thus, a 60-fold increase in the V<sub>max</sub> was observed in the presence of detergent. In both cases the values reported correspond to the high affinity component. We asked whether the hydrolytic activity of the free F<sub>1</sub> subcomplex would also exhibit sensitivity to the detergent. Kinetic analysis indicated that the F<sub>1</sub> sector without LM had an apparent K<sub>m</sub> for Mg-ATP of 0.36 mM and a V<sub>max</sub> of 3.4 U/mg. For F<sub>1</sub> subcomplex assayed in the presence of LM the K<sub>m</sub> was 0.34 mM and the V<sub>max</sub> 7.15 U/mg (Fig. 1B). Thus, the ATPase activity of the F<sub>1</sub> sector was stimulated approximately twofold upon addition of LM 0.01% (final concentration).

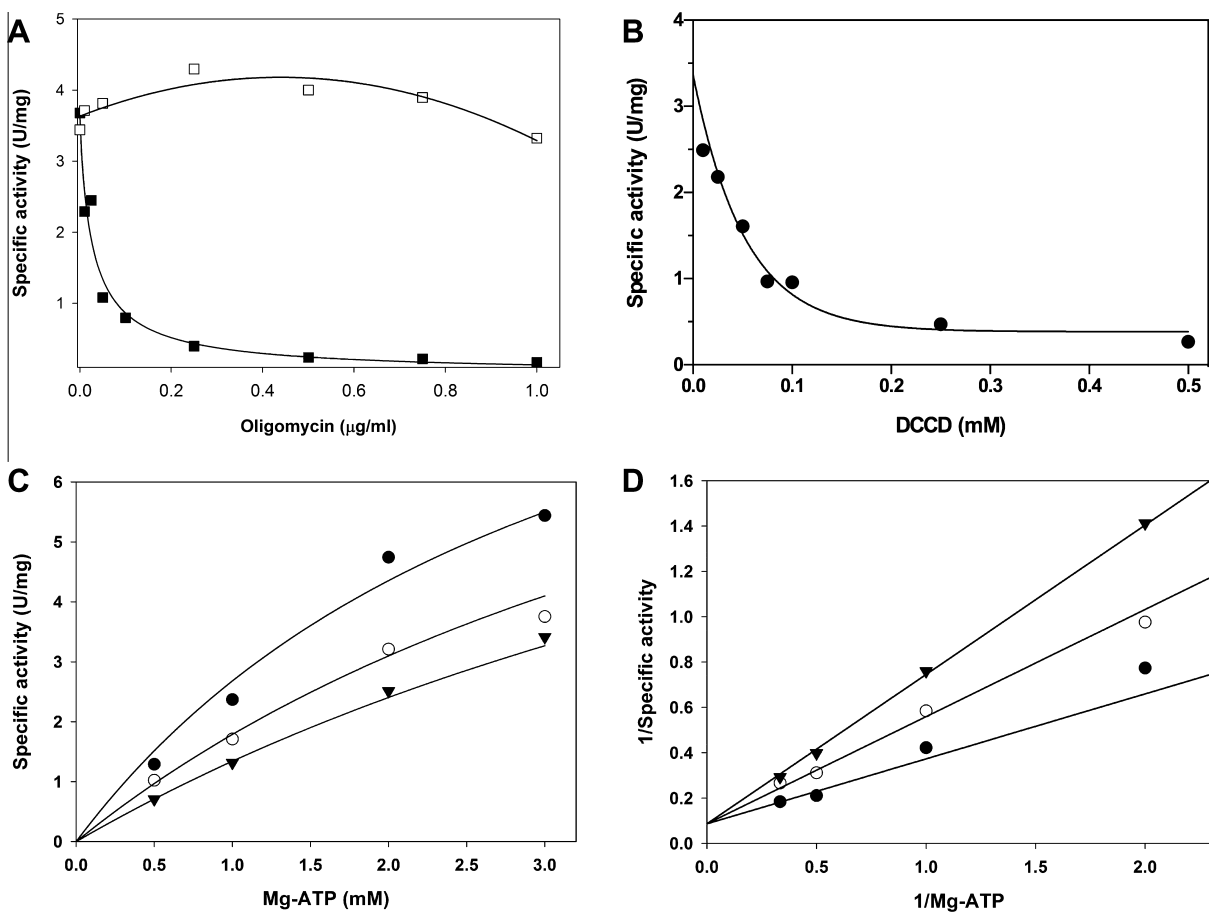
### Dimeric ATP synthase from *Polytomella* sp. is inhibited by oligomycin, DCCD and Mg-ADP

The experiments shown in Fig. 2 were performed in the presence of 0.01% of LM and oligomycin, an inhibitor that specifically blocks proton translocation when binding at the interface of subunit a and the c-ring in the proton access channel of the F<sub>0</sub> sector [27]. Thus, in a coupled F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> enzyme, ATP hydrolysis is blocked. Oligomycin can therefore be used as an indicator of the structural integrity of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> enzyme, since the ATPase activity of the free F<sub>1</sub> sector is oligomycin-insensitive. When the enzyme was



**Fig. 1.** Mg-ATP hydrolysis at different Mg-ATP concentrations. ATPase activity of the dimer (panel A) and the F<sub>1</sub> subcomplex (panel B) in the presence of increasing Mg-ATP concentrations at 25 °C. (Panel A) Dimeric ATPase with (open circles) and without (filled circles) 0.01% (w/v) LM in the assay medium. Inset in panel A: ATPase activity in the absence of LM (amplified scale). The specific activity reported corresponds to oligomycin-sensitive activity, obtained by subtracting the activity in presence of the inhibitor. Data for the dimeric ATPase were fitted to the equation  $V_1 = (V_{max}[S])/K_m + [S] + (a[S])$ , where the term  $(a[S])$  corresponds to a diffusion-type component. (Panel B) The F<sub>1</sub> sector was prepared by incubating the algal ATP synthase for two minutes at 60 °C. Open circles, F<sub>1</sub> subcomplex with LM at a final concentration 0.01% (w/v) in the assay medium. Filled circles, F<sub>1</sub> subcomplex assayed without detergent in the medium. Data were fitted to Michaelis–Menten equation. All experiments were carried out at least three times in duplicates.

preincubated with oligomycin and then assayed in a medium free of the inhibitor, only a slight inhibition of the hydrolytic activity of the enzyme was observed at high concentrations. The enzyme was fully inhibited only when it was preincubated with oligomycin and when the same concentration of the inhibitor was present in the assay medium (Fig. 2A). The determined K<sub>i</sub> for oligomycin was 28 nM. In contrast, incubation with 10–500 μM of the classic inhibitor N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), which binds covalently to a carboxylic group in subunit c (Asp-61 in *Escherichia coli*), blocking the rotation of the c-ring [28], abolished ATP hydrolysis (Fig. 2B). This indicates that the F<sub>1</sub> sector is functionally attached to the subcomplex F<sub>0</sub>, since the free F<sub>1</sub> subcomplex is DCCD-insensitive (S.Fig. 2). One of the most well-known regulators of ATP synthase is ADP; besides being a substrate, it also inhibits ATPase activity in a competitive manner by binding tightly to the F<sub>1</sub> sector and inhibiting catalysis and rotation [29] in the mitochondrial [30,31], chloroplastidic [32,33] and bacterial enzymes [34,35]. Fig. 2C and D show the effect of 0.5 and 1 mM ADP on Mg-ATP hydrolysis, where Mg-ADP acts as a competitive inhibitor with a K<sub>i</sub> of 0.77 mM. For model discrimination, data for Mg-ADP



**Fig. 2.** Inhibition of ATP hydrolysis. ATPase activity of the dimeric enzyme was assayed at 25 °C in the presence of oligomycin, DCCD and Mg-ADP with LM at a final concentration 0.01% (w/v). (Panel A) Samples were pre-incubated 30 min in the presence of the concentration of oligomycin indicated (µg/ml) and assayed in the presence of the same concentration of the inhibitor in the assay medium (filled squares) or in its absence (open squares circles). (Panel B) To assay DCCD sensitivity, samples were pre-incubated 30 min in the presence of the concentration of inhibitor indicated (mM). (Panel C). Effect of Mg-ADP on ATP hydrolysis by dimeric ATPase at 25 °C was measured using the colorimetric method. Three concentrations of Mg-ADP were assayed; filled circles (0 mM), open circles (0.5 mM) and upside-down triangles (1 mM). The assay medium contained LM at a final concentration 0.01% (w/v). Hydrolysis was allowed to proceed for up to 50 min. (Panel D) Double-reciprocal plot for data in panel C; legends are the same as in panel C. Experiments were carried out at least three times in duplicates.

inhibition were fitted to competitive and non-competitive models using DynaFit version 4 [22]. The competitive inhibition was supported over the non-competitive by the F-ratio and an Akaike weight of 0.9 for competitive versus 0.09 for non-competitive.

#### ATPase hydrolysis proceeds on a broad range of temperatures

Hydrolysis of ATP by dimeric ATPase was assayed at different temperatures from 15 °C to 60 °C (Fig. 3A). As expected, the hydrolytic activity increased with temperature. This effect could not be attributed to the release of  $F_1$  sector, since the activity was oligomycin sensitive at all the assayed temperatures. The Arrhenius plot built from the data was linear, with activation energy of 4.1 kcal/mol (inset in Fig. 3A).

#### Hysteretic behavior of the *Polytomella sp.* ATPase

The time course of ATP hydrolysis by the algal enzyme cannot be described by simple linear kinetics. The enzyme displayed hysteretic kinetics, *i.e.*, a slow initial phase of ATP hydrolysis was followed by a faster second phase, which was linear. Nonlinear time curves are observed in many systems and are attributed to a slow transition of the enzyme from an initial to a final state that exhibits different kinetic properties. This behavior was observed with both the dimeric ATPase and the  $F_1$  sector. The time elapsed

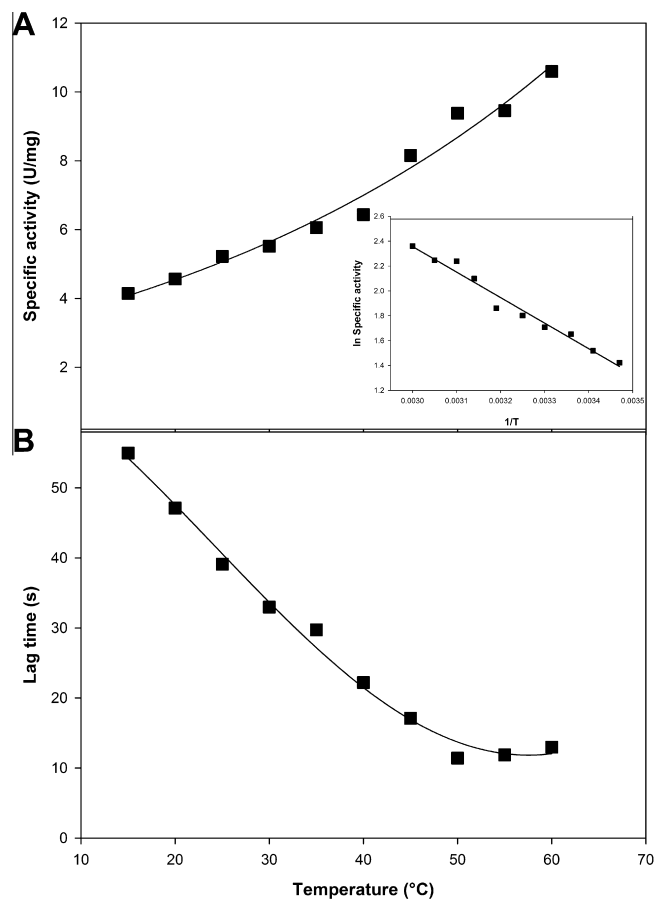
(lag time) between the addition of the enzyme and the start of the steady-state velocity was derived from the time courses used to obtain the steady state values (Fig. 3A). It can be observed that the lag time decreased as the temperature of the assay medium was increased (Fig. 3B).

#### ATP synthase from *Polytomella sp.* can hydrolyze ATP on a broad range of pH

The ATPase activity of dimeric ATP synthase was assayed at different pH values from 6.0 to 8.5 at 20 °C and 40 °C. Results of such experiments are shown in Fig. 4A. Unlike other ATPases, which exhibit an optimum activity at a pH around 8.0 [36], the algal enzyme hydrolyzes ATP on a broad range of pH's at both temperatures. Fig. 4B shows the lag times calculated for these experiments. It was observed that at 20 °C the lag time decreased from pH 6.5–7.5 and increased from pH 8.0–8.5. In contrast, at higher temperatures the lag time was pH independent.

#### The ATP synthase reconstituted in a lipid environment is still activated by LM

We asked whether the low hydrolytic activity of dimeric ATP synthase could be attributed to the lack of a lipid environment. The ATP synthase was reconstituted in soy- $\alpha$ -lectin liposomes

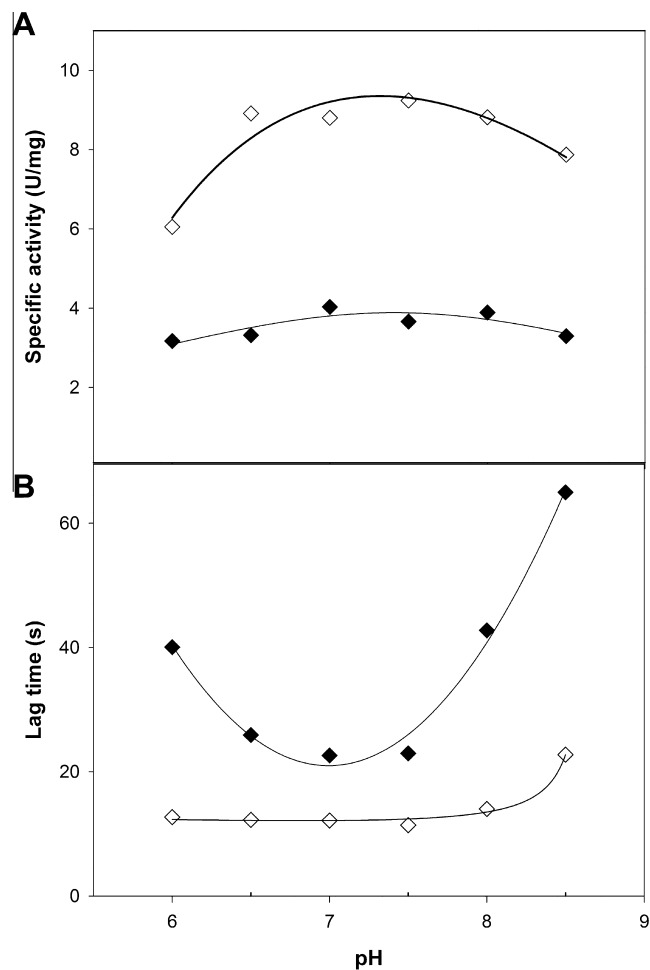


**Fig. 3.** ATP hydrolysis on a broad range of temperatures. ATPase activity was measured in the presence of LM at a final concentration 0.01% (w/v) at increasing temperatures using a temperature-regulated spectrophotometer. (Panel A) Oligomycin-sensitive Mg-ATP hydrolysis by the dimeric ATPase at the indicated temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ). Inset shows the Arrhenius plot of the temperature dependence of ATPase activity for the data in panel A. (Panel B) Lag times for the steady state ATP hydrolysis in dimeric ATPase at increasing temperatures were calculated from data in panel A, as described in Materials and methods. All experiments were carried out at least three times in duplicates.

and the effect of increasing concentrations of LM was evaluated (Fig. 5A). As previously reported, the ATPase activity of the non-reconstituted enzyme was stimulated 60-fold with LM [17]; here we found that the activity of the reconstituted enzyme in liposomes was increased 20-fold by the detergent (2.52 U/mg vs 0.13 U/mg with and without detergent, respectively). FCCP did not show an effect on ATP hydrolysis of the reconstituted enzyme indicating that proteoliposomes were not tightly coupled (Fig. 5B).

*ATP synthase from *Polytomella* sp. reconstituted in liposomes displays the same inhibition behavior by oligomycin as ATP synthase*

Since oligomycin seemed to be acting as a classic inhibitor that binds weakly to the purified enzyme, we asked whether this phenomenon was due to the lack of a lipid environment. When the ATP synthase was reconstituted in soy- $\alpha$ -lectin liposomes and the preparation was preincubated with oligomycin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and then assayed in a medium free of the inhibitor, only a slight inhibition of the hydrolytic activity of the enzyme was observed. The enzyme was fully inhibited only when it was preincubated with oligomycin, which also had to be present at the same concentration in the assay medium (Fig. 5C).

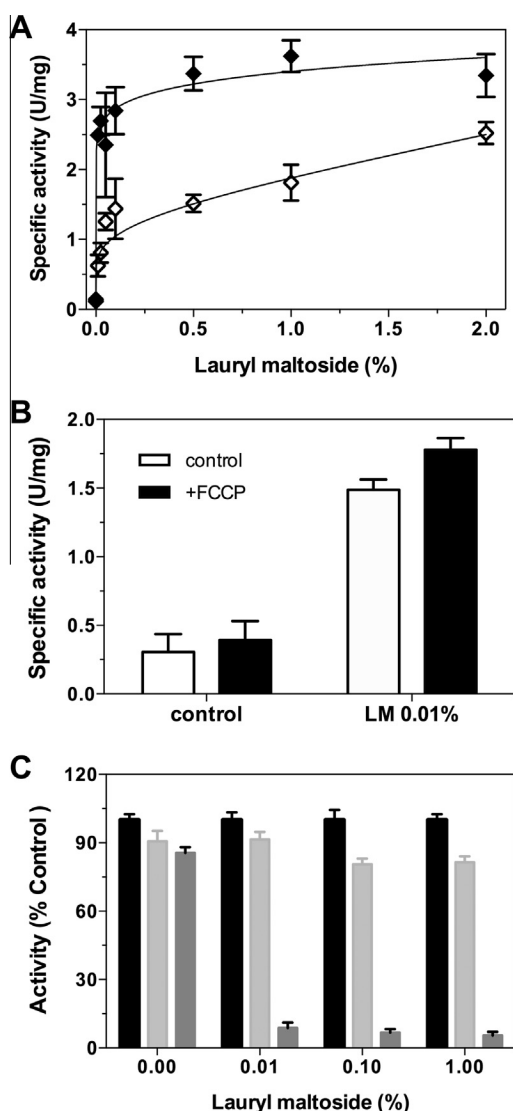


**Fig. 4.** Hydrolysis can proceed on a broad pH range. (Panel A) ATPase activity was measured in the presence of LM at a final concentration of 0.01% (w/v) at increasing pH values at two temperatures; filled diamonds ( $20^{\circ}\text{C}$ ), open diamonds ( $40^{\circ}\text{C}$ ). In all cases, the ATP hydrolytic activity was completely sensitive to oligomycin. (Panel B) The lag time for the steady state ATP hydrolysis in dimeric ATPase at increasing pH values was calculated from data in panel A, as described in Materials and methods. Filled diamonds ( $20^{\circ}\text{C}$ ), open diamonds ( $40^{\circ}\text{C}$ ). All experiments were carried out at least three times in duplicates.

## Discussion

The fully-active form of the *Polytomella* sp. ATP synthase is dimeric, while the monomer is less active and unstable. The dimer or the higher oligomeric forms observed in the algal mitochondrial cristae [12] may be the physiologically relevant forms of the enzyme [17]. Here, we explored the kinetic characteristics of both the dimer and the soluble  $F_1$  sector of the algal ATP synthase. An unusual feature the dimeric enzyme is its very low activity in the hydrolysis direction (0.03 U/mg) [17], also observed in ATP synthases of the alkaliphilic bacteria *Bacillus* sp. strain TA2.A1 (0.045 U/mg) [37] and of *Mycobacterium bovis* BCG (activity not detectable) [38]. These values are low compared with the ATP hydrolytic activity of the *E. coli* (9.8–12.9 U/mg) [39] and the beef-heart mitochondrial enzymes (3.0–8.5 U/mg) [36,40].

The  $V_{\text{max}}$  of the hydrolytic activity of the algal enzyme was stimulated 60-fold upon the addition of the detergent, while the  $K_m$  remained the same (0.24 mM). Fitting the kinetic data to a negative-cooperativity model or to a two Michaelis–Menten model, gave poor results, suggesting that the monomers may have an asymmetric kinetic behavior, a feature that has not been reported before. The low activity observed for the dimeric ATP



**Fig. 5.** LM activates ATPase in liposomes and oligomycin displays the same behavior as in the purified dimeric ATPase. (Panel A) ATPase activity was measured in purified ATPase (filled diamonds) and in ATPase incorporated in liposomes (open diamonds) in the presence of increasing concentrations of LM (w/v). In all cases, the assayed ATP hydrolytic activity was completely sensitive to oligomycin. (Panel B) FCCP effect was measured in proteoliposomes; samples were pre-incubated 30 min in the presence of 10  $\mu$ M of FCCP and assayed with (0.01%) and without LM. All experiments were carried out at least three times in duplicates, standard deviation is shown. (Panel C) Oligomycin sensitivity was measured in proteoliposomes at increasing concentrations of LM; samples were pre-incubated 30 min in the presence of 5  $\mu$ g/ml of oligomycin and assayed in the absence (light grey bars) or in the presence of the same concentration of the inhibitor (dark grey) in the assay medium. Control samples were pre-incubated and assayed with DMSO (black bars).

synthase could be simply due to aggregation of the enzyme when assayed in a medium without detergent. Nevertheless, only certain detergents were found to activate the enzyme at concentrations around their CMC [17], suggesting that they may induce some conformational change on the enzyme. To address the question of whether the effect of the detergent was on the  $F_0$  or the  $F_1$  portion of the complex, LM was added to the  $F_1$  subcomplex, obtained after heat-induced dissociation of the dimeric enzyme as previously reported [13]. The activity of the  $F_1$  sector was much larger than the activity displayed by the whole complex, but it was still stimulated twofold by 0.01% LM, while the  $K_m$  remained unaltered. Thus, the detergent seems to have effects on both the  $F_0$ -sector and the catalytic portion of the enzyme. After reconstitution into liposomes, the dimeric ATP synthase still exhibited a very low

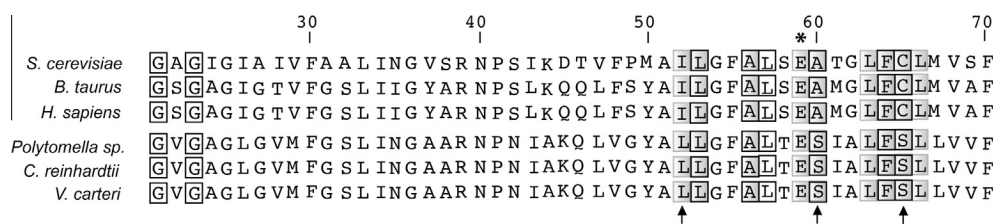
hydrolytic activity that markedly increased after the addition of detergent, suggesting again a direct effect on the enzyme. The reconstituted enzyme did not reach the same activity as the purified enzyme, this could be due to either a scrambled orientation of the enzyme in the liposomes or that the assayed mixture of phospholipids did not allowed full display of its activity.

It is noticeable that the addition of LM on the purified enzyme duplicates the  $V_{max}$  of the  $F_1$  sector while the  $K_m$  for Mg-ATP is unaffected. This suggests the release of a non-competitive inhibitor from the enzyme. Since no equivalent of the  $IF_1$  inhibitor has been identified in algal ATP synthases, the nature of this inhibitor remains unknown. Possible candidates are the extensions previously described in the algal  $\alpha$  and  $\beta$  subunits [41,42], or one of the nine Asa subunits of the enzyme.

The kinetic parameters of the high affinity component for both dimeric ATPase and  $F_1$  sector are summarized in Supplementary Table 1.  $K_m$  values are in the range of what has been reported for the bovine membrane-bound (0.315 mM) and soluble (0.79 mM) enzymes [43]. Furthermore, in the presence of detergent, the values of  $k_{cat}$  and  $k_{cat}/K_m$  are the same for the dimer and for the  $F_1$  sector.

ATP hydrolysis driven by the algal ATP synthase was inhibited by oligomycin at concentrations similar to those used to inhibit the bovine [40] and the *E. coli* enzymes [44]. The c-ring of the *Polytomella* enzyme is constituted by 10 c-subunits [14]. In contrast with other ATPases, the antibiotic did not bind tightly to the algal enzyme, since simple dilution released it from its binding-site. Since the oligomycin binding site is embedded in the membrane, it was possible that its weak association to the purified enzyme could be due to the lack of a lipid environment. However, in order to obtain full inhibition of the enzyme reconstituted in liposomes, it was also necessary to pre-incubate with oligomycin and to add the inhibitor to the activity assay. Several conserved residues in subunit c together constitute the binding site for oligomycin, venturicin and ossamycin [27], in particular, oligomycin binds via a single H-bond to Glu<sub>59</sub> (*S. cerevisiae* numbering) [45]. A number of mutations in subunit c have been shown to confer resistance to the antibiotic [45–47], like the Cys<sub>65</sub>Ser substitution in yeast [45]. In *Mycobacterium tuberculosis* the Ala<sub>61</sub>Pro and Ala<sub>61</sub>Met mutations conferred resistance to the drug R207910 (TMC207) [48,49] (see Fig. 6). The natural substitutions of the conserved residues Ala<sub>61</sub> and Cys<sub>65</sub> to Ser in both cases in the c-subunits of chlorophycean algae could explain the weak binding of oligomycin to the *Polytomella* enzyme and the oligomycin-insensitivity exhibited by *C. reinhardtii* *in vivo* [50]. In contrast, DCCD abolished ATP hydrolysis of the algal enzyme at concentrations similar to those used for the bovine [51] and *E. coli* [28] enzymes. Modification of a glutamate residue in a single c subunit of the c-ring is known to block rotation and ATP hydrolysis completely [52]. In this case, E<sub>59</sub> is conserved in subunit c of *Polytomella* sp. (Fig. 6).

ADP acted as a competitive inhibitor of ATP [53] with a  $K_i$  of 0.77 mM, also in the range of what has been reported for other mitochondrial  $F_1F_0$ -ATPases (0.3 mM) [54]. In contrast to the bovine [36], and thermophilic bacteria [37] ATP synthases, the algal enzyme hydrolyzed ATP in a wide pH range (6.0–8.5) without exhibiting an optimum around 8.0. In order to calculate the activation energy of the hydrolytic reaction carried out by the dimeric ATPase, ATP hydrolysis was assayed on a range of temperatures (15–60 °C); the enzyme was found capable of hydrolysing ATP even at 60 °C. This is unusual for enzymes isolated from mesophilic organisms, and reflects the relative stability of the dimeric algal enzyme to high temperatures. The activity at higher temperatures was not due to the liberation of the  $F_1$  sector, since full oligomycin sensitivity was observed at all temperatures. The reaction exhibited activation energy of 4.1 kcal/mol, similar to that reported for



**Fig. 6.** Multiple sequence alignment of subunit c of ATP synthase. Sequences from *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus*, *Homo sapiens* and the algae *Polytomella sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Volvox carteri* were aligned using MUSCLE. Gray shading shows residues important for oligomycin binding. Residues that confer resistance to the inhibitor when mutated are in a black box. Arrow-heads point the mutated positions found in algae and the asterisk indicates the proton-binding glutamic residue that reacts with DCCD.

the bovine ATPase (4.8 kcal/mol) [36]. In these assays, the algal ATPase displayed a lag period, indicative of a transition from an inactive to a fully active hydrolytic form. We call this a hysteretic response, in accordance with Frieden [55]. Different states of the  $F_1$ -ATPase, that differ in ATPase activity or ligand binding, have been described for both the soluble [56,57] and the membrane-bound enzyme [58]. The nature of the hysteretic process can be explained mechanistically by ligand-induced conformational changes, dissociation/displacement of ligands or inhibitors, and enzyme polymerization/depolymerization of the enzyme [23]. Since the algal enzyme is a stable dimer, enzyme depolymerization can be ruled out as the cause of the hysteretic behavior. Hysteresis has also been reported for the *B. taurus*  $F_1$ -ATPase [31] and for the *E. coli*  $F_1F_0$ -ATPase [59]. For the bovine enzyme this behavior was attributed, at least partially, to the binding of ADP at non-catalytic sites that slowly induced conformational changes leading to a more compact structure of the  $F_1$  sector [60]. For *E. coli*, hysteresis was explained by the binding of ADP at non-catalytic sites and by a conformational transition of subunit  $\epsilon$  from an inhibitory extended state to a contracted state [61]. The inverse dependence of the lag time on temperature strongly suggests that hysteresis takes place due to slow conformational changes in the protein that could be related to the release of an inhibitory peptide from the  $F_1$  sector. This is in accordance with the observations made with the beef mitochondrial ATPase, where a transition from an inactive to an active state was attributed to the release of the inhibitory peptide  $IF_1$  [62]. A potentially important role that hysteresis may play in the living organism is that of damping out a cellular response to some rapid fluctuations in substrate concentrations [23]. Thus, the phenomenon observed with the isolated enzyme *in vitro* may reflect an important role in metabolic regulation *in vivo*.

The majority of mechanistic studies have focused on the ATP hydrolysis either of the  $F_1$  sector or of the monomeric  $F_1F_0$ -ATP synthase. These studies have been performed with the explicit or implicit assumption that the enzyme operates *in vivo* as a monomer. Dimers and higher oligomeric forms of ATP synthase have been found in mitochondria of yeast [63], plants [64], fungi [65], bovine [66], rat [67] and *Polytomella sp.* [68]. It is now widely accepted that cristae morphology depends on the assembly of the ATP synthase into dimer rows [65] which may also contribute to optimize  $\Delta\mu H^+$  formation [69]. To our knowledge, this work constitutes the first kinetic study carried out in a dimeric ATP synthase. We show that the algal enzyme displays a non-Michaelis-Menten behavior and can function on a wide range of pH and temperature. It is worth to explore if these characteristics are due to its atypical subunit composition and peculiar overall architecture, and if its hysteretic behavior actually plays a regulatory role *in vivo*.

## Acknowledgments

This manuscript is dedicated to the memory of Professor Armando Gómez-Puyou, whose scientific contributions and teachings inspired us and many generations of Mexican bioenergeticists.

We are grateful for the suggestions and criticisms made to our manuscript by our colleagues at IFC (UNAM): Professors Marietta Tuena and Georges Dreyfus. We are indebted to Professor Marina Gavilanes-Ruiz (Facultad de Química, UNAM) for teaching us the colorimetric technique for ATP hydrolysis. We acknowledge the technical expertise of M. Vázquez-Acevedo (IFC-UNAM) and J. De la Mora (Georges Dreyfus laboratory, IFC-UNAM). This research was supported by grant 239219 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Additional support was received from grants, IN203114 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico). CONACyT also supported A.V.-Q. with the fellowship 229468 during her graduate studies at the Biomedical Sciences Ph.D. Program at UNAM (Posgrado en Ciencias Biomédicas). This manuscript partially fulfills the requirements of A.V.-Q. to obtain her Ph.D. degree.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.018>.

## References

- [1] M. Futai, G.H. Sun-Wada, Y. Wada, in: M. Futai, G.H. Sun-Wada, Y. Wada (Eds.), *Handbook of ATPases: Biochemistry, Cell Biology, Pathophysiology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2004.
- [2] P. Mitchell, *Nature* 191 (1961) 144–148.
- [3] P. Mitchell, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 41 (1966) 445–502.
- [4] R.A. Capaldi, R. Aggeler, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 154–160.
- [5] M. Alfonso, M.A. Kandrach, E. Racker, *J. Bioenerg. Biomembr.* 13 (1981) 375–391.
- [6] D. Pogoryelov, O. Yildiz, J.D. Faraldo-Gomez, T. Meier, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 1068–1073.
- [7] D.M. Rees, A.G. Leslie, J.E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 21597–21601.
- [8] T.R. Golden, P.L. Pedersen, *Biochemistry* 37 (1998) 13871–13881.
- [9] J.E. Walker, V.K. Dickson, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 286–296.
- [10] R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernandez, D. Gonzalez-Halphen, *Plant Physiol.* 132 (2003) 318–330.
- [11] R. van Lis, G. Mendoza-Hernandez, G. Groth, A. Atteia, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1190–1199.
- [12] N.V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, H.P. Braun, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5769–5772.
- [13] M. Vazquez-Acevedo, P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle, D. Gonzalez-Halphen, *J. Bioenerg. Biomembr.* 38 (2006) 271–282.
- [14] M. Allegretti, D. Mills, J. Vonck, W. Kühlbrandt, K. Davies, *Nature* (2015).
- [15] P. Cardol, D. Gonzalez-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R.F. Matagne, C. Remacle, *Plant Physiol.* 137 (2005) 447–459.
- [16] A. Cano-Estrada, M. Vazquez-Acevedo, A. Villavicencio-Queijeiro, F. Figueroa-Martinez, H. Miranda-Astudillo, Y. Cordeiro, J.A. Mignaco, D. Foguel, P. Cardol, M. Lapaille, C. Remacle, S. Wilkens, D. Gonzalez-Halphen, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1439–1448.
- [17] A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vazquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gomez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scofano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. Gonzalez-Halphen, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 1–13.
- [18] A. Atteia, R. van Lis, S.I. Beale, *Eukaryot. Cell* 4 (2005) 2087–2097.
- [19] H. Schagger, H. Aquila, G. Von Jagow, *Anal. Biochem.* 173 (1988) 201–205.
- [20] M.A. Markwell, S.M. Haas, L.L. Bieber, N.E. Tolbert, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [21] M.E. Pullman, H.S. Penefsky, A. Datta, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3322–3329.

- [22] P. Kuzmic, *Methods Enzymol.* 467 (2009) 247–280.
- [23] K.E. Neet, G.R. Ainslie Jr., *Methods Enzymol.* 64 (1980) 192–226.
- [24] S. Chifflet, A. Torriglia, R. Chiesa, S. Tolosa, *Anal. Biochem.* 168 (1988) 1–4.
- [25] P. Gonzalez-Romo, S. Sanchez-Nieto, M. Gavilanes-Ruiz, *Anal. Biochem.* 200 (1992) 235–238.
- [26] R.C. Edgar, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1792–1797.
- [27] J. Symersky, D. Osowski, D.E. Walters, D.M. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 13961–13965.
- [28] M. Toei, H. Noji, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 25717–25726.
- [29] Y. Hirono-Hara, H. Noji, M. Nishiura, E. Muneyuki, K.Y. Hara, R. Yasuda, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 13649–13654.
- [30] A.F. Fitin, E.A. Vasilyeva, A.D. Vinogradov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86 (1979) 434–439.
- [31] I.Y. Drobinskaya, I.A. Kozlov, M.B. Murataliev, E.N. Vulfov, *FEBS Lett.* 182 (1985) 419–424.
- [32] K.R. Dunham, B.R. Selman, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 212–218.
- [33] R.I. Feldman, P.D. Boyer, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 13088–13094.
- [34] M. Yoshida, W.S. Allison, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14407–14412.
- [35] D.J. Hyndman, Y.M. Milgrom, E.A. Bramhall, R.L. Cross, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28871–28877.
- [36] P. Swanljung, L. Frigeri, K. Ohlson, L. Ernster, *Biochim. Biophys. Acta* 305 (1973) 519–533.
- [37] G.M. Cook, S. Keis, H.W. Morgan, C. von Ballmoos, U. Matthey, G. Kaim, P. Dimroth, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 4442–4449.
- [38] A.C. Haagsma, N.N. Driessen, M.M. Hahn, H. Lill, D. Bald, *FEMS Microbiol. Lett.* 313 (2010) 68–74.
- [39] D.L. Foster, M.E. Mosher, M. Futai, R.H. Fillingame, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 12037–12041.
- [40] F. Zanotti, A. Gnani, R. Mangiullo, S. Papa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (2009) 43–48.
- [41] G. Nurani, L.G. Franzen, *Plant Mol. Biol.* 31 (1996) 1105–1116.
- [42] A. Atteia, G. Dreyfus, D. Gonzalez-Halphen, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 275–284.
- [43] H.S. Penefsky, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 3579–3585.
- [44] D.S. Perlin, L.R. Latchney, A.E. Senior, *Biochim. Biophys. Acta* 807 (1985) 238–244.
- [45] W. Sebald, W. Machleidt, E. Wachter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (1980) 785–789.
- [46] B.G. Ooi, C.E. Novitski, P. Nagley, *Eur. J. Biochem.* 152 (1985) 709–714.
- [47] M. Galanis, J.R. Mattoon, P. Nagley, *FEBS Lett.* 249 (1989) 333–336.
- [48] K. Andries, P. Verhasselt, J. Guillemont, H.W. Gohlmann, J.M. Neefs, H. Winkler, J. Van Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis, V. Jarlier, *Science* 307 (2005) 223–227.
- [49] S. Petrella, E. Cambau, A. Chaufour, K. Andries, V. Jarlier, W. Sougakoff, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 2853–2856.
- [50] M. Lapaille, A. Escobar-Ramirez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodriguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. Gonzalez-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 1630–1644.
- [51] E. Glaser, B. Norling, J. Kopecky, L. Ernster, *Eur. J. Biochem.* 121 (1982) 525–531.
- [52] J. Hermolin, R.H. Fillingame, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 3896–3903.
- [53] G.G. Hammes, D.A. Hilborn, *Biochim. Biophys. Acta* 233 (1971) 580–590.
- [54] A.D. Vinogradov, *J. Exp. Biol.* 203 (2000) 41–49.
- [55] C. Frieden, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5788–5799.
- [56] R. Adolfsen, E.N. Moudrianakis, *Biochemistry* 15 (1976) 4163–4170.
- [57] R. Adolfsen, E.N. Moudrianakis, *Arch. Biochem. Biophys.* 172 (1976) 425–433.
- [58] R. Adolfsen, J.A. McClung, E.N. Moudrianakis, *Biochemistry* 14 (1975) 1727–1735.
- [59] P.P. Laget, *Arch. Biochem. Biophys.* 192 (1979) 474–481.
- [60] A. Di Pietro, F. Penin, C. Godinot, D.C. Gautheron, *Biochemistry* 19 (1980) 5671–5678.
- [61] B.A. Feniouk, T. Suzuki, M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 764–772.
- [62] A. Gomez-Puyou, M.T. de Gomez-Puyou, L. Ernster, *Biochim. Biophys. Acta* 547 (1979) 252–257.
- [63] I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert, R.A. Stuart, H. Schagger, *EMBO J.* 17 (1998) 7170–7178.
- [64] H. Eubel, L. Jansch, H.P. Braun, *Plant Physiol.* 133 (2003) 274–286.
- [65] K.M. Davies, C. Anselmi, I. Wittig, J.D. Faraldo-Gomez, W. Kuhlbrandt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 13602–13607.
- [66] H. Schagger, K. Pfeiffer, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783.
- [67] I. Wittig, R. Carrozzo, F.M. Santorelli, H. Schagger, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1066–1072.
- [68] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohann, H.P. Braun, E.J. Boekema, *Biochim. Biophys. Acta* (1979) 272–277.
- [69] M. Strauss, G. Hofhaus, R.R. Schroder, W. Kuhlbrandt, *EMBO J.* 27 (2008) 1154–1160.



Contents lists available at ScienceDirect

## Mitochondrion

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mito](http://www.elsevier.com/locate/mito)

## The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic Trypanosomatidae

Emilie Perez<sup>a,b</sup>, Marie Lapaille<sup>a</sup>, Hervé Degand<sup>d</sup>, Laura Cilibrasi<sup>a</sup>, Alexa Villavicencio-Queijeiro<sup>e</sup>, Pierre Morsomme<sup>d</sup>, Diego González-Halphen<sup>e</sup>, Mark C. Field<sup>f</sup>, Claire Remacle<sup>a,c</sup>, Denis Baurain<sup>b,c,\*</sup>, Pierre Cardol<sup>a,c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Genetics and Physiology of Microalgae, Department of Life Sciences, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>b</sup> Eukaryotic Phylogenomics, Department of Life Sciences, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>c</sup> PhytoSYSTEMS, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>d</sup> Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

<sup>e</sup> Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>f</sup> Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, University of Dundee, Dundee, Scotland DD1 5EH, United Kingdom

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 6 February 2014

Accepted 7 February 2014

Available online xxxx

## Keywords:

Euglenozoa

Trypanosomatidae

OXPHOS

Proteomics

Sequence database mining

Large-scale phylogenetics

## ABSTRACT

The mitochondrion is an essential organelle for the production of cellular ATP in most eukaryotic cells. It is extensively studied, including in parasitic organisms such as trypanosomes, as a potential therapeutic target. Recently, numerous additional subunits of the respiratory-chain complexes have been described in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. Since these subunits had apparently no counterparts in other organisms, they were interpreted as potentially associated with the parasitic trypanosome lifestyle. Here we used two complementary approaches to characterise the subunit composition of respiratory complexes in *Euglena gracilis*, a non-parasitic secondary green alga related to trypanosomes. First, we developed a phylogenetic pipeline aimed at mining sequence databases for identifying homologues to known respiratory-complex subunits with high confidence. Second, we used MS/MS proteomics after two-dimensional separation of the respiratory complexes by Blue Native- and SDS-PAGE both to confirm *in silico* predictions and to identify further additional subunits. Altogether, we identified 41 subunits that are restricted to *E. gracilis*, *T. brucei* and *T. cruzi*, along with 48 classical subunits described in other eukaryotes (*i.e.* plants, mammals and fungi). This moreover demonstrates that at least half of the subunits recently reported in *T. brucei* and *T. cruzi* are actually not specific to Trypanosomatidae, but extend at least to other Euglenozoa, and that their origin and function are thus not specifically associated with the parasitic lifestyle. Furthermore, preliminary biochemical analyses suggest that some of these additional subunits underlie the peculiarities of the respiratory chain observed in Euglenozoa.

© 2014 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

## 1. Introduction

The mitochondrion is a eukaryotic organelle acquired through endosymbiosis of an  $\alpha$ -proteobacterium by either an ancestral eukaryote (Dyall et al., 2004; Gray et al., 1999) or an archaeon (Martin and Muller, 1998). Subsequently the vast majority of genes encoding mitochondrial proteins were transferred from the mitochondrial genome to the nuclear genome, and the residual mitochondrial genome

mainly encodes products involved in the synthesis of mitochondrial proteins (tRNA and rRNA) and some subunits of the oxidative phosphorylation complexes (Gabaldon and Huynen, 2005; Saccone et al., 2006). The mitochondrion plays a central role in energy production as the site of the latter stages of respiration, *i.e.*, the Krebs cycle in the matrix and oxidative phosphorylation in the inner membrane. The respiratory chain consists of four classical multi-protein complexes: complex I (CI or NADH:ubiquinone oxidoreductase, EC 1.5.6.3), complex II (CII or succinate:ubiquinone oxidoreductase, EC 1.3.5.1), complex III (CIII or ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase, EC 1.10.2.2) and complex IV (CIV or cytochrome *c* oxidase, EC 1.9.3.1). Except for CII, these complexes couple electron transfer with translocation of protons from the matrix to the intermembrane space, generating a proton gradient used by a fifth complex (CV or F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, EC 3.6.3.14) for ATP synthesis. Many organisms however have alternative pathways that transfer

\* Correspondence to: D. Baurain, Bvd du Rectorat, 27, B22, Institute of Botany, Dept of Life Sciences, University of Liège, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 3663864.

\*\* Correspondence to: P. Cardol, Bvd du Rectorat, 27, B22, Institute of Botany, Dept of Life Sciences, University of Liège, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 3663840.

E-mail addresses: [denis.baurain@ulg.ac.be](mailto:denis.baurain@ulg.ac.be) (D. Baurain), [Pierre.cardol@ulg.ac.be](mailto:Pierre.cardol@ulg.ac.be) (P. Cardol).

electrons without concomitant proton translocation, such as type-II NAD(P)H dehydrogenases (from NAD(P)H to ubiquinone) and alternative oxidases (AOX; from ubiquinol to molecular oxygen) (Michalecka et al., 2003; Van Aken et al., 2009).

Phylogenetic relationships amongst eukaryotes are notoriously difficult to resolve and thus highly disputed. In two recent syntheses of the phylogenetic literature, eukaryotes are considered as composed of about 6–9 major lineages, of which well-studied green plants, fungi and animals only correspond to a very small fraction (Adl et al., 2012; Walker et al., 2011). Amongst these major lineages excavates are a putative assemblage of (often heterotrophic) flagellates, proposed on the basis of shared morphological characters (e.g., the ventral feeding groove and associated cytoskeletal structures) and molecular data. Excavates are subdivided into two subgroups, Metamonada and Discoba, the latter consistently recovered in phylogenomic analyses (Hampl et al., 2009; Zhao et al., 2012). Within Metamonada, most lineages lack typical mitochondria and instead possess hydrogenosomes (e.g., *Trichomonas* in parabasalids) or mitosomes (e.g., *Giardia* in diplomonads) (Adl et al., 2012; Walker et al., 2011). In contrast, the three lineages comprising Discoba are mostly mitochondriate: Heterolobosea have a regular mitochondrion with a very gene-rich genome (e.g., *Naegleria gruberi*) (Gray et al., 2004), Jakobids harbour mitochondria retaining one of the highest gene complements known to date (e.g., *Reclinomonas* and *Andalucia*) (Burger et al., 2013; Lang et al., 1997), and, finally, Euglenozoa are a very diverse collection of protists, some of which are parasitic (e.g., Trypanosomatidae in kinetoplastids), others photosynthetic (e.g., euglenophytes in euglenids) or free-living heterotrophs (e.g., diplomemids). Yet, all of them present very complex mitochondria with discoidal cristae (Simpson, 1997).

Amongst the studied Trypanosomatidae are many pathogens, including *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*, respectively causing sleeping sickness, Chagas' disease and leishmaniasis in humans. Extensively studied, these parasites are characterised by a complex life cycle and an energetic metabolism possessing many unique features. On the one hand, an alternative electron transfer chain, composed of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) and an alternative oxidase (TAO or AOX), replaces the classical complexes I–IV during the bloodstream (or mammalian-infective) stage (Chaudhuri et al., 2006). On the other hand, respiratory complexes I–IV and the ATP synthase (complex V) found in the procyclic (or insect-infective) stage of trypanosomes possess many apparently-specific additional subunits (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009; Panigrahi et al., 2008; Zikova et al., 2008, 2009).

*Euglena gracilis* is a secondary green alga, stemming from a secondary endosymbiosis between a prasinophyte green alga and a eukaryotic phagotroph belonging to the euglenids (Gibbs, 1981; Turmel et al., 2009). The *E. gracilis* mitochondrion harbours all of the classical respiratory-chain complexes. However, besides CIII, that is sensitive to antimycin A but insensitive to myxothiazol (Moreno-Sánchez et al., 2000), an antimycin A-resistant alternative pathway with CIII-like activity (including the proton translocation) carries a minor fraction of the electron flux in the presence of antimycin A (Sharpless and Butow, 1970b). *E. gracilis* also has an AOX that is active at pH 6.5 and at temperatures below 20 °C (Castro-Guerrero et al., 2004), as well as a cytochrome *c* oxidase activity partially insensitive to cyanide in the presence of L-lactate (Moreno-Sánchez et al., 2000). Its CIV, meanwhile, has a very unusual subunit composition (Bronstrup and Hachtel, 1989).

In this work, we analysed the subunit composition of the classical respiratory chain complexes (CI–V) in *E. gracilis* by combining targeted proteomics, complete proteome database mining and thorough phylogenetic analyses. We show that beyond the subunits found in all mitochondriate eukaryotes studied so far, *E. gracilis* mitochondria also contain a minimum of 40 subunits previously identified only in parasitic Trypanosomatidae (kinetoplastids). Their presence in this photosynthetic alga belonging to a group of non-parasitic euglenids and, for some also retained in the colourless *Euglena longa* and/or in the free-

living *Diplonema papillatum* (diplomemids), extends their distribution to at least Euglenozoa as a whole. These data also strongly suggest that these additional subunits are not associated with a parasitic lifestyle, but rather have a fundamental role in the Euglenozoa.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strain and growth conditions

The *E. gracilis* strain used in this work (SAG 1224-5/25) was obtained from the University of Göttingen (Sammlung von Algenkulturen, Germany). Cells were grown in the dark (DK) or under low (50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; LL) or medium (200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; ML) light at 25 °C, in liquid mineral Tris-minimum-phosphate (TMP) at pH 7.0 supplemented with a mix of vitamins (biotin 10<sup>-7</sup>%, B12 vitamin 10<sup>-7</sup>% and B1 vitamin 2  $\times$  10<sup>-5</sup>% (w/v)) and eventually with an organic carbon source (acetate 17 mM or 60 mM, ethanol 20 mM or 200 mM) (Harris, 1989; Mego and Farb, 1974; Sharpless and Butow, 1970a). In all experiments, cells in exponential phase (1–2  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL) were harvested by centrifugation for 10 min at 500–1500 g.

### 2.2. Oxygen consumption

Dark respiration rates were measured using a Clark Electrode (Hansatech Instruments, King's Lynn, England) as described in Duby and Matagne (1999). Rotenone (CI, 1–200  $\mu\text{M}$ ), antimycin A (CIII, 0.5–20  $\mu\text{M}$ ), SHAM (AOX, 0.2–2 mM), myxothiazol (CIII, 1–20  $\mu\text{M}$ ), cyanide (CIV, 0.02–2 mM) and oligomycin (CV, 0.5–40  $\mu\text{M}$ ) were added to cells grown in the presence of 60 mM acetate under low light.

### 2.3. Protein extracts

Crude total membrane fractions were prepared according to Remacle et al. (2001). The crude mitochondrial fraction was obtained as described by Moreno-Sánchez and Raya (1987). At the end of this protocol, the supernatant was centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4 °C and the pellet containing all organelles was suspended in 250  $\mu\text{L}$  of buffer (Remacle et al., 2001) and loaded onto a mannitol/Percoll gradient (Percoll 250 mM mannitol 13%, 21% and 45% (v/v)). The gradient and sample were centrifuged for 50 min at 40,000 g at 4 °C. Mitochondria were collected at the interface between the 21% and 45% layers and then washed twice by centrifugation for 10 min at 11,000 g at 4 °C. The mitochondrial pellet was finally recovered in 300  $\mu\text{L}$  of buffer. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976).

To assess the purity of mitochondrial fractions, we first determined that chlorophyll content was below the detection threshold (<10<sup>-3</sup>  $\mu\text{g}$  chlorophyll per  $\mu\text{g}$  of protein). We also performed a preliminary analysis of the total protein content of mitochondrial fractions by LC-MS/MS analysis. Amongst the ~400 proteins that matched known proteins in GenBank (nr) (Benson et al., 2013) (E-value <10<sup>-10</sup>), >80% corresponded to known mitochondrial components (data not shown).

### 2.4. Enzyme activities

Enzyme activity analyses were performed on crude total membrane fractions (50–150  $\mu\text{g}$  of protein) from cells grown in the presence of 17 mM acetate under low light. CI (rotenone-sensitive NADH:duroquinone oxidoreductase), CII + CIII (succinate:cytochrome *c* oxidoreductase) and CIV (cyanide-sensitive cytochrome *c* oxidase) activities were measured as described in Cardol et al. (2002) and Remacle et al. (2001). CV (oligomycin-sensitive ATP synthase) activity was measured as described in Villavicencio-Queijeiro et al. (2009) based on the method from Pullman et al. (1960). The specific activities were reported as the activity inhibited by maximal concentration of inhibitors used *in vivo* (see Results).



## 2.5. Protein electrophoresis

To conduct Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analyses (Schagger and von Jagow, 1991), protein complexes were first solubilised in the presence of either N-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (0.25–1.5%), digitonin (0.5–3.5%) (w/v), 750 mM epsilon-amino-n-caproic acid, 0.5 mM EDTA and 50 mM Bis-Tris pH 7.0, and centrifuged for 15 min at 15,000 g at 4 °C to remove insoluble matter. 0.5% (w/v) sodium taurodeoxycholate was then added to the supernatant prior to separation by electrophoresis on a 4–10% or 4–12% (w/v) polyacrylamide gradient BN gel.

Complex I activity was detected by incubating the gel in 100 mM HEPES–KOH pH 8.0 or Tris–HCl pH 7.5, containing 0.2 mM NADH and 0.1% (w/v) Nitroretazolium Blue chloride (NBT). ATP synthase activity was detected by incubating the gel in 50 mM HEPES pH 8.0, containing 10 mM ATP and 30 mM CaCl<sub>2</sub>.

BN-gels were also electroblotted according to standard protocols onto polyvinylidene fluoride membranes (Amersham GE Healthcare). Detection was performed using a BM Chemiluminescence Western blotting kit (Roche, Basel, Switzerland) with anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies. We used rabbit sera obtained against *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80  $\beta$  subunit (1:200,000).

Coomassie-Blue staining and the second dimensional Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedure were performed as previously described (Cardol et al., 2004).

## 2.6. Mass spectrometry (MS) analyses

Stained proteins associated with spots or bands of interest were manually excised and analysed by mass spectrometry as described in Lapaille et al. (2010). MS and MS/MS queries were performed either against the GenBank protein database (nr) (Benson et al., 2013) or against a database of conceptually translated *E. gracilis* sequences assembled from contigs of 454 genomic reads and from contigs of public ESTs (see below). Precursor tolerance of 150 ppm for MS spectra and 0.1 Da fragment tolerance for MS/MS spectra were allowed. A charge state of +1 was selected. A single trypsin miscleavage and variable modifications consisting of methionine oxidation and acrylamide-modified cysteine were allowed. For protein direct identification with MASCOT, protein scores greater than 60 were considered as significant ( $P < 0.05$ ).

## 2.7. 454 sequencing of *E. gracilis* genome

*E. gracilis* DNA sequence data were obtained from strain Z1 (kind gift from William Martin, University of Düsseldorf). Cells were maintained in Huttner's medium at ~20 °C in Erlenmeyer flasks, and with ambient illumination. Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 1000 g, washed twice with ice cold PBS and snap frozen on dry ice. Pellets were thawed and DNA extracted using a Qiagen DNAeasy extraction kit for total DNA (Qiagen UK, Manchester), and quality controlled using a NanoDrop spectrophotometer and by 1% agarose gel electrophoresis to determine that DNA was of high molecular weight. DNA was sequenced using a Titanium Roche 454 instrument and standard protocols. Approximately 1.7 million reads, corresponding to ~500 million bases that passed quality control were obtained and used in the subsequent analysis. Assembly of reads was performed using Newbler (<http://www.454.com/products/analysis-software/>).

## 2.8. In silico analyses

The initial dataset was composed of the complete protein databases of 21 organisms downloaded from various sources: *Escherichia coli* K-12 MG1655, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Rickettsia prowazekii* Rp22, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Prochlorococcus marinus* MIT9303, *Microcoleus chthonoplastes* sp. PCC 7420, *Komagataella pastoris* (NCBI RefSeq; <ftp://ftp.ncbi.nih.gov>),

*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Saccharomyces cerevisiae* (Ensembl 68; <ftp://ftp.ensembl.org>), *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Micromonas* sp. RCC299, *N. gruberi*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dictyostelium purpureum* (JGI Genome Portal; <http://genome.jgi.doe.gov>), *T. brucei*, *L. major* (TriTrypDB; <http://tritrypdb.org>), *Arabidopsis thaliana* (TAIR; <ftp://ftp.arabidopsis.org>), *Tetrahymena thermophila* (TGD; <http://www.ciliate.org>) and *Cyanidioschyzon merolae* (University of Tokyo; <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp>).

To these complete proteomes, we added our database of translated *E. gracilis* sequences used in the MS analyses (see above). Briefly, the 23,372 ESTs of *E. gracilis* available at the NCBI (as of May 24, 2012) were contiged with CAP3 (Huang and Madan, 1999) and then translated in the reading frame yielding the longest protein fragment (using BioPerl *longorf.pl* script) (Stajich et al., 2002), whereas ~250-Mbp of 454 reads was assembled with the Velvet *de novo* assembler [version 1.2.03] (Zerbino and Birney, 2008) and then translated in the same way as EST contigs.

OrthoMCL [version 2.0.3] (Li et al., 2003) was used according to the protocol of Fischer et al. (2011) with modified settings: percent-match cutoff = 20 and E-value-exponent cutoff = 1. Five values were tested for the inflation parameter ( $I = 1.1–1.5$ ), but except for the tree in Fig. 3A (see below), the analyses reported in this article are all based on the MCL-1.2 run. Orthologous groups and singletons were annotated by BLASTP [version 2.2.25+] using a list of handpicked reference protein sequences (classical subunits of the complexes of the respiratory chain and those described in trypanosomes), which allowed us to identify the groups corresponding to the respiratory complex subunits. The sequences in each annotated orthologous group were aligned with Clustal Omega [version 1.1.0] (Sievers et al., 2011) and most alignments automatically cleared of the ambiguously aligned positions and of the sequences that were too incomplete to be accurately positioned in the trees (see below for details). The final alignments were then submitted to phylogenetic analysis with PhyML [version 3.0] (Guindon et al., 2010) using the LG + F +  $\Gamma_4$  model (Le and Gascuel, 2008; Yang, 1993). The starting tree for the heuristic search was computed by parsimony and the search included both NNI (nearest-neighbour interchange) and SPR (subtree pruning and regrafting) topological moves. The resulting trees were used to select the monophyletic subgroup of interest whenever there were several paralogues included in the same OrthoMCL orthologous group (i.e., plastidial or cytosolic in addition to mitochondrial sequences). Each selected group or subgroup was then used to build a HMM profile with HMMER [version 3.0] (<http://hmm.janelia.org>). Using a customised version of HaMSTR [version 9] (Ebersberger et al., 2009), these HMM profiles allowed us to search for additional orthologous sequences in our untranslated *E. gracilis* database and in the (largely incomplete) EST databases of *E. longa* and *D. papillatum* available at the NCBI.

In order to analyse the evolution of QCR1, QCR2 and QCRTB2, we considered an additional batch of 47 broadly sampled organisms, for which we downloaded the complete protein databases: *Azospirillum brasilense*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Rhizopus delemar*, *Acanthamoeba castelanii*, *Polysphondylium pallidum*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *T. cruzi*, *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis*, *Trichomonas vaginalis*, *Galdieria sulphuraria*, *Ectocarpus siliculosus*, *Nannochloropsis gaditana*, *Cryptosporidium muris*, *P. marinus*, and *Oxytricha trifallax* (NCBI RefSeq); *Monosiga brevicollis*, *Lottia gigantea*, *Guillardia theta*, *Emiliania huxleyi*, *Aurantiochytrium limacinum*, *Aureococcus anophagefferens*, *Bigelowiella natans*, *Chlorella variabilis*, and *Ostreococcus tauri* (JGI Genome Portal); *Puccinia graminis*, *Ustilago maydis*, *Amphimedon queenslandica*, *Nematostella vectensis*, *Dictyostelium discoideum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Thalassiosira pseudonana*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* (Ensembl Genomes 17; <http://ensemblgenomes.org>), *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens*, and *Oryza sativa* (Phytozome 9.0;

<http://www.phytozome.net>); *Chondrus crispus* (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena>); *Pyropia yezoensis* (NRIFS; [http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/5\\_AG/genomes/nori](http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/5_AG/genomes/nori)); and *Cyanophora paradoxa* (Rutgers University; <http://cyanophora.rutgers.edu/cyanophora>). Finally, we also used the conceptual translation of the transcriptome of *Porphyridium purpureum* downloaded from the NCBI.

The HMM profile of the subgroup QCR1/QCR2/QCRTB2, derived from an orthologous group obtained in the MCL-1.1 run, was used to search for homologous sequences in a combined database of our 68 organisms with HMMER. To select QCR-like sequences, we drew a negative logarithmic plot of HMMER E-values using R (<http://www.R-project.org>) and set the E-value cutoff to  $10^{-107}$ , i.e., just before the first undisputable drop in  $-\log_{10}(\text{E-value})$ . The 178 retained sequences were aligned with MUSCLE [version 3.8.31] (Edgar, 2004), which resulted in a better alignment than Clustal Omega on this particular protein family. We then enriched this alignment with the four partial orthologous sequences from *E. gracilis* and *E. longa* identified by HaMStR.

Before phylogenetic analysis, the latter alignment and the MUSCLE alignment of the MCL-1.1 orthologous group were both filtered to eliminate poorly aligned positions and mostly incomplete sequences using the Bio-MUST-Core software package (D.B., unpublished). Briefly, positions due to insertions in less than 50% of the sequences were discarded. Gblocks 0.91b (Castresana, 2000) was then used with loose parameters to further filter the least reliably aligned positions. Finally, the sequences having more than 90% missing characters with respect to the longest sequence were discarded. The two pre-processed alignments were submitted to phylogenetic inference using PhyML as above, and statistical support was estimated through the analysis of 100 bootstrap pseudo-replicates (Felsenstein, 1985). Tree rooting was done manually in Seaview [version 4.4.2] (Gouy et al., 2010), while ladderisation and taxonomic colouring were automatically conducted using Bio-MUST-Core. Final trees were displayed and arranged in FigTree [version 1.4.0] (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). It is worth mentioning that a similar procedure was used to ensure that apparently Euglenozoa-specific subunits were indeed restricted to the latter group.

All *in silico* analyses were carried out on a desktop workstation running Bio-Linux 6 (<http://nebc.nerc.ac.uk/tools/bio-linux>) (Field et al., 2006).

### 3. Results

#### 3.1. *In silico* analysis of the subunit composition of respiratory-chain complexes in Euglenozoa

Additional, putatively taxon-specific, subunits of respiratory-chain complexes often share two attributes that make them difficult to be reliably identified in the genomes of non-model organisms. First, they are poorly conserved [e.g., NDUFC2/B14.5b, NDUFA7/B14.5a, NDUFA3/B9 (Cardol, 2011; Huynen et al., 2009)], which rules out simple BLAST searches and calls for iterative (e.g., PSI-BLAST) or HMM-based (e.g., HMMER) approaches. Second, they are regularly recruited from large multi-gene families with many paralogous groups, the evolution of which cannot be untangled without broadly sampled phylogenetic trees (Gabaldon and Koonin, 2013; Koski and Golding, 2001). For example, in CI, NDUFA11 is a TIM17/22-like protein, CAG9 is a gamma carbonic anhydrase, NDUFA2 features a mitochondrial ribosomal protein L51/S25/CI-B8 domain, NDUFA1 is an acyl-carrier protein, and NDUFB9 belongs to the LYR protein family while in CIII, QCR1/2 both belong to the peptidase family M16. Consequently, when searching for the orthologues of known additional subunits in a target genome, it may be hard to ensure that a given gene, identified with a weak PSI-BLAST hit, actually corresponds to the reference subunit used as the query for the search, and not to a paralogous gene of the same family, potentially fulfilling a different function in a different cell compartment. In this work, we used a carefully designed phylogenetic pipeline to ensure

maximal specificity when identifying orthologous mitochondrial proteins in five Euglenozoa (*E. gracilis*, *E. longa*, *T. brucei*, *L. major* and *D. papillatum*) and in a heterolobosean outgroup (*N. gruberi*) (Fig. 1). This higher reliability is at the expense of lower sensitivity, which means that we probably failed to identify genuine orthologous genes, some of them previously reported, e.g., in *N. gruberi* (Cardol, 2011). However, we argue our approach is sound in the context of a study aimed at expanding the taxonomic distribution of reportedly taxon-specific subunits.

To this end, we compiled an inventory of 99 subunits constituting the traditional complexes of the respiratory chain in model eukaryotes, using *S. cerevisiae*, *H. sapiens* (both Opisthokonta) and *A. thaliana* (Viridiplantae = green plants) as reference organisms. In addition, we also included the 84 apparently specific subunits described in *T. brucei* and/or *T. cruzi* (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009; Panigrahi et al., 2008; Zikova et al., 2008, 2009) (Supplemental Table 1). In the following, TC and TB notations refer to subunits described in *T. cruzi* and *T. brucei*, respectively. We then collected the complete proteomes of six bacteria (*E. coli* K-12 MG1655, *M. loti* MAFF303099, *R. prowazekii* Rp22, *Nostoc* sp. PCC 7120, *P. marinus* MIT9303, *M. chthonoplastes* sp. PCC 7420) and 15 broadly sampled eukaryotes (*H. sapiens*, *B. taurus*, *S. cerevisiae*, *K. pastoris*, *D. purpureum*, *C. merolae*, *C. reinhardtii*, *V. carteri*, *Micromonas* sp., *A. thaliana*, *P. tricornutum*, *T. thermophila*, *N. gruberi*, *T. brucei* and *L. major*). To this database, we added private 454 genomic contigs and public EST contigs of *E. gracilis*, all translated in the frame that yielded the longest predicted protein fragment (see Materials and methods for details).

In order to confidently cluster orthologous respiratory complex subunits in our complete proteomes, we first carried out an all-vs-all comparison of our database sequences using BLASTP. Application of the OrthoMCL pipeline to the resulting BLAST reports allowed us to generate between 35,800 and 49,522 orthologous groups, by varying the inflation parameter (I) from 1.1 to 1.5. These groups only contained orthologous and in-paralogous genes (due to terminal duplications), with out-paralogous genes (due to ancestral duplications) automatically sorted out into different groups. This unbiased global approach spared us the need to choose 99 specific E-value thresholds for separating orthologues from paralogues in each individual case, as done in more conventional database mining studies. For each of these five MCL runs, we annotated the orthologous groups by comparison with our inventory of reference proteins (again using BLASTP). This revealed that the value of “I” leading to the best delineation of the different subunits was 1.2. Amongst the 605 annotated orthologous groups of the MCL-1.2 run, we carefully selected one group for each subunit, generally the one including both the reference protein(s) and the largest sample of species. These 99 groups were then aligned, cleared of ambiguously aligned positions and of incomplete sequences (because short sequences hinder analyses), and finally used to compute phylogenetic trees (Supplemental Figs. 1 and 2; see also Fig. 3 below). In each of these trees, we identified and analysed the subtree corresponding to the mitochondrial paralogue (by opposition to the plastid paralogue) by its proximity to the two  $\alpha$ -proteobacteria and/or by its inclusion of the reference protein(s). However, as the sequences in our *E. gracilis* database had only been translated in a single frame and were sometimes very short, each mitochondrial subgroup was re-analysed with HaMStR (based on HMM profiles and applying the best-reciprocal hit (BRH) orthology criterion) to find additional orthologous sequences in our *E. gracilis* nucleotide database (using six-frame translation) and in the incomplete public EST databases of the secondarily non-photosynthetic *E. longa* and of the free-living diplomonid *D. papillatum*. Altogether, this allowed us to identify a total of 84 mitochondrial subunits in euglenids (*E. gracilis* and *E. longa*), 8 in *D. papillatum* and 118 in kinetoplastids (*T. brucei* and *L. major*). Note that all the subunits specifically described in trypanosomes were also found in *L. major*. This is why, in the following, we refer to them as “apparently kinetoplastid-specific subunits”. Furthermore, 60 subunits were found for the heterolobosean *N. gruberi*, which we selected as outgroup (Fig. 2). Accession numbers and

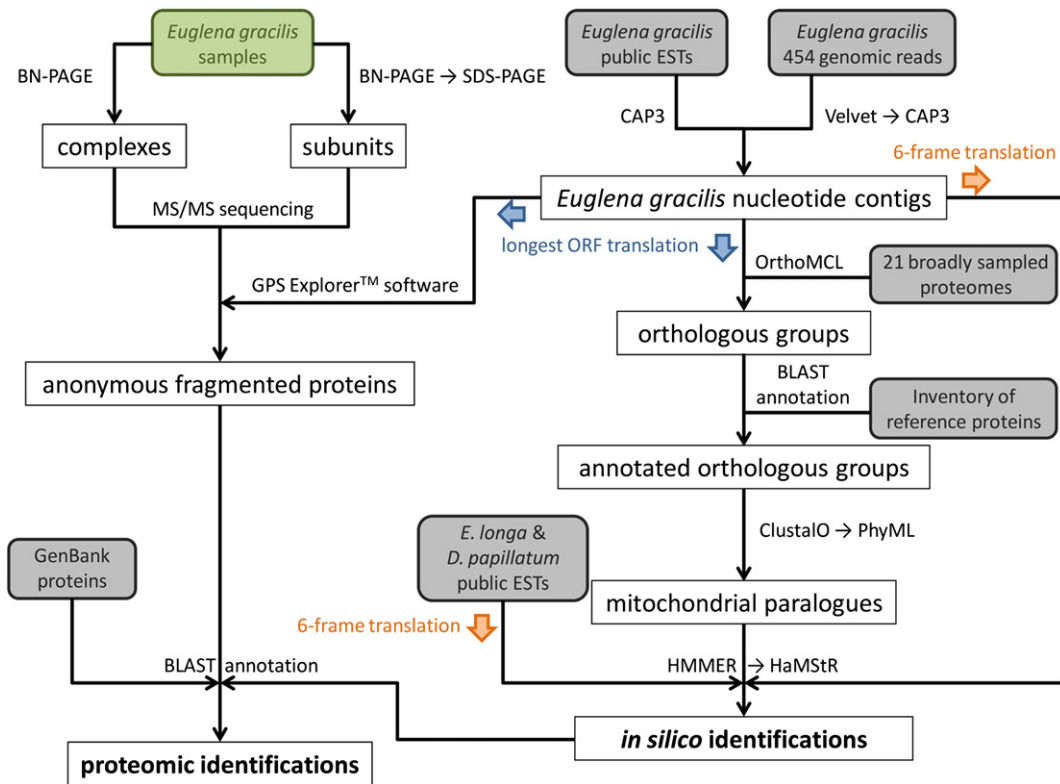


Fig. 1. Scheme of the computational pipeline for *in silico* and proteomic identifications.

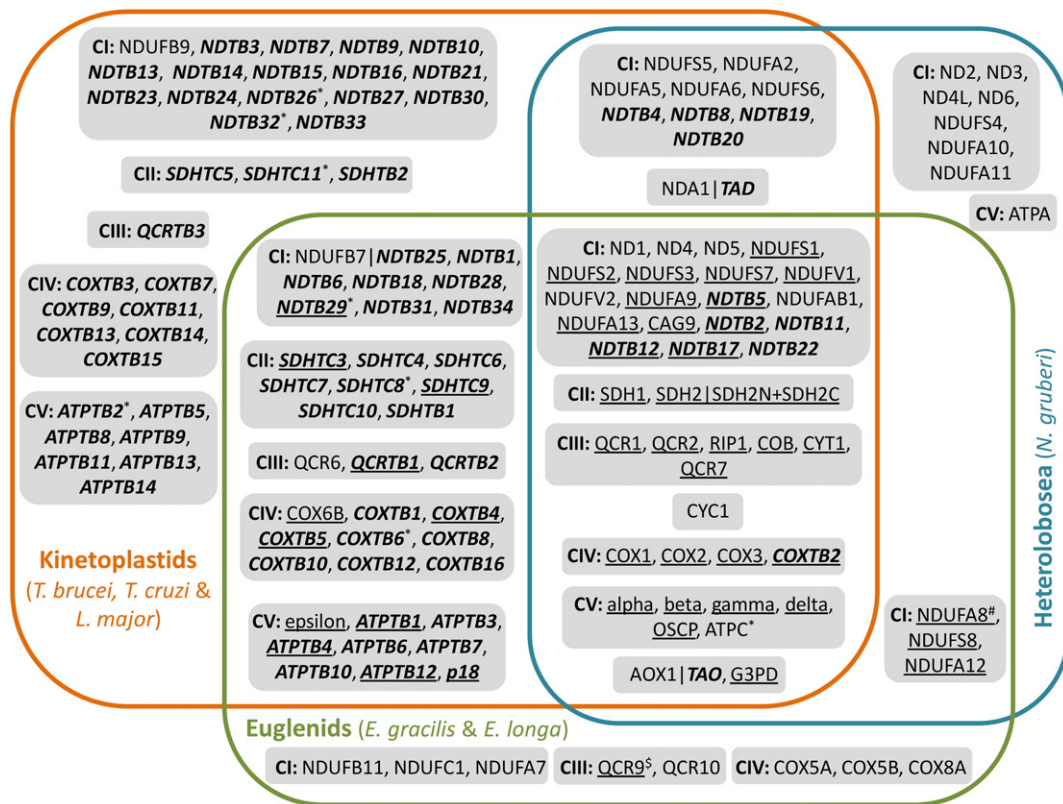


Fig. 2. Subunits of respiratory-chain complexes and proteins of alternative pathways found within euglenids (*E. gracilis* and *E. longa*), kinetoplastids (*T. brucei*, *T. cruzi* and *L. major*) and Heterolobosea (*N. gruberi*). <sup>#</sup><sup>§</sup>At the exception of *Euglena* NDUFA8 (see text for details and Fig. 6) and QCR9, all proteins were identified by bioinformatic analyses (see Supplemental Files 1 and 5). Underlined proteins were found in *E. gracilis* by proteomic analyses (see Supplemental Table 3 and Supplemental File 8). Proteins marked in bold and italics are specific to Euglenozoa. For each sector of the diagram, the proteins are grouped by respiratory complex. Proteins marked with \* were also found in diplomonads (*D. papillatum*; see Supplemental File 6). <sup>§</sup>*Euglena* QCR9 protein is not homologous to the canonical QCR9 subunit found in mammals and fungi (see text for details).

identified sequences in excavate representatives are given in Supplemental Files 1–7.

### 3.1.1. Complex I

We found 19 of the 45 conventional subunits of the eukaryotic CI in *E. gracilis*. The majority of these subunits were either core subunits (ND1/4/5, NDUFS1–3/7/8 and NDUFV1/2) that trace back to the  $\alpha$ -proteobacterial ancestor of the mitochondrion or amongst the additional subunits whose primary structure is the best conserved of CI (NDUFA7/9/12/13, NDUFAB1, NDUFB7/11, NDUFC1, and CAG9). The CAG9 group corresponds to gamma carbonic anhydrases, two of which are present in *E. gracilis* (CAG1/2). Most of these 19 proteins were also identified in *N. gruberi*. Out of the 34 additional CI subunits described in *T. brucei* as potentially kinetoplastid-specific (Acestor et al., 2011; Panigrahi et al., 2008), we found 14 subunits in *E. gracilis* (NDTB1/2/5/6/11/12/17/18/22/25/28/29/31/34) (Fig. 2). Three of these subunits were also identified in *D. papillatum* (NDTB26/29/32) and 10 in *N. gruberi* (NDTB2/4/8/11/12/17–20/22). Finally, we concluded that NDTB25 is actually homologous to a conventional subunit (NDUFB7), that NDTB5 is paralogous to a conventional subunit (NDUFA9), and that NDTB2 and NDTB3 are paralogous to each other.

### 3.1.2. Complex II

CII is typically described as a four-subunit complex in mammal/fungal species. In contrast, *T. cruzi* presents a set of 11 subunits, of which only three are identical to the conventional subunits SDH1 and the two fragments of SDH2 (SDH2N and SDH2C) (Gawryluk and Gray, 2009; Morales et al., 2009). Four of the *T. cruzi*-specific subunits (SDHTC3/6/8/9) and two other additional subunits (SDHTB1/2) have been identified in *T. brucei* (Acestor et al., 2011). Similarly, we found the canonical SDH1 and SDH2 subunits in *E. gracilis* (the latter also split in two parts, SDH2N and SDH2C), as well as eight apparently kinetoplastid-specific subunits (SDHTC3/4/6–10 and SDHTB1) (Fig. 2). In addition, SDHTC8 and SDHTC11 were identified in *D. papillatum*, while only SDH1 and SDH2 were found in *N. gruberi*.

### 3.1.3. Complex III

Amongst the 10 classical CIII subunits, eight were found in *E. gracilis* (QCR1, QCR2, RIP1, COB, CYT1, QCR6, QCR7 and QCR10) and six in *N. gruberi* (QCR1, QCR2, RIP1, COB, CYT1 and QCR7) (Fig. 2). In *T. brucei*, three additional apparently specific subunits (QCRTB1, QCRTB2 and QCRTB3) have been described (Acestor et al., 2011), two of which were found in *E. gracilis* (QCRTB1/2). Interestingly, we noticed that in the MCL-1.1 run, QCRTB2 fell in an orthologous group of M16 peptidases also containing QCR1 and QCR2. Thus, to confirm that QCRTB2 was indeed homologous to QCR1/QCR2, we aligned all the sequences of the MCL group and used the resulting alignment for inferring a phylogenetic tree (Fig. 3A). This tree allowed us to separate the sequences belonging to the subgroup QCR1/QCR2/QCRTB2 from the rest of the M16 peptidase family. To determine the evolutionary relationships between QCR1, QCR2 and QCRTB2, we built a HMM profile of this subgroup and used it to search a larger database enriched of 47 broadly sampled eukaryotic proteomes (in addition to the 21 used above; see Materials and methods for a complete list of organisms). QCR-like sequences matching the HMM profile were then aligned, supplemented with four short sequences of *E. gracilis* and *E. longa* identified by HaMStR, and finally submitted to phylogenetic analysis. From the obtained tree (Fig. 3B), we concluded that QCRTB2 was likely the result of a duplication of the QCR1 gene having taken place in the common ancestor of Euglenozoa.

### 3.1.4. Complex IV

Amongst the 13 mammalian CIV subunits (Kadenbach et al., 1983), we identified seven subunits in *E. gracilis* (COX1–3/5A/5B/6B/8A), and only three in *N. gruberi*, all encoded in the mitochondrial genome (Fig. 2). Amongst the 15 apparently kinetoplastid-specific subunits described in *T. brucei* (Zikova et al., 2008), nine were found in *E. gracilis*

(COXTB1/2/4–6/8/10/12/16), one in the partial database of *D. papillatum* (COXTB6) and one in the complete proteome of *N. gruberi* (COXTB2).

### 3.1.5. ATP synthase

Eukaryotic F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases of mammal, fungal and land plant model organisms (Collinson et al., 1994; Heazlewood et al., 2003; Velours and Arselin, 2000) usually consist of ~20 subunits, seven of which were found in *E. gracilis* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , OSCP, c), one in *D. papillatum* (subunit c) and seven in *N. gruberi* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , OSCP, a, c). Amongst the 15 apparently specific subunits described in *T. brucei* (Zikova et al., 2009), we identified eight subunits in *E. gracilis* (ATPTB1/3/4/6/7/10/12 and p18) and one in *D. papillatum* (ATPTB2) (Fig. 2).

### 3.1.6. Alternative pathways

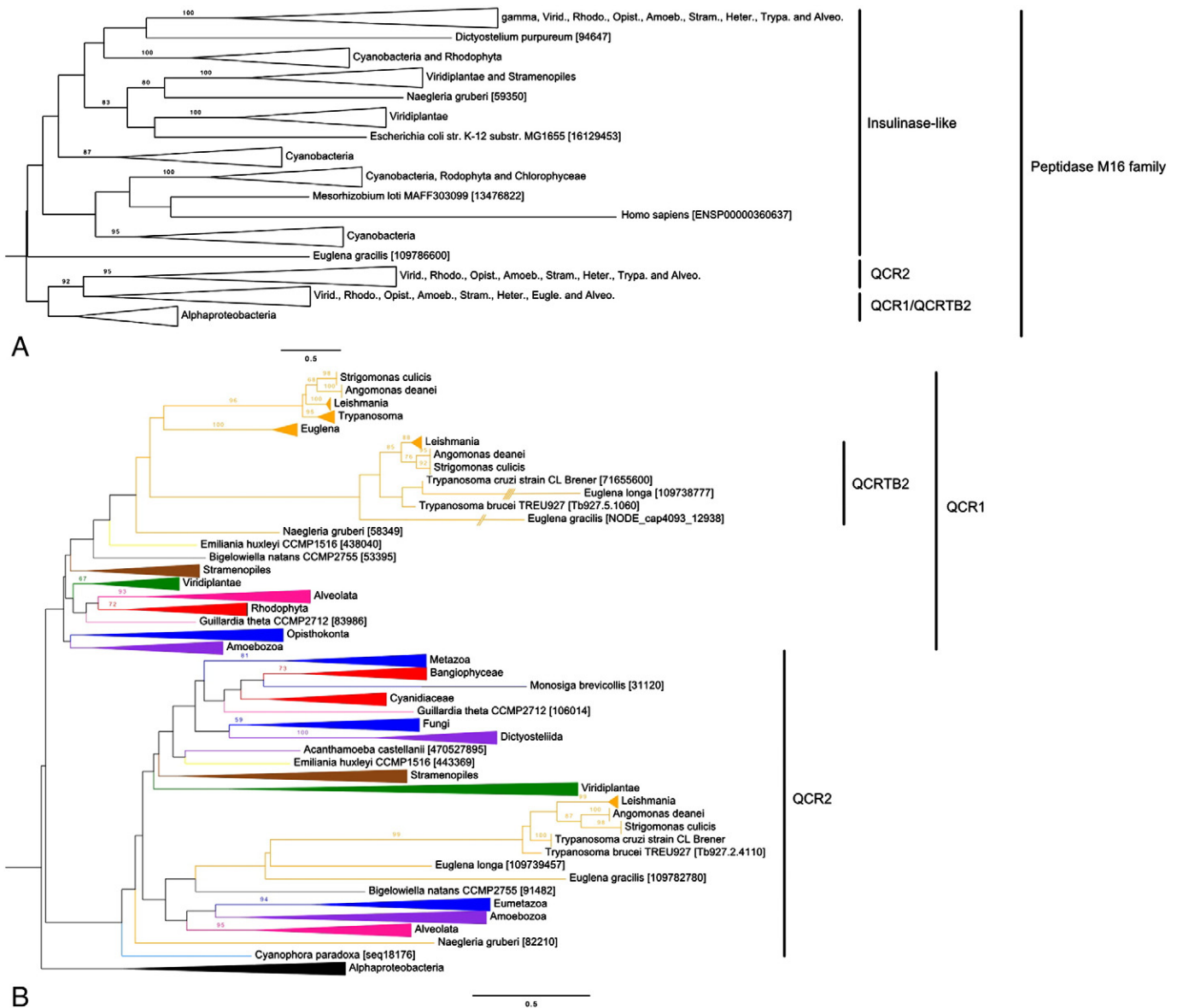
Alternative pathways described in trypanosomes are similar to the alternative pathways described in other protists, green plants and fungi: an alternative oxidase (AOX or TAO), a type-II NADH dehydrogenase (NDA or TAD) (Acestor et al., 2011; Fang and Beattie, 2002) and a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD), the activity of which compensates for the absence of oxidative phosphorylation during the bloodstream stage (Chaudhuri et al., 2006). Our analyses demonstrated that trypanosomal alternative oxidase and type-II NADH dehydrogenase are homologous to those of the other organisms. While we recovered an AOX and a G3PD in *E. gracilis*, we did not find a NDA (Fig. 2). All three of these enzymes were found in *N. gruberi*.

## 3.2. Proteomic analysis of the subunit composition of the respiratory-chain complexes in *E. gracilis*

We sought to robustly validate our *in silico* predictions by determining whether the proteins identified by data mining were *bona-fide* components of the respiratory-chain complexes in *E. gracilis*. To identify growth conditions where *E. gracilis* accumulated more mitochondria and respiratory complexes, we compared various combinations of light intensity (darkness, low light or medium light) and availability of an exogenous carbon source [absence or presence of acetate (17 mM or 60 mM) or ethanol (20 mM or 200 mM)]. For each culture, dark *in vivo* respiratory rates were then estimated (Supplemental Table 2). Oxygen consumption per cell was greater in the presence of high concentrations of acetate or ethanol, independent of light availability. The maximal value (~1.0–1.5  $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  cells) was in good accordance with a previous report (Buetow, 1961). Lowest respiration rates (~0.1  $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  cells) were observed in the absence of exogenous carbon sources.

We next tested the effect of increasing concentrations of classical potent respiratory-complex inhibitors on the *in vivo* respiratory rate. Maximal inhibition ( $I_M$ ; percentage of total respiration) and half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{M}$ ) were determined (Supplemental Fig. 3). Rotenone (CI,  $I_M = 61 \pm 8\%$ ;  $IC_{50} = \sim 20 \mu\text{M}$ ), antimycin A (CIII,  $I_M = 71 \pm 7\%$ ;  $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$ ), cyanide (CIV,  $I_M = 89 \pm 4\%$ ;  $IC_{50} = \sim 20 \mu\text{M}$ ) and oligomycin (CV,  $I_M = 62 \pm 5\%$ ;  $IC_{50} = \sim 8 \mu\text{M}$ ) inhibited respiration, suggesting that the corresponding complexes might participate in respiration. In contrast, SHAM and myxothiazol, which classically inhibit AOX and alternative CIII, respectively, did not significantly inhibit respiration. Specific enzyme activities were also measured on crude total membrane fractions using the highest inhibitor concentrations tested *in vivo*. These analyses confirmed that rotenone-sensitive NADH:duroquinone oxidoreductase (CI,  $24 \pm 6 \text{ nmol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ), antimycin A-sensitive succinate:cytochrome c oxidoreductase (CII + III,  $9 \pm 5 \text{ nmol cyt c min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ), cyanide-sensitive cytochrome c oxidase (CIV,  $58 \pm 12 \text{ nmol cyt c min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ) and oligomycin-sensitive ATP synthase (CV,  $90 \pm 40 \text{ nmol ATP min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ ) were all present in *E. gracilis*.

To analyse the composition of respiratory-chain complexes, we solubilised membrane complexes in their native form and separated them by BN-PAGE. The effect of increasing concentrations of two mild

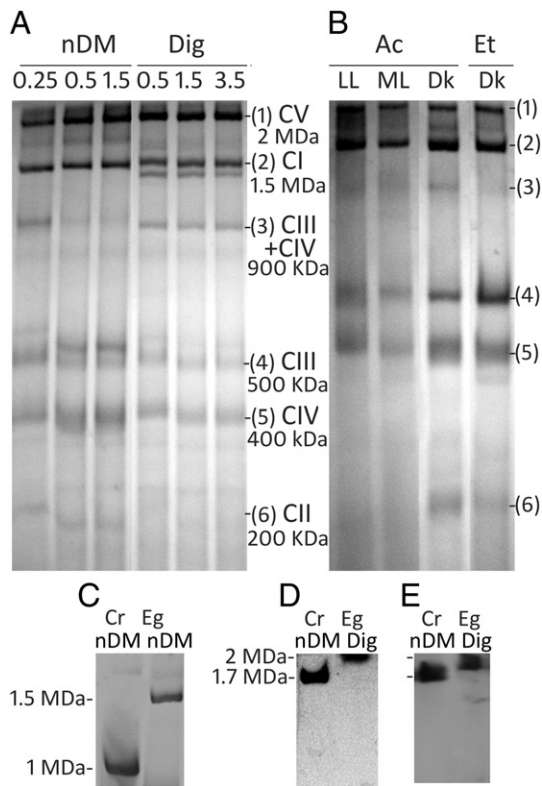


**Fig. 3.** Phylogenetic relationships between QCR1, QCR2 and QCR2B2. A. Maximum-likelihood tree (LG + F +  $\Gamma_4$  model) of the MCL group obtained with  $I = 1.1$  for the QCR1, QCR2 and QCR2B2 reference sequences (169 sequences  $\times$  207 amino acid positions). Gamma:  $\gamma$ -proteobacteria, Virid.: Viridiplantae, Rhodo.: Rhodophyta, Opist.: Opisthokonta, Amoeb.: Amoebozoa, Stram.: Stramenopiles, Heter.: Heterolobosea, Trypa.: Trypanosomatida, Eugle.: Euglenozoa, and Alveo.: Alveolata. B. Phylogenetic tree showing the paralogy between QCR1, QCR2 and QCR2B2. Black:  $\alpha$ -proteobacteria, green: Viridiplantae, red: Rhodophyta, blue: Opisthokonta, violet: Amoebozoa, brown: Stramenopiles, orange: Excavates, deep pink: Alveolata, yellow: Haptophyceae, grey: Rhizaria, azure: Glaucocystophyceae and pink: Cryptophyta. Branches marked by // and //// were reduced to one half and one quarter of their length, respectively. Bootstrap support values  $\geq 50\%$  are shown above the corresponding nodes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

non-ionic detergents (n-dodecyl maltoside and digitonin) on protein solubilisation was evaluated. For cells grown in the dark in the presence of high concentrations of acetate, six major bands ranging from ~200 kDa to ~2 MDa could be visualised (Fig. 4A). Bands 2 (~1.5 MDa) and 4 (~500 kDa) sometimes appeared as doublets. While band 3 (~900 kDa) was recovered in higher abundance with digitonin, bands 4, 5 (~400 kDa) and 6 (~200 kDa) were more abundant with n-dodecyl maltoside. We then compared the distribution of these bands in mitochondrial extracts of cells cultivated in the growth conditions yielding the highest respiratory rates (i.e., high concentrations of acetate or ethanol in the dark or in the light). However, light + ethanol conditions were avoided since they led to the well-known phenomenon of cell bleaching due to catabolite repression of chloroplast development in *E. gracilis* (Monroy and Schwartzbach, 1984). Bands 1, 2, 4, and 5 were present in every condition, while all six bands were more abundant in extracts of dark-grown cells (Fig. 4B). Further, in-gel staining aimed at

highlighting ATPase and NADH dehydrogenase activities allowed us to hypothesise that band 1 comprised ATP synthase (CV) and band 2, CI (Fig. 4C, D). Immunodetection on western blot with antibodies against the  $\beta$  subunit confirmed the presence of this CV subunit in band 1 (Fig. 4E).

The subunits of each complex separated by BN-PAGE were then tentatively resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. The starting material was a purified mitochondrial fraction from cells grown in the dark in the presence of 200 mM ethanol. As shown in Fig. 5A, at least 18, 22, 8, and 10 protein bands could be visualised for bands 1, 2, 4 and 5, respectively. The same pattern of spots was also obtained for a crude membrane extract of cells grown under low light in the presence of 60 mM acetate (data not shown). The most prominent spots were excised out of the gel and analysed by tandem mass spectrometry (MS/MS). The anonymous fragmented proteins of *E. gracilis* obtained in MS analyses were annotated using BLASTP queries against



**Fig. 4.** Coomassie-Blue stained images of respiratory-chain complexes from *Euglena gracilis* separated by BN-PAGE. A. 100  $\mu$ g of protein from crude membrane fraction of cells grown in the dark in the presence of 60 mM acetate was solubilised by treatment with n-dodecyl-maltoside (nDM) or digitonin (Dig). Detergent concentrations are given in % (w/v) above the lane. B. Crude mitochondrial fraction solubilised by treatment with 1% (w/v) nDM. Ac, 60 mM acetate; Et: 200 mM ethanol; DK: dark; LL: low light; ML: medium light. The different complexes are identified by coloration and/or mass spectrometry analysis of their constituents. C, D, and E. Proteins from crude membrane fraction of *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr) and *Euglena gracilis* (Eg) cells grown in low light in the presence of 60 mM acetate. 1.5% (w/v) detergent. Upper part of BN gels stained for NADH dehydrogenase activity using NBT as an electron acceptor (C), for ATPase activity (D) or immunoblotted with ATP synthase  $\beta$  subunit antibody (E).

GenBank (nr) and our own protein predictions (Fig. 1). Forty-seven of the 58 analysed protein spots matched a protein in our database and 30 corresponded to an annotated protein in GenBank (Fig. 5A, Supplemental Table 3). In band 1, six of the classical eukaryotic ATP synthase subunits were found ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and OSCP), in addition to four of the subunits described in *T. brucei* (ATPTB1/4/12 and p18). In band 2, we found 5 canonical CI subunits (NDUFS2/3, NDUFV1, NDUFA12/13, and 2 gamma carbonic anhydrases CAG1/2) and 3 subunits described in *T. brucei* CI (NDTB2/12/17). Two additional proteins, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) and chaperone protein HSP40 (DNAJ), were also identified. Band 4 corresponded to CIII with 4 identified subunits (QCR1/7, RIP1, QCRTB1) and band 5 to CIV with 4 known subunits (COX3/6B, COXTB4/5). Band 6 could unfortunately not be resolved into well-defined spots. A partial subunit pattern (7 bands) of band 3 was obtained from a different experiment (Fig. 5B). Interestingly, this corresponded to a mixture of CIII (500 kDa) and CIV (400 kDa), which are probably associated *in vivo* in a supercomplex (900 kDa).

In a second approach, bands 2–6 from BN-PAGE were directly excised and each band was analysed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC–MS) to identify possible additional subunits (see Supplemental File 8). Additional subunits could be identified for CI (band 2; NDUFS1/7/8, NDUFA8/9 and NDTB5/29), CIII (bands 3 and 4; CYT1, COB, QCR9), CIV (bands 3 and 5; COX1/2, COXTB2) and CII (band 6; SDH1 and SDH2N/C, SDHTC3 and SDHTC9). Surprisingly, the NDUFA8 subunit was found by proteomics but not by *in silico* analysis. This is explained by the observation that the orthologous group that annotated the protein

fragment was composed only of euglenozoan sequences, for which the first BLASTP hit was the NDUFA8 subunit of *Ciona intestinalis*, but with a high (thus not significant) E-value (0.053). In accordance with this observation, a multiple alignment built from reference NDUFA8 sequences (from *A. thaliana*, *H. sapiens* and *C. intestinalis*) showed that the NDUFA8 subunits of Euglenozoa were poorly conserved, while retaining the majority of the characteristic cysteine residues (Fig. 6). As for the NDUFA8 subunit, the QCR9 subunit was only found by proteomics. This protein was previously identified by N-terminal sequencing as a peculiar component of CIII in *E. gracilis* (Cui et al., 1994). We could not identify any similar sequences in other eukaryotes. Thus, we propose that the *Euglena* QCR9 does not exhibit any conserved domain and does not correspond to the canonical QCR9 subunit described in other species.

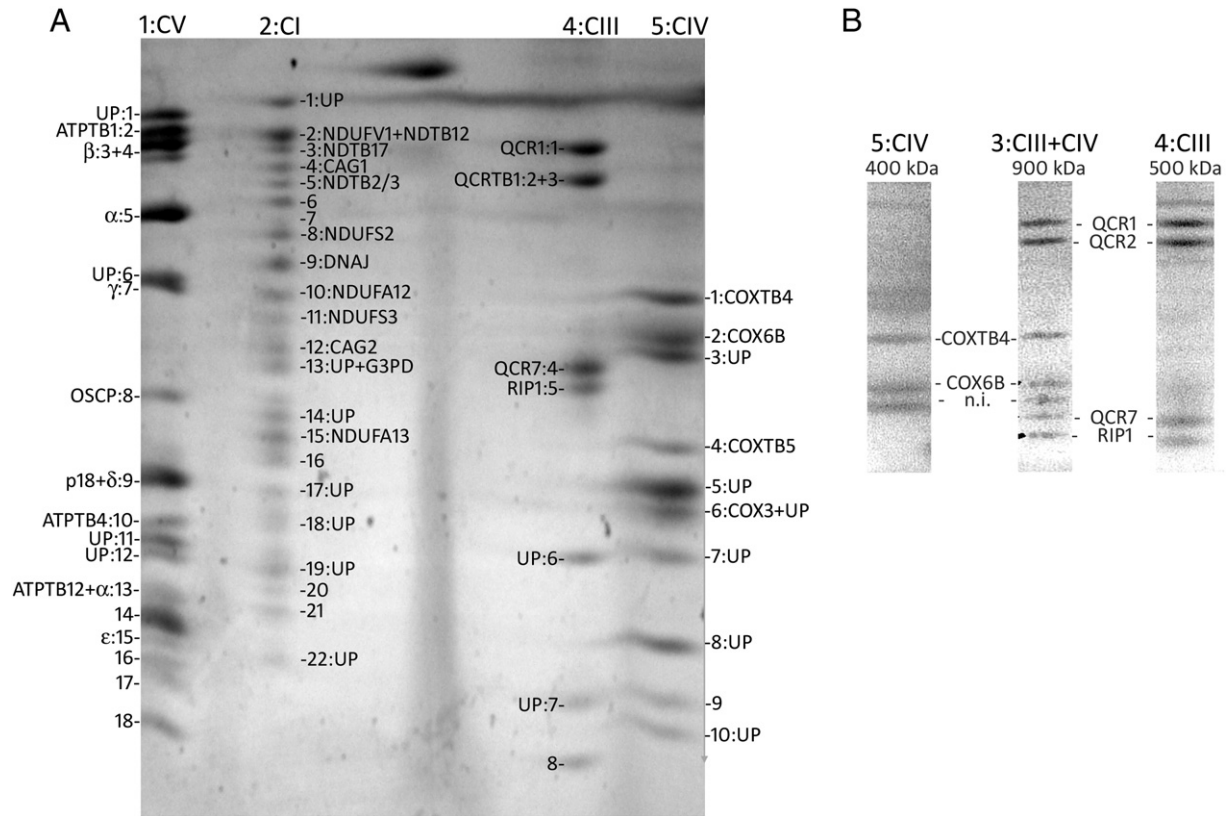
A summary of the proteins identified in this study is given in Fig. 2.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Similar subunit composition of respiratory-chain complexes in kinetoplastids and euglenids

Respiratory-chain complexes have a dual genetic origin, most subunits being encoded in the nucleus, while a few subunits of prokaryotic origin remain encoded by the mitochondrial genome (Gabaldon and Huynen, 2005; Saccone et al., 2006). Compared with their prokaryotic counterparts, mitochondrial respiratory-chain complexes have acquired additional subunits, although most of these are not directly involved in the catalytic activity of the enzyme complexes. During the last decade, many studies have highlighted the peculiarities of respiratory-chain complexes in trypanosomes (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009; Panigrahi et al., 2008; Zikova et al., 2008, 2009), in which the majority of the identified subunits are apparently unrelated to those described in green plants, mammals or fungi. Trypanosomes are part of Euglenozoa, a eukaryotic phylum first described three decades ago and grouping kinetoplastids and euglenids (Cavalier-Smith, 1981). At the same time, a secondary symbiotic origin of euglenids chloroplast was proposed (Gibbs, 1981). More recently, Euglenozoa were extended to also include diplomonids (Simpson, 1997). The mitochondrial respiratory chain of *E. gracilis* is well studied (Bronstrup and Hachtel, 1989; Buetow, 1961; Castro-Guerrero et al., 2004, 2005; Moreno-Sánchez et al., 2000; Sharpless and Butow, 1970a,b; Wilson and Danforth, 1958) but the protein composition of its complexes has only been investigated in a couple of studies (Bronstrup and Hachtel, 1989; Cui et al., 1994). In the present work, we addressed this gap by combining a conservative phylogenetic pipeline for *in silico* data mining of complete proteomes with proteomic analyses performed under multiple conditions. It is worth noting that some low molecular mass subunits may probably not be visualised by the Coomassie-Blue staining, and that some hydrophobic subunits may have been lost during the second electrophoresis step. Moreover, such proteins contain only few tryptic cleavage sites, thus generating a limited number of peptides in the mass range suitable for MS analysis. In particular, none of the seven hydrophobic core subunits, which are usually mitochondrially encoded (ND1–6, ND4L), could be detected, and which suggests that despite the multiple and exhaustive analysis presented here that the complete composition of the *E. gracilis* respiratory apparatus remains to be achieved. Nonetheless, at this stage, the respiratory-chain complexes I–V of *E. gracilis* consist of at least 92 different proteins, 79 of which are shared with trypanosomes and 34 of which, according to our analyses, appear to be restricted to Euglenozoa.

From these data, we can draw three main conclusions: (i) the peculiar subunit composition of the respiratory-chain complexes described in trypanosomes originated in the common ancestor that they share with euglenids and, for a few subunits, in the common ancestor of Discoba, since some were also identified in the heterolobosean *N. gruberi*; (ii) these data reinforce the idea that the additional subunits found in trypanosomes are genuine components of respiratory complexes of



**Fig. 5.** Two-dimensional resolution of the mitochondrial protein complexes from *Euglena gracilis*. A. BN gel lane loaded with 500 μg of protein was cut out and placed horizontally for subsequent resolution of the protein complexes into their respective components on Tricine-SDS-PAGE. The main complexes on the first dimension BN-PAGE (Fig. 4A, B) are indicated at the top of the gel. Coomassie Blue-stained image. The numbered spots correspond to polypeptides that were subject to MS/MS analysis. The corresponding sequences are given in Supplemental File 8 and Supplemental Table 3. UP, database match to an unknown protein; n.i., no annotation due to the lack of a significant score in MS analysis. B. Comparison of partial pattern of CIII (band 4), CIV (band 5) and supercomplex III + IV (band 3).

these parasites, and; (iii) contrarily to recent suggestions (Panigrahi et al., 2008), the additional subunits shared with euglenids are unlikely to play any specific role in the parasitic lifestyle of trypanosomes. Thus, besides canonical subunits shared by all eukaryotic groups, respiratory complexes I–V in Euglenozoa also possess specific subunits that either have diverged beyond recognition or have been recruited early in the evolution of the lineage. Two scenarios may account for the recruitment of new subunits: (i) acquisition of xenologous genes by lateral gene transfer, either of

bacterial or eukaryotic origin, or (ii) retargeting of cytosolic proteins to the mitochondria, possibly after duplication of the corresponding genes. In both cases, these novel subunits would have assembled to form a new scaffold around the canonical core of respiratory complexes. From our *in silico* analyses, it is not possible to differentiate between these two models, as we generally failed to identify homologues (neither paralogues or orthologues) for Euglenozoa-specific genes, even after thorough HMM searches against the 68-species database built for

<i>Euglena gracilis</i>	71	PNEQTKKEHEGIFGMGIPENVLFSFGHWYRMSQPLEKAREEYLVCKHNAKRAAPTECLE	130
<i>Trypanosoma brucei</i>	1	-MDQFTKPLEGIFRDGIPAPVLRFAFAPLYQALPSLQDAVSAASRDQYY--WRANPLKQVE	56
<i>Leishmania major</i>	1	-MEQFVQPLEGIFRDGIPAPVLRFAFAPLFQALPSLQERVEASRDQYY--WRANPMKCLE	56
<i>Ciona intestinalis</i>	35	---GILKDIKRGDLGVPSHVLKASAFQYAN--ECNEVNKEFMLCREEEM--DPRKCLK	85
<i>Homo sapiens</i>	8	---PTLEELKVDEVKISSAVLKAASAHHYGA--QCDKPNKEFMLGRWEEK--DPRRCL	58
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	---MSSAVDATGNPIPTSAVLTASAKHIGM--RCMPENVAFLCKKNDP--NPEKCLD	51
		* * *	
<i>Euglena gracilis</i>	131	EAKNMFNLYLHMSEIPFRTPKQOSADYTYCVETQGRHKPGMDYGARSFTSFVRYCLPEQE	190
<i>Trypanosoma brucei</i>	57	EDVQTVTSFMQASEASFRLLCPQQSATLLKCHMTEPA-----RALFFCRDEEW	103
<i>Leishmania major</i>	57	EDIDTVTGFMQACEASFRLLCPQQSATLLKCHMTEPA-----RAVYFCRDEEW	103
<i>Ciona intestinalis</i>	86	YNIKVSDCAENFFRKMTTACADEIVAFGKCLERDHK-----RSFVYCRDEEQV	132
<i>Homo sapiens</i>	59	EGKLVNKCALDFFRQIKRHCAEFPTEYWTCIDYTGQ-----QLFRHCRKQQA	105
<i>Arabidopsis thaliana</i>	52	KGRDVTRCVLLGLLKDHLQCKQKEMDDYVGCMYYYT-----NEFDLCKRKEE	97
		* * *	
<i>Euglena gracilis</i>	191	AFEECLGKTYGCKFPAPAHGQF---YQRSA-----RFTNLPWDNIYA----	230
<i>Trypanosoma brucei</i>	104	EWRTCLMDQTGIRFWPYANAPIG-APWSNGGQTEDFHLEDRFFYEN-FSWRRRKAAMLAV	161
<i>Leishmania major</i>	104	EWRSCLMDQTGIRFWPYANAPIG-APWSNGGQTEDFHLEDRFFYEN-FSFWRRRGAMLAV	161
<i>Ciona intestinalis</i>	133	KFDRCMFEKLGIDKKYNAVELDQTVKTRDPAPKPNFKLKNYDHPSPMPDWNRPKIED	192
<i>Homo sapiens</i>	106	KFDECVLDKLGWVRPDLGELSKG-----	128
<i>Arabidopsis thaliana</i>	98	AFEKVCPLK-----	106

**Fig. 6.** Clustal-Omega alignment between NDUFA8 sequences of *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens* and *Ciona intestinalis* and the potential NDUFA8 sequences of *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* and *Euglena gracilis*. \*: conserved characteristic cysteines of NDUFA8. Alignment formatted with Jalview [version 2.7] (Waterhouse et al., 2009).

studying the evolution of QCR1/QCR2/QCRTB2, as well as against another database of about 400 complete proteomes representative of prokaryotic diversity (data not shown). The exceptions here may be NDTB2/3/4/8/10/11/17/18/22/29, SDHTB2, QCRTB1/2 and COXTB6/16, all of which possess conserved domains (but not full-length architectures) found in other eukaryotic groups. Thus, whatever their ultimate origin, Euglenozoa-specific genes are likely to have undergone extensive evolutionary divergence.

#### 4.2. Peculiar features of respiratory-chain complexes in *E. gracilis*

Our study also highlights some interesting features at the level of individual respiratory-chain complexes in *E. gracilis*.

##### 4.2.1. Complex I

The approximate molecular mass of CI in *E. gracilis* is ~1.5 MDa. In contrast, in all eukaryotes investigated so far, including *T. brucei* (Acestor et al., 2011), the mammal *B. taurus* (Carroll et al., 2006), the yeast *Yarrowia lipolytica* (Angerer et al., 2011), the green alga *C. reinhardtii* (Cardol et al., 2004) and the amoeba *Acanthamoeba castellanii* (Gawryluk et al., 2012), CI has a molecular mass of ~900–1000 kDa. In green plants, mammals and fungi, CI has however been found in association with dimeric CIII and/or CIV, leading to supercomplexes of >1.5 MDa (Cardol et al., 2008; Dudkina et al., 2005; Schagger and Pfeiffer, 2000). However, in the present study, no evidence for the presence of CIII or CIV subunits could be obtained in the band corresponding to CI in *E. gracilis*. Compared with CI in fungi and mammals, CI in green plants (Cardol et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006), amoeba, and presumably other eukaryotes (Gawryluk and Gray, 2010) comprises additional subunits belonging to the  $\gamma$ -carbonic anhydrase (CAG) protein family. Two CAG proteins have also been specifically identified in CI of *E. gracilis*. In green plants, it has been shown that these proteins form a matrix-exposed domain (Sunderhaus et al., 2006), the presence of which does not substantially increase the molecular mass of CI. G3PD and DNAJ enzymes have also been found in association with CI in *E. gracilis*. Interestingly, a DNAJ homologue was recently identified in CI of *T. brucei* (Acestor et al., 2011). DNAJ/HSP40 (heat shock protein 40) primarily stimulates ATPase activity of HSP70 chaperones (Qiu et al., 2006) and these proteins are broadly distributed amongst eukaryotic lineages. Although we cannot completely rule out the possibility that DNAJ/HSP40 and G3PD are non-mitochondrial contaminations of the mitochondrial fraction (see Protein extracts), our study brings evidence of a potential interaction between this cohort of proteins and respiratory CI. We recently proposed that some proteins might use CI as an anchoring point and that these interactions might be rather specific to limited groups or species (Cardol, 2011): acyl carrier protein (NDUFAB1/ACPM) and deoxyribonucleoside kinase-like subunit (NDUFA10/42 kDa) in mammals, galactono-lactone dehydrogenase in land plants (Klodmann et al., 2010), or rhodanese in *Y. lipolytica* (Angerer et al., 2011). Similarly, G3PD and DNAJ could be specifically associated with CI in *E. gracilis*. Thus, the apparent higher molecular mass of *E. gracilis* CI probably does not result from an abnormal molecular mass of the canonical subunits or from association with other respiratory complexes, but might rather be the consequence of interactions with proteins bearing functions that are not directly related to CI activity.

##### 4.2.2. Complex II

CII (succinate dehydrogenase) was found to be more abundant in heterotrophic conditions compared to mixotrophic conditions. This is in good agreement with a previous report (Brown and Preston, 1975). CII usually comprises four subunits (SDH1–4): a flavoprotein (SDH1), an iron–sulphur (Fe–S) protein (SDH2) and two membrane subunits (SDH3/SDH4) providing ligands to heme *b* and a reduction site for ubiquinone. As previously pointed out (Morales et al., 2009), membrane anchor subunits are highly divergent between bacteria, mammals and other eukaryotes, and thus are difficult to identify with standard

BLAST searches (Acestor et al., 2011). Candidates for *T. cruzi* and *T. brucei* SDH3 and SDH4 were proposed based on the presence of quinone/heme-binding motifs, predicted *trans*-membrane domains and similar protein sizes, but a direct comparison with these proteins did not reveal any obvious predicted structural or motif similarity (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009). This further illustrates the difficulty to assess orthology for small hydrophobic membrane proteins [also see Discussion in (Cardol, 2011)]. Additional subunits were also found in trypanosomes (Acestor et al., 2011; Morales et al., 2009), some of them also present in *E. gracilis*. However, recruitment of taxon-specific subunits is not limited to Euglenozoa, since unrelated additional subunits have also been described in *A. thaliana* (Millar et al., 2004).

##### 4.2.3. Complex III

Unlike the four other complexes involved in the electron transfer chain, CIII of trypanosomes has a very small set of additional subunits (QCRTB1, QCRTB2 and QCRTB3), one of which (QCRTB2) is a paralogue of the QCR1 core subunit. In *E. gracilis*, seven of the ten classical CIII subunits were found (QCR1/2/6/7, RIP1, COB, and CYT1), along with two of the three subunits described in trypanosomes (QCRTB1/2). It is tempting to speculate that the switch from antimycin A-sensitive CIII activity to myxothiazol-sensitive CIII activity (the so-called *bc1*-bypass) (Moreno-Sánchez et al., 2000; Sharpless and Butow, 1970b) could be due to the differential expression of core 1 paralogues in *E. gracilis* whose presence would modify the affinity of cytochrome *b* Qo and Qi sites for myxothiazol and antimycin A, respectively.

##### 4.2.4. Complex IV

A preliminary analysis of CIV subunit composition suggested an atypical subunit composition of the enzyme, when compared to mammalian cytochrome *c* oxidase (Bronstrup and Hachtel, 1989). In the present work, the presence of four classical subunits (COX1/2/3/6B) was confirmed, along with at least three subunits described in *T. brucei* (COXTB2/4/5). These additional subunits probably constitute a different scaffold compared to the one described in mammals (Tsukihara et al., 1996); this may explain why *E. gracilis* cytochrome *c* oxidase activity was low with heterologous bovine cytochrome *c550* and 35-fold higher with the homologous *E. gracilis* cytochrome *c558* (Bronstrup and Hachtel, 1989). Euglena CIII and CIV were also found to form a supercomplex of ~900 kDa that is stabilised in the presence of the mild non-ionic detergent digitonin. This association of CIII and CIV has been previously described in *S. cerevisiae* and *B. taurus* (Cruciat et al., 2000; Schagger and Pfeiffer, 2000).

##### 4.2.5. Complex V

ATP synthase of *E. gracilis* also exhibited an unusually large molecular mass (>2 MDa). The dimeric nature of ATP synthase is now largely acknowledged in many organisms, and in mammals and yeasts, the dimer has a molecular mass of ~1.2 MDa and is thought also to be responsible for shaping mitochondrial cristae (Davies et al., 2012; Velours and Arselin, 2000; Walker et al., 1991). Beyond mammals, fungi and flowering plants, the first organism where an unusual structure and subunit composition of the mitochondrial ATP synthase was found was the green alga *C. reinhardtii* and its colourless relative *Polytomella* sp. (~1.6–1.7 MDa) (Dudkina et al., 2006; Vazquez-Acevedo et al., 2006). More recently, unusual subunit composition for the ATP synthase was also reported in the ciliate (alveolates) *T. thermophila* (Balabaskaran Nina et al., 2010), and in *T. brucei* (Zikova et al., 2009). In these species, as in *E. gracilis*, only canonical subunits involved in the  $F_1$  catalytic head ( $\alpha$ ,  $\beta$ , OSCP), the rotor (*a*, *c* ring) and the central axis ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ) have been found. In contrast, subunits involved in the peripheral stator (*b*/ATP4, *d*, *e*, *f*, *g*, etc.) are missing and have been replaced by new sets of subunits that have no counterparts in other lineages. In *E. gracilis*, we identified seven of the 14 new subunits discovered in *T. brucei*, for which no homologues could be identified outside Euglenozoa. This strongly suggests



that, as we earlier proposed in the case of mitochondrial ATP synthase from chlorophycean green algae (see Discussion in Lapaille et al., 2010), the recruitment of new subunits might be concomitant to the loss of mitochondrial genes for ATP synthase proteins (including subunit b/ATP4 gene) in the course of mitochondrial gene relocation into the nucleus.

In conclusion, our study of the mitochondrial respiratory chain in *E. gracilis* provides evidence that the additional subunits of the different complexes described in trypanosomes are not specific to kinetoplastids, but rather are at least shared with other Euglenozoa. Consequently, their presence cannot be explained by the parasitic lifestyle of Trypanosomatidae, as many Euglenozoa are non-parasitic (e.g. photosynthetic euglenids and free-living diplomonads). However, since many of these subunits are not found beyond Euglenozoa (or Discoba), these differences may explain the biochemical peculiarities observed for the respiratory-chain complexes of kinetoplastids and euglenids.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.001>.

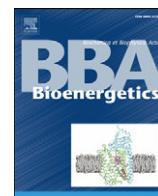
## Acknowledgements

We thank M. Radoux and G. Gain for their technical help. This work was supported by the University of Liège (SFRD-11/05 to P.C. and SFRD-12/04 to D.B.), the Fonds National de la Recherche Scientifique (an Incentive Grant for Scientific Research MIS F.4520; FRFC 2.4597.11; FRFC 2.4567.11; CDR J.0138.13) and the FRS-FNRS/CONAcYt B330/123/11 (Belgium–Mexico). E.P. is supported by the Belgian FRIA FRS-FNRS. P.C. is a research associate of FRS-FNRS.

## References

- Acestor, N., Zikova, A., Dalley, R.A., Anupama, A., Panigrahi, A.K., Stuart, K.D., 2011. *Trypanosoma brucei* mitochondrial respiratome: composition and organization in procyclic form. *Mol. Cell. Proteomics* 10 (M110), 006908.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenerath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.
- Angerer, H., Zwicker, K., Wumaier, Z., Sokolova, L., Heide, H., Steger, M., Kaiser, S., Nubel, E., Brutschy, B., Radermacher, M., Brandt, U., Zickermann, V., 2011. A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. *Biochem. J.* 437, 279–288.
- Balabaskaran Nina, P., Dudkina, N.V., Kane, L.A., van Eyk, J.E., Boekema, E.J., Mather, M.W., Vaidya, A.B., 2010. Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Biol.* 8, e1000418.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bronstrup, U., Hachtel, W., 1989. Cytochrome *c* oxidase of *Euglena gracilis*: purification, characterization, and identification of mitochondrially synthesized subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 359–373.
- Brown, G.E., Preston, J.F., 1975. Changes in mitochondrial density and succinic dehydrogenase activity in *Euglena gracilis* as a function of the dependency on light for growth. *Arch. Microbiol.* 104, 233–236.
- Buetow, D.E., 1961. Ethanol stimulation of oxidative metabolism in *Euglena gracilis*. *Nature* 190, 1196–1196.
- Burger, G., Gray, M.W., Forget, L., Lang, B.F., 2013. Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout Jakobid protists. *Genome Biol. Evol.* 5, 418–438.
- Cardol, P., 2011. Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: a highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein databases. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 1390–1397.
- Cardol, P., Matagne, R.F., Remacle, C., 2002. Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.* 319, 1211–1221.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R.F., Remacle, C., 2004. Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 212–224.
- Cardol, P., Boutaffala, L., Memmi, S., Devreese, B., Matagne, R.F., Remacle, C., 2008. In *Chlamydomonas*, the loss of ND5 subunit prevents the assembly of whole mitochondrial complex I and leads to the formation of a low abundant 700 kDa subcomplex. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 388–396.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2006. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 32724–32727.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.
- Castro-Guerrero, N.A., Krab, K., Moreno-Sánchez, R., 2004. The alternative respiratory pathway of *Euglena* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 459–469.
- Castro-Guerrero, N.A., Jasso-Chavez, R., Moreno-Sánchez, R., 2005. Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1710, 113–121.
- Cavalier-Smith, T., 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14, 461–481.
- Chaudhuri, M., Ott, R.D., Hill, G.C., 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 22, 484–491.
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., Walker, J.E., 1994. Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* 33, 7971–7978.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., Stuart, R.A., 2000. The cytochrome *bc1* and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supercomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 18093–18098.
- Cui, J.Y., Mukai, K., Saeki, K., Matsubara, H., 1994. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding subunits I, II, and IX of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. *J. Biochem.* 115, 98–107.
- Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J.D., Kuhlbrandt, W., 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13602–13607.
- Duby, F., Matagne, R.F., 1999. Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking cob, nd4, and the 3' end of nd5. *Plant Cell* 11, 115–125.
- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., Braun, H.P., 2005. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3225–3229.
- Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P., Boekema, E.J., 2006. Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 3427–3432.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., Johnson, P.J., 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304, 253–257.
- Ebersberger, I., Strauss, S., von Haeseler, A., 2009. HaMSTR: profile hidden Markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evol. Biol.* 9, 157.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fang, J., Beattie, D.S., 2002. Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry* 41, 3065–3072.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Field, D., Tiwari, B., Booth, T., Houten, S., Swan, D., Bertrand, N., Thurston, M., 2006. Open software for biologists: from famine to feast. *Nat. Biotechnol.* 24, 801–803.
- Fischer, S., Brunk, B.P., Chen, F., Gao, X., Harb, O.S., Iodice, J.B., Shanmugam, D., Roos, D.S., Stoeckert Jr., C.J., 2011. Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 12, 11–19 (Chapter 6, Unit 6).
- Gabalton, T., Huynen, M.A., 2005. Lineage-specific gene loss following mitochondrial endosymbiosis and its potential for function prediction in eukaryotes. *Bioinformatics* 21 (Suppl. 2), ii144–ii150.
- Gabalton, T., Koonin, E.V., 2013. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nat. Rev. Genet.* 14, 360–366.
- Gawryluk, R.M., Gray, M.W., 2009. A split and rearranged nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase in Euglenozoa. *BMC Res. Notes* 2, 16.
- Gawryluk, R.M., Gray, M.W., 2010. Evidence for an early evolutionary emergence of gamma-type carbonic anhydrases as components of mitochondrial respiratory complex I. *BMC Evol. Biol.* 10, 176.
- Gawryluk, R.M., Chisholm, K.A., Pinto, D.M., Gray, M.W., 2012. Composition of the mitochondrial electron transport chain in *Acanthamoeba castellanii*: structural and evolutionary insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 2027–2037.
- Gibbs, S.P., 1981. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361, 193–208.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476–1481.
- Gray, M.W., Lang, B.F., Burger, G., 2004. Mitochondria of protists. *Annu. Rev. Genet.* 38, 477–524.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G., Roger, A.J., 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3859–3864.
- Harris, E.H., 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, San Diego.
- Heazlewood, J.L., Whelan, J., Millar, A.H., 2003. The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase. *FEBS Lett.* 540, 201–205.
- Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 868–877.
- Huynen, M.A., de Hollander, M., Szklarczyk, R., 2009. Mitochondrial proteome evolution and genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1122–1129.

- Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R., Merle, P., 1983. Separation of mammalian cytochrome *c* oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal. Biochem.* 129, 517–521.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimitz, M., Jansch, L., Braun, H.P., 2010. Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 797–810.
- Koski, L.B., Golding, G.B., 2001. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *J. Mol. Evol.* 52, 540–542.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M.W., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493–497.
- Lapaille, M., Escobar-Ramirez, A., Degand, H., Baurain, D., Rodriguez-Salinas, E., Coosemans, N., Boutry, M., Gonzalez-Halphen, D., Remacle, C., Cardol, P., 2010. Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F1F0-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1630–1644.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320.
- Li, L., Stoeckert Jr., C.J., Roos, D.S., 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189.
- Martin, W., Muller, M., 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392, 37–41.
- Mego, J.L., Farb, R.M., 1974. Alcohol dehydrogenases of *Euglena gracilis*, strain Z. *Biochim. Biophys. Acta* 350, 237–239.
- Michalecka, A.M., Svensson, A.S., Johansson, F.I., Agius, S.C., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S., Rasmussen, A.G., 2003. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* 133, 642–652.
- Millar, A.H., Eubel, H., Jansch, L., Kruff, V., Heazlewood, J.L., Braun, H.P., 2004. Mitochondrial cytochrome *c* oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Mol. Biol.* 56, 77–90.
- Monroy, A.F., Schwartzbach, S.D., 1984. Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2786–2790.
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Omura, S., Kita, K., 2009. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255–7263.
- Moreno-Sánchez, R., Raya, J.C., 1987. Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. *Plant Sci.* 48, 151–157.
- Moreno-Sánchez, R., Covian, R., Jasso-Chavez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Pacheco-Moises, F., Torres-Marquez, M.E., 2000. Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 200–210.
- Panigrahi, A.K., Zikova, A., Dalley, R.A., Acestor, N., Ogata, Y., Anupama, A., Myler, P.J., Stuart, K.D., 2008. Mitochondrial complexes in *Trypanosoma brucei*: a novel complex and a unique oxidoreductase complex. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 534–545.
- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., Racker, E., 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235, 3322–3329.
- Qiu, X.B., Shao, Y.M., Miao, S., Wang, L., 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2560–2570.
- Remacle, C., Baurain, D., Cardol, P., Matagne, R.F., 2001. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the nd1 coding sequence. *Genetics* 158, 1051–1060.
- Saccone, C., Lanave, C., De Grassi, A., 2006. Metazoan OXPHOS gene families: evolutionary forces at the level of mitochondrial and nuclear genomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1171–1178.
- Schagger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231.
- Sharpless, T.K., Butow, R.A., 1970a. An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245, 58–70.
- Sharpless, T.K., Butow, R.A., 1970b. Phosphorylation sites, cytochrome complement, and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245, 50–57.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Simpson, A.G.B., 1997. The identity and composition of the Euglenozoa. *Arch. Protistenkd.* 148, 10.
- Stajich, J.E., Block, D., Boulez, K., Brenner, S.E., Chervitz, S.A., Dagdigian, C., Fuellen, G., Gilbert, J.G., Korf, I., Lapp, H., Lehvaslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C.J., Osborne, B.J., Pocock, M.R., Schattner, P., Senger, M., Stein, L.D., Stupka, E., Wilkinson, M.D., Birney, E., 2002. The BioPerl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res.* 12, 1611–1618.
- Sunderhaus, S., Dudkina, N.V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E.J., Braun, H.P., 2006. Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *J. Biol. Chem.* 281, 6482–6488.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136–1144.
- Turmel, M., Gagnon, M.C., O'Kelly, C.J., Otis, C., Lemieux, C., 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26, 631–648.
- Van Aken, O., Giraud, E., Clifton, R., Whelan, J., 2009. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiol. Plant.* 137, 354–361.
- Vazquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., Gonzalez-Halphen, D., 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 271–282.
- Velours, J., Arselin, G., 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 383–390.
- Villavicencio-Queijeiro, A., Vazquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de Gomez, M., Mignaco, J.A., Freire, M.M., Scofano, H.M., Foguel, D., Cardol, P., Remacle, C., Gonzalez-Halphen, D., 2009. The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 1–13.
- Walker, J.E., Lutter, R., Dupuis, A., Runswick, M.J., 1991. Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 30, 5369–5378.
- Walker, G., Dorrell, R.G., Schlacht, A., Dacks, J.B., 2011. Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists. *Parasitology* 138, 1638–1663.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.
- Wilson, B.W., Danforth, W.F., 1958. The extent of acetate and ethanol oxidation by *Euglena gracilis*. *J. Gen. Microbiol.* 18, 535–542.
- Yang, Z., 1993. Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol. Biol. Evol.* 10, 1396–1401.
- Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829.
- Zhao, S., Burki, F., Brate, J., Keeling, P.J., Klaveness, D., Shalchian-Tabrizi, K., 2012. Collodictyon—an ancient lineage in the tree of eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1557–1568.
- Zikova, A., Panigrahi, A.K., Uboldi, A.D., Dalley, R.A., Handman, E., Stuart, K., 2008. Structural and functional association of *Trypanosoma brucei* MIX protein with cytochrome *c* oxidase complex. *Eukaryot. Cell* 7, 1994–2003.
- Zikova, A., Schnauffer, A., Dalley, R.A., Panigrahi, A.K., Stuart, K.D., 2009. The F(0)F(1)-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 5, e1000436.



## Subunit–subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp.

Araceli Cano-Estrada<sup>a</sup>, Miriam Vázquez-Acevedo<sup>a</sup>, Alexa Villavicencio-Queijeiro<sup>a</sup>, Francisco Figueroa-Martínez<sup>a</sup>, Héctor Miranda-Astudillo<sup>a</sup>, Yraima Cordeiro<sup>b</sup>, Julio A. Mignaco<sup>c</sup>, Debora Foguel<sup>c</sup>, Pierre Cardol<sup>d</sup>, Marie Lapaille<sup>d</sup>, Claire Remacle<sup>d</sup>, Stephan Wilkens<sup>e</sup>, Diego González-Halphen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Genetics of Microorganisms, Institute of Plant Biology, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>e</sup> Department of Biochemistry & Molecular Biology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY 13210, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 October 2009

Received in revised form 15 February 2010

Accepted 22 February 2010

Available online 25 February 2010

#### Keywords:

Oxidative phosphorylation

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase

Dimeric mitochondrial complex V

Chlorophycean algae

Stator stalk

*Chlamydomonas reinhardtii*

*Polytomella* sp.

ASA subunits

### ABSTRACT

Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase of chlorophycean algae is a dimeric complex of 1600 kDa constituted by 17 different subunits with varying stoichiometries, 8 of them conserved in all eukaryotes and 9 that seem to be unique to the algal lineage (subunits ASA1–9). Two different models proposing the topological assemblage of the nine ASA subunits in the ATP synthase of the colorless alga *Polytomella* sp. have been put forward. Here, we readdressed the overall topology of the enzyme with different experimental approaches: detection of close vicinities between subunits based on cross-linking experiments and dissociation of the enzyme into subcomplexes, inference of subunit stoichiometry based on cysteine residue labelling, and general three-dimensional structural features of the complex as obtained from small-angle X-ray scattering and electron microscopy image reconstruction. Based on the available data, we refine the topological arrangement of the subunits that constitute the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase (complex V) makes ATP using the electrochemical proton gradient generated by the respiratory chain. The synthase is an oligomeric complex embedded in the inner mitochondrial membrane that works like a rotary motor [1–3]. Chlorophycean algae like *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp., a particular lineage of green algae (the Chlorophytes), have a highly stable dimeric mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, with an estimated molecular mass of 1600 kDa [4–9]. The chlorophycean enzyme contains the eight conserved subunits present in the vast majority of eukaryotes, which represent the main components of the proton-driven rotary motor and the catalytic sector of the enzyme: subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $a$  (ATP6),  $c$  (ATP9), and OSCP. Nevertheless, and in sharp contrast with other mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases, like

the one from beef heart, the algal enzyme seems to lack several classic components [10]: the subunits of the peripheral stalk  $b$ ,  $d$ ,  $f$ , A6L, and F6 [11,12], the subunits responsible for dimer formation  $e$  and  $g$  [13,14], and the regulatory polypeptides IF<sub>1</sub> [15] and factor  $b$  [16]. Instead, the algal enzyme contains nine subunits with molecular masses ranging from 8 to 60 kDa named ASA1 to ASA9 (for ATP synthase associated proteins) [4,7,10]. The ASA subunits build up a highly robust peripheral stalk with a unique architecture, as observed on single-particle electron microscopy (EM) images [6,17].

Two contrasting models suggesting a topological arrangement for subunits ASA1 to ASA9 of the *Polytomella* ATP synthase have been put forward [7,8]. We found of interest to gain further insights on the close-neighbor relationships between the ASA subunits and their interactions with some of the classical subunits. In this work, we reassessed the topological disposition of the components of the algal mitochondrial ATP synthase using different experimental approaches: detection of subunit–subunit interactions based on cross-linking experiments, generation of subcomplexes after partial dissociation of the dimeric ATP synthase, inference of subunit stoichiometry based on labelling of cysteine residues, and modelling the overall structural

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

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

features of the complex from small-angle X-ray scattering (SAXS) data and EM image reconstruction. Based on the results obtained from these diverse experimental strategies, we suggest a refined model for the disposition of the 17 different polypeptides with varying stoichiometries that constitute the algal mitochondrial ATP synthase.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algal strains and growth conditions

*Polytomella* sp. (198.80, E.G. Pringsheim) obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (SAG) was grown as previously described [5].

### 2.2. Cloning and sequencing of cDNAs encoding subunits of the ATP synthase of *Polytomella* sp.

The DNA sequences encoding regions for the subunits ASA2 (partial), ASA3 (partial), ASA4, ASA6, ASA7, ASA8,  $\delta$  and OSCP from *Polytomella* sp. were each amplified from a  $\lambda$ -ZAPII cDNA library [18] by PCR with the appropriate oligonucleotide primers. Primers were synthesized with restriction sites to allow efficient subsequent cloning (not shown). The designed forward primers were as follows: ASA2f, 5'-GAC GCT GCC GT (C/G/T) GC(C/G/T) CT(C/T) AC(C/T) TAC-3'; ASA3f, 5'-ATG-CGT-CAG-GCT-AGT-CGC-3'; ASA4f, 5'-GCT ACC GAG CCT GCT GTT TC-3'; ASA6f, 5'-GCT TGA TCT TTC ATA AAG ATG-3'; ASA7f, 5'-CTT ACC ACT TTT ACC TTC-3'; ASA8f, 5'-ATG GTC CTC GGT GAG GTC TAC-3'; DELTAf, 5'-GAC ACT ATG TTT GGA CTC AAA-3'; and OSCPf, 5'-GCT GCC CAG GCT GAG CTC AAG-3'. The reverse primers used were as follows: ASA2r, 5'-TCA (G/A/C)AC (G/A)GC GTA (G/A)CC CTG (G/A/C)GC CTC-3'; ASA3r, 5'-GTG-AAG-TTG-GCG-GAG-ACG-TTG-3'; ASA4r, 5'-TTA AGC AGC GAC CTT AGG GC-3'; ASA6r, 5'-ATA TTG GTC AAT CAT TTA AAG-3'; ASA7r, 5'-CTA TGC TTG GAG AGG AGG AAG-3'; ASA8r, 5'-TAG TGA CCA CCA GCA GTG TAA G-3'; DELTAr, 5'-TTT ATC TAA TTA CGC TTA AGC-3'; and OSCPr, 5'-AAC GAA CTA ATT TAA ATA GAA AGA-3'. The amplified PCR products were fractionated on 1% agarose gel and purified by QIAquick gel extraction kit (Qiagen), cloned with the pGEM-T easy vector system (Promega), and sequenced using T7 and SP6 primers. The obtained sequences have been deposited in GenBank with the accession numbers shown in Table 1.

### 2.3. *Polytomella* ATP synthase purification

*Polytomella* sp. mitochondria were solubilized in the presence of *n*-dodecyl- $\beta$ -maltoside (lauryl maltoside or LM) and the ATP synthase was purified following the described procedure [7]. For EM studies, the buffer in the glycerol gradient centrifugation step was modified. The enzyme obtained from the DEAE-Biogel A column was loaded on discontinuous 15–50% glycerol gradients in 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 mM ATP and 0.2% digitonin, and centrifuged at 54,000  $\times$ g for 17 h at 4 °C. Fractions containing dimeric ATP synthase were identified by BN-PAGE and prepared for EM analysis as described below.

### 2.4. Protein analysis

After treating with detergents, the algal ATP synthase was subjected to BN-PAGE as described by Schägger [19]. When indicated, BN-PAGE was followed by 2D tricine-SDS-PAGE [20]. Protein concentrations were estimated according to Markwell et al. [21]. Denaturing gel electrophoresis was carried either in a glycine-SDS-PAGE system [22] or in a tricine-SDS-PAGE system [20], as indicated.

Cross-linking experiments were carried out with the water-insoluble, hetero-bifunctional, thiol-cleavable reagent *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP; Pierce) and its water-soluble analog sulfo-succinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (sulfo-LC-SPDP; Pierce). The enzyme (3.5 mg protein/mL) was

incubated in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM sodium EDTA, 10 mM succinate, 35 mM NaCl, 2 mM ATP and 0.1 mg/mL LM, in the presence of 1 mM SPDP or 2 mM sulfo-LC-SPDP, for 7 hours at 4 °C. Reactions were stopped by the addition of 25 mM Tris (pH 8.0) (final concentration). The corresponding samples (120  $\mu$ g of protein) were subjected to SDS-tricine-PAGE [7% (wt./vol.) acrylamide] in nonreducing conditions. The lanes of interest were cut and incubated for 1 hour in the presence of 50 mM 1,4-dithiothreitol, 0.1% SDS, 0.1 M Tris, 0.1 M tricine (pH 8.25), and loaded onto 2D tricine-SDS-PAGE [12% (wt./vol.) acrylamide]. Cross-linking experiments with the water-soluble, homo-bifunctional, thiol-cleavable reagent 3,3'-dithio-bis-(sulfo-succinimidyl-propionate) (DTSSP) and with the water-insoluble, homo-bifunctional, thiol-cleavable reagent dithio-bis-(succinimidyl)-propionate (DSP) were carried out as previously described [7,9].

### 2.5. Labeling of cysteine residues with fluorescent probes

The cysteine residues of *Polytomella* sp.  $F_1F_0$ -ATP synthase were reacted with the fluorescent probes fluorescein-5-maleimide and 5-iodoacetamido-fluorescein (Pierce) under denaturing conditions. Two hundred micrograms of the enzyme was denatured with 1% SDS and 15 mM dithiothreitol (final concentrations) for 30 min. The denatured enzyme was incubated with 5-iodoacetamido fluorescein in a 10-fold molar excess over total estimated thiol groups (1.4 mM final concentration). The reaction was carried out at room temperature for 2 hours. In the case of the fluorescein-5-maleimide labeling, the dithiothreitol was removed dialyzing two times (using a 3500-Da molecular mass cutoff membrane) against 100 mL of a buffer containing 20 mM Tris (pH 7.4), 8 mM sodium EDTA, and 1% SDS at room temperature. Fluorescein-5-maleimide was added in 10-fold molar excess over the total estimated thiol groups (1.4 mM final concentration). The reaction was carried out for 2 hours at room temperature. The excess of reactive reagent was removed by centrifugation through the column of a syringe containing Sephadex G50-fine equilibrated with 20 mM Tris (pH 7.4), 8 mM sodium EDTA, and 1% SDS. The labeled samples were loaded onto tricine-SDS-PAGE at increasing protein concentrations. The fluorescent bands were scanned at 532 nm in a variable mode imager Typhoon 9400 (GE Healthcare), and the fluorescence intensities were quantified using a MacBiophotonics ImageJ program.

### 2.6. Dissociation of the enzyme into subcomplexes

The purified algal ATP synthase (120  $\mu$ g of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of additional 0.5% lauryl maltoside and then heated at 60 °C for 26 seconds. The sample was subjected to BN-PAGE in gradient gels of 4–12% acrylamide. The lanes of interest were excised and incubated in the presence of 1% SDS and 1%  $\beta$ -mercaptoethanol for 15 min and then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE in 14% acrylamide gels.

### 2.7. SAXS analysis

To obtain overall structural information of the algal  $F_1F_0$ -ATP synthase, small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis was carried out at the D11A-SAXS beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) [23]. Purified and solubilized  $F_1F_0$  (3.0 mg/mL) was analyzed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing 0.1 mg/mL LM. As a control, a 12 mg/mL sample of human lysozyme was also measured, yielding the biophysical parameters and low-resolution models in accordance with its known molecular structure. Data were collected using a two-dimensional position-sensitive MARCCD detector, with wavelength = 1.488 Å, at 25 °C. Data acquisition was performed by taking three successive 300-second frames of each sample. The modulus of the scattering vector  $q$  was calculated according to  $q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$ ,

**Table 1**Sequences of the polypeptides associated with *Polytomella* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase and percent identity with its *C. reinhardtii* counterparts.

Subunit name	Organism	GenBank accession number	Counterpart in <i>Chlamydomonas</i> (GenBank accession number)	% identity	Reference
ASA1	<i>Polytomella</i> sp.	CAD90158	XP_001692395 EDP03873	54	[8]
β (ATP2)	<i>Polytomella</i> sp.	CAI34837	XP_001691632 EDP04740	86	[8]
α (ATP1)	<i>Polytomella</i> sp.	CAI34836	XP_001699641 EDP07337	82	[8]
ASA2	<i>Polytomella</i> sp.	GU014474 (partial)	XP_001696742 EDP00850	46 <sup>a</sup>	This work
ASA3	<i>Polytomella</i> sp.	GU121441 (partial)	XP_001700079 EDO98373	51 <sup>a</sup>	This work
ASA4	<i>Polytomella</i> sp.	GQ168485	XP_001693576 EDP08830	50	This work
γ (ATP3)	<i>Polytomella</i> sp.	CAF03602	XP_001700627 EDO97956	71	[8]
a (ATP6)	<i>P. parva</i>	EC749403 (partial)	XP_001689492 EDP09230	46 <sup>a</sup>	[36]
OSCP (ATP5)	<i>Polytomella</i> sp.	GQ422707	XP_001695985 EDP01322	62	This work
ASA7	<i>Polytomella</i> sp.	GQ427067	XP_001696750 EDP00858	47	This work
δ (ATP16)	<i>Polytomella</i> sp.	GU075869 <sup>b</sup>	XP_001698736 EDO99236	67	This work
ASA5	<i>P. parva</i>	BK006876 (partial)	XP_001697115 EDP00370	61 <sup>a</sup>	This work
ASA6	<i>Polytomella</i> sp.	GU112182 <sup>c</sup>	XP_001701878 EDP06853	54	This work
ASA8	<i>Polytomella</i> sp.	GQ443453	XP_001695222 EDP01930	79	This work
ASA9	<i>P. parva</i>	BK006898	XM_001694550 EDP02597	61	This work
ε (ATP15)	<i>P. parva</i>	EC748275 EC748655	XP_001702609 EDP06388	59 <sup>a</sup>	[36]
c (ATP9)	<i>Polytomella</i> sp.	EC749219 (partial) <sup>d</sup> GU075868 <sup>e</sup>	XP_001701531 EDO97408 XP_001701500 EDO97377	62	This work

<sup>a</sup> Identity was estimated comparing the partial sequence of *Polytomella* with the corresponding region of its *Chlamydomonas* counterpart.<sup>b</sup> An identical sequence could be constructed for *P. parva* from EST data (GenBank accession number BK006875).<sup>c</sup> An identical sequence could be constructed for *P. parva* from EST data (GenBank accession number BK006877).<sup>d</sup> The partial sequence of ε subunit may be constructed from the indicated EST data.<sup>e</sup> An identical sequence could be constructed for *P. parva* from EST data (GenBank accession numbers EC750491, EC750268, EC750247, and EC750141).

where  $\lambda$  is the wavelength used and  $2\theta$  is the scattering angle. The sample-to-detector distance was set at 1602.6 mm, allowing detection of a  $q$  range from 0.009 to  $0.1979 \text{ \AA}^{-1}$ . Monodispersity of the samples was confirmed by Guinier plots of the data, which were linear at small angles [24], and molecular weight calculations by using hen egg lysozyme as standard (not shown) and with the calculation tool, SAXS MoW [25]. Data were corrected properly and fitted using GNOM [26], yielding the pair distance distribution function  $[p(r)]$ , the radius of gyration ( $R_g$ ), and maximum distance ( $D_{\text{max}}$ ) of the enzyme. Particle low-resolution models were restored using DAMMIN, which allows *ab initio* shape determination by simulated annealing using a single-phase dummy atom model [27]. Several runs of *ab initio* shape determination led to consistent results and the obtained final particle shape is an average of 10 independent models, performed with DAMAVER [28].

## 2.8. Electron microscopy studies

The algal dimeric ATP synthase obtained from the digitonin containing glycerol gradient was diluted to a final protein concentration between 20 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 1 mM EDTA, and 0.02% digitonin. Samples of 5  $\mu\text{L}$  were applied to glow-discharged carbon-coated copper grids for negative staining. Grids were washed once with water and stained with 1% uranyl acetate for 1 min and dried. Grids were examined in a JEOL JEM2100 transmission electron microscope (JEOL USA) operating at 200 kV. Images were

recorded on a  $4096 \times 4096$  slow-scan charge-coupled device (F415-MP; TVIPS GmbH) in single-frame montage mode. Images of the stained samples were recorded with an underfocus of 1.5  $\mu\text{m}$  and an electron magnification of  $\times 40,000$ , setting the 1st zero of the contrast transfer function at  $1/20 \text{ \AA}^{-1}$ . Single particles were selected with the Boxer program (EMAN package) [29] and subsequently analyzed with the IMAGIC-5 package [30] as previously described [31]. Images were band-pass-filtered to eliminate unwanted spatial frequencies ( $<0.008 \text{ \AA}^{-1}$  and  $>0.133 \text{ \AA}^{-1}$ ) and normalized. Data sets were classified, and initial references for multireference alignment were generated by alignment by classification [32]. Multireference alignment was iterated until no further improvement was observed.

## 2.9. Three-dimensional reconstruction

For starting up the three-dimensional reconstruction from EM images, two molecules of yeast F<sub>1</sub>C<sub>10</sub> crystal structure (1qo1.pdb) [33] were arranged as a dimer so that projections of the model matched the projections of the enzyme obtained from the multi reference alignment analysis. Model building was done in Chimera [34]. In the structural model, mitochondrial F<sub>1</sub> was replaced by threefold symmetric  $\alpha_3\beta_3$  from *Bacillus* PS3 (1sky.pdb) [35]. Projections of the model then served as references to align a data set of 9300 images. Subsequent refinement was performed by alignment of the raw images with an increasing number of projections of the 3D reconstruction from the preceding

round of multireference alignment. Three-dimensional reconstruction was performed assuming two-fold symmetry of the ATP synthase dimer complex. After seven rounds of refinement the resulting 3D model of the *Polytomella* ATP synthase was filtered to a resolution of 20 Å and displayed in Chimera. Details of the image analysis and three-dimensional reconstruction will be published elsewhere.

### 2.10. Sequence analysis in silico

Expressed sequence tags from *Polytomella parva* (TBestDB) [36] were obtained from ENTREZ at the NCBI server ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and used to reconstruct the sequences of subunits  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $a$ ,  $c$ , ASA5, ASA6, and ASA9 of the alga. Prediction of transmembrane helices and of 3D structure was carried out with the homologous *C. reinhardtii* sequences. Transmembrane stretches were predicted by the TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Full-chain protein structure prediction was carried out in the Robetta server (<http://rosetta.bakerlab.org/>).

## 3. Results

### 3.1. Resolution of all protein components of the mitochondrial ATP synthase from the colorless chlorophycean alga *Polytomella* sp.

A highly homogeneous preparation of *Polytomella* sp. mitochondrial ATP synthase containing 17 different polypeptides with varying stoichiometries was obtained through the previously detailed three-step purification procedure that involves mitochondria solubilization, ion exchange chromatography, and glycerol gradient centrifugation [7]. Previous reports suggested the presence of a proteolyzed ASA3 subunit in the isolated enzyme [7]. Some preparations of the enzyme, kept always at 4 °C and isolated in the presence of protease inhibitors, exhibited an ASA3 subunit with the N-terminus sequence SAPG-SHEHHETPLKMA, indicative of an intact polypeptide.

The subunit composition of the *Polytomella* mitochondrial ATP synthase has been previously reported. To search for possible new subunits that may have escaped detection due to the comigration of two or more bands, a combined gel electrophoresis system was utilized. The electrophoretic conditions involved first dimension in a glycine-SDS-PAGE system [22] followed by 2D tricine-SDS-PAGE system [19]. The

2D gels thus obtained are shown in Fig. 1. This technique allowed almost complete resolution of all polypeptide components. Notably, subunit  $a$  and subunit OSCP, which migrate together when using only a tricine-SDS-PAGE system, were completely resolved in this combined 2D system.

### 3.2. Cloning and sequencing of cDNAs encoding subunits of the ATP synthase of *Polytomella* sp.

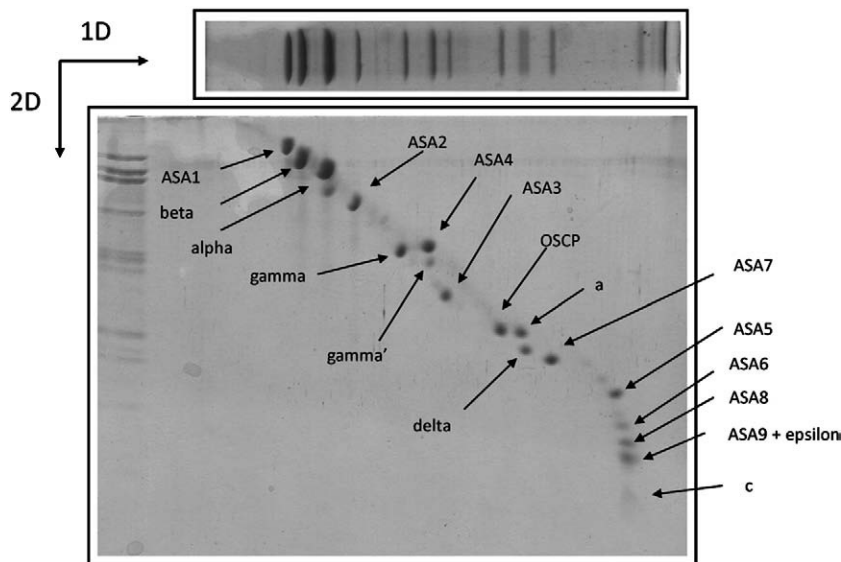
Here, we report eight (complete) and three (partial) primary sequences of the subunits that constitute the ATP synthases of *Polytomella* sp. and *P. parva* (Table 1). The corresponding genes were cloned and sequenced from a *Polytomella* sp. cDNA library, while other sequences were reconstructed from EST data of *P. parva*. Both the *C. reinhardtii* and the *Polytomella* enzymes have the same polypeptide composition, and the corresponding subunits exhibit sequence identities that range from 46% to 86%.

### 3.3. Close-neighbour relationships of the subunits of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp.

To assess close vicinities between polypeptide components, we carried out cross-linking experiments with several bifunctional reagents. Examples of cross-linking patterns obtained with the purified algal ATP synthase have been shown before [7,9]. Novel cross-link products were obtained using additional bifunctional reagents (data not shown but included in Fig. S1 only for review purposes). Table 2 summarizes the different cross-link products that have been unambiguously and reproducibly identified in several experiments. The inferred close vicinities between polypeptides were used to reassess the overall topology of the algal ATP synthase (see below).

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

A second approach to assess subunit-subunit interactions is partial dissociation of the complex to generate subcomplexes, which are assumed to keep the original subunit-subunit interactions they had in the intact complex. A carefully controlled dissociation procedure was



**Fig. 1.** 2D resolution of the polypeptides that constitute the mitochondrial *Polytomella*  $F_1F_0$ -ATP synthase. *Polytomella* ATP synthase (100  $\mu$ g of protein) were resolved in a glycine-SDS-PAGE system (10% acrylamide). The 1D gel was then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained with Coomassie brilliant blue. The identified subunits are indicated by the corresponding arrows and labels.

**Table 2**

Close vicinities between subunits of the algal ATP synthase inferred from cross-linking experiments.

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

carried out with the enzyme as described in Section 2. At short times of incubation at high temperature in the presence of LM, the ATP synthase complex partially dissociates. Both the dimeric and monomeric forms of the enzyme can also be observed in the 2D electrophoretic pattern (Fig. 2). The monomeric form (V) shows a diminished presence of subunits ASA6 and ASA9 as suggested previously [8]. ASA6 and ASA9 may be implicated in the dimerization of the enzyme. Also, a 62-kDa subcomplex formed by ASA2–OSCP was observed. Thus, a novel subunit–subunit interaction, not previously detected by the cross-linking experiments, was identified (Fig. 2).

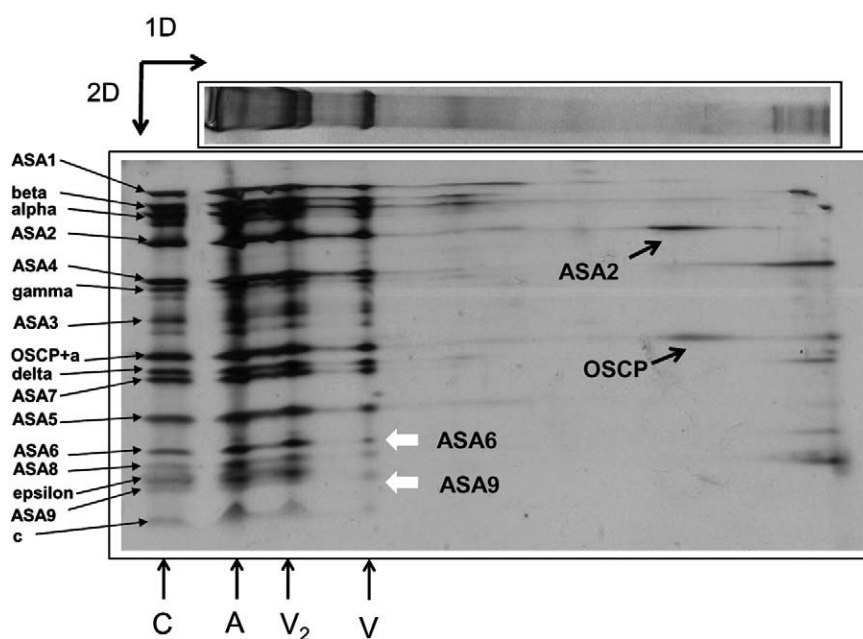
### 3.5. Estimation of the stoichiometry of several subunits of the algal ATP synthase as judged by reactivity with cysteine-labelling reagents

The stoichiometry of the conserved subunits that constitute the algal ATP synthase is believed to be similar to the one of orthodox enzymes. Thus a  $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\delta_1/\epsilon_1/a_1/\text{OSCP}_1$  stoichiometry is expected

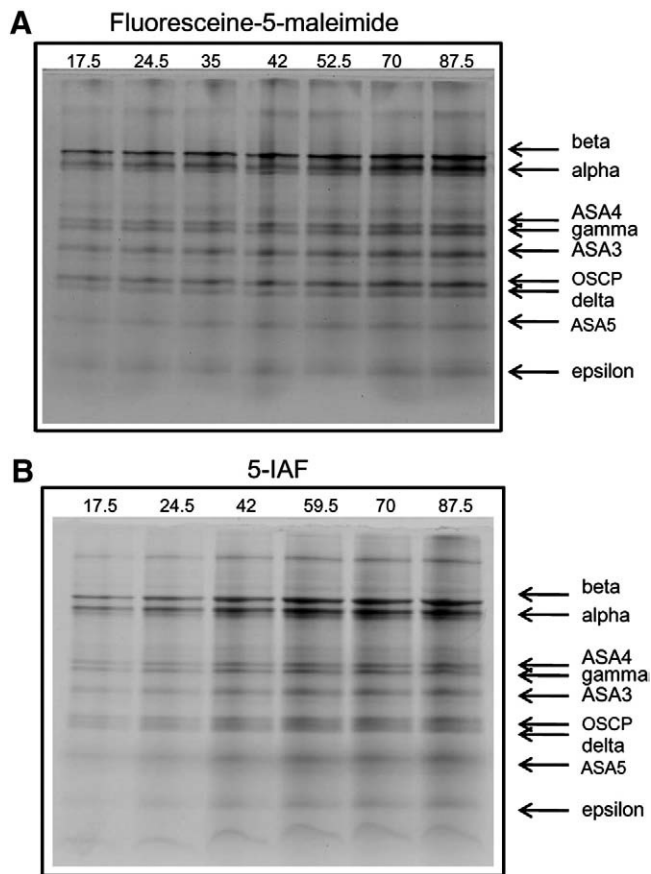
for the motor and catalytic regions of the monomeric enzyme. In contrast, the stoichiometry of the ASA subunits that constitute the peripheral stalk is not known. Here, we explored the stoichiometry of subunits with cysteine-labelling fluorescent probes. The estimated stoichiometry is limited to those subunits that contain at least one cysteine residue. The labelling experiments suggest an  $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\delta_1/\text{OSCP}_1/\text{ASA3}_1/\text{ASA4}_1/\text{ASA5}_1$  stoichiometry per monomeric  $F_1F_0$ -ATP synthase (Fig. 3 and Table 3).

### 3.6. Estimation of the overall dimensions of the ATP synthase of *Polytomella* sp. as judged by SAXS

Small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis allowed us to obtain the initial parameters for the construction of a low-resolution model of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella*. This technique provides direct information on the size, shape and oligomeric structure of biomolecules in solution. The adjusted scattering profile with the program GNOM [26] is shown in Fig. 4A, together with the experimental data. From the Fourier transformation of the scattering data  $[I(q)]$ , we have calculated the pair distance distribution function  $p(r)$  (Fig. 4B), which gives us direct information about the shape and size of the algal  $F_1F_0$ -ATP synthase. The calculated  $p(r)$  shows a maximum intramolecular distance ( $D_{\text{max}}$ ) of 400 Å and the obtained radius of gyration ( $R_g$ ) is  $141.5 \pm 0.243$  Å (Fig. 4B). The calculated  $p(r)$  is characteristic of an elongated structure (Fig. 4B); however, the obtained Kratky plot indicates that the protein maintains a globular fold, with a maximum  $\sim q = 0.013 \text{ \AA}^{-1}$  (Fig. 4C), as Kratky plots of unfolded proteins present no intensity maximum [37,38]. The presence of a loosely associated dimer would account for such event, yielding an elongated structure but with defined globular regions. The estimated molecular mass of the complex is of 1696 kDa. Guinier analysis of the data was performed (Fig. 4D), and linear least squares fittings were done at the small scattering vector region ( $q < 1.3 \times R_g^{-1}$ ), where  $R_g$  is the radius of gyration. The Guinier plot analysis gave an  $R_g$  value of 133.4 Å (slope of the fitting =  $3 \times R_g^{-2}$ ),



**Fig. 2.** Subcomplexes of the algal ATP synthase generated by detergent treatment and controlled heat dissociation. The purified algal ATP synthase (120  $\mu\text{g}$  of protein) was incubated for 30 min on ice in the presence of additional 0.5% LM and then heated at 60 °C for 26 sec. The mixture was then resolved by BN-PAGE in a 1D gradient gel of 4–12% acrylamide. The 1D gel was then subjected to 2D tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) and stained with silver. Fifty micrograms of purified algal ATP synthase was added as a control (lane C); the different polypeptides of the complex are indicated. Some aggregated material (A) was present at the start of the 1D gel. The polypeptides corresponding to the dimeric enzyme (V2) and to the monomeric enzyme (V) are indicated; the monomer exhibits diminished ASA6 and ASA9 subunits (white arrows). The resolved subunits ASA2 and OSCP resulting from the ASA2–OSCP subcomplex are indicated.



**Fig. 3.** Labelling of cysteine residues of the algal ATP synthase with fluorescent probes. In both panels, the labeled ATP synthase was resolved by tricine-SDS-PAGE and the images were obtained after scanning the electrophoretic pattern of the fluorescently-labeled enzymes. The amounts of labeled protein loaded on the original gel (in  $\mu\text{g}$  of protein) are indicated. The labeled subunits are indicated by arrows. Quantification of the fluorescence emitted by each polypeptide was used to calculate subunit stoichiometries (see Table 3). A) Labelling of the algal ATP synthase with fluorescein-5-maleimide. B) Labelling of the algal ATP synthase with 5-iodoacetamido-fluorescein.

which is similar to the value obtained with the GNOM program [26]; moreover, we could observe that the sample was monodisperse at the measured conditions.

To obtain further information about the three-dimensional fold of the enzyme, low-resolution *ab initio* models using the DAMMIN program were reconstructed [27,39]. A group of 10 models was generated and averaged with the program DAMAVER [28]. The obtained volumetric model represents the shape of the molecule, indicating that the *Polytomella* ATP synthase is organized as a dimer in solution (Fig. 5), in accordance with previous reports suggesting the dimeric nature of the enzyme [4,6,7].

**Table 3**

Subunit stoichiometry of subunits of the algal ATP synthase inferred from cysteine (Cys) labeling with fluorescent probes.

Subunit name and (number of Cys)	5-IAF			Fluorescein-5-maleimide		
	Fluorescence (AU)	Estimated Cys content	Subunit stoichiometry	Fluorescence (AU)	Estimated Cys content	Subunit stoichiometry
alpha (4)	0.147	10.75	2.68	0.147	10.62	2.65
beta (2)	0.082	6.00	3.00	0.083	6.00	3.00
ASA4 (2)	0.032	2.30	1.15	0.033	2.38	1.19
gamma (2)	0.032	2.30	1.15	0.030	2.16	1.08
ASA3 (3)	0.04	2.90	0.96	0.048	3.46	1.15
OSCP (1)	0.047	3.40	1.13	0.044	3.10	1.03
delta (1)	0.019	1.39	1.39	0.018	1.30	1.30
ASA5 (1)	0.014	1.02	1.02	0.012	0.86	0.86

### 3.7. EM analysis leading towards a low-resolution 3D model of the ATP synthase of *Polytomella* sp.

The algal ATP synthase obtained from a glycerol gradient in the presence of 0.02% digitonin proved to be suitable for EM studies. Representative averages of the enzyme, side and top views, are shown in Figs. 6A and B. Reconstruction of 59 averages obtained from a data set of 9300 molecular images gave rise to the EM-derived 3D model of the *Polytomella* ATP synthase (Figs. 6C, side view, and D, top view). The first round of multireference alignment was based on a 3D structural model of dimeric ATP synthase generated from two molecules of the yeast mitochondrial  $F_1F_0$  complex. Subsequent refinements were performed independently of the crystallographic model structure. The association of the two ATP synthase monomers occurs at the level of the  $F_0$  sector, while the  $F_1$  domains are quite distant. An angle of  $50^\circ$  is formed between the long axes of the two putative monomers. The two  $F_1$  sectors are connected by two robust, peripheral arms that seem to rise from the membrane-embedded section of one monomer towards the upper part ( $\alpha$  and  $\beta$  subunits) of the  $F_1$  sector of the second monomer. These peripheral stalks are clearly distinguishable from the central stalk (subunits  $\gamma$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$ ) that connects the  $F_1$  and  $F_0$  sectors of the ATP synthase complex. Figs. 6E and F show fitting of one pair of the crystal structure of the yeast  $F_1F_0$  used for the initial alignment into the electron density of the final three-dimensional reconstruction of *Polytomella* dimeric ATP synthase.

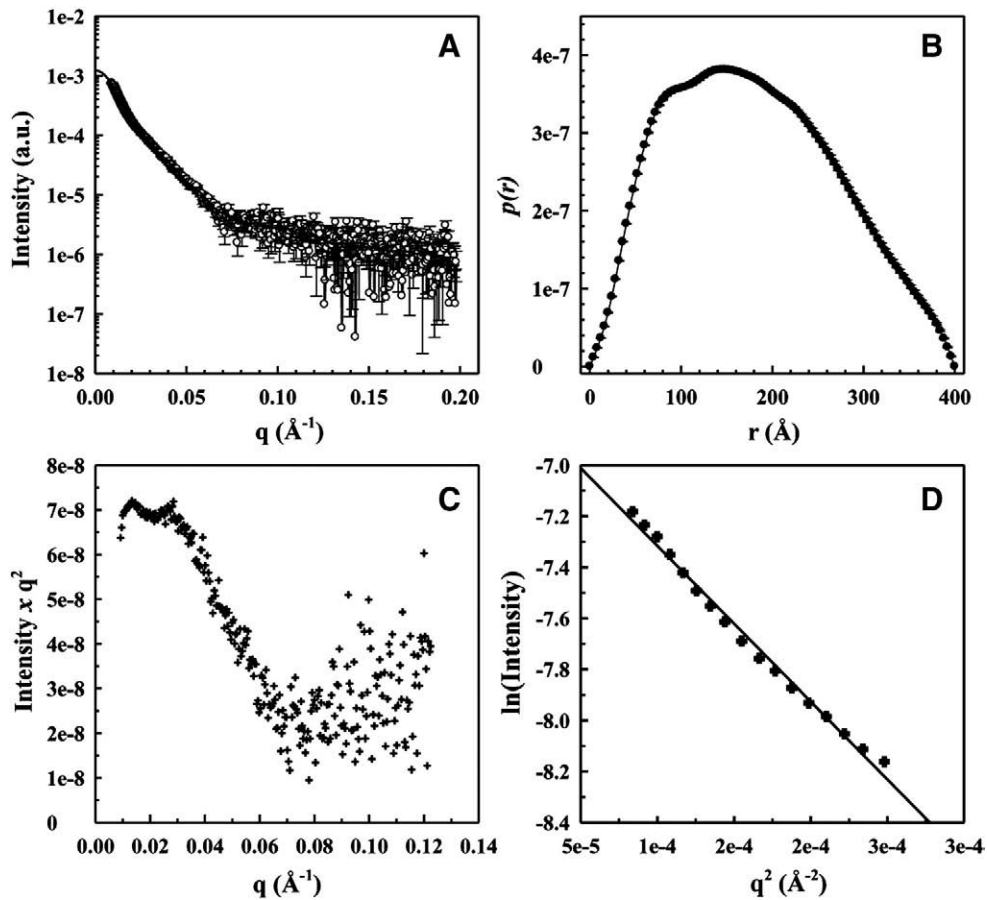
## 4. Discussion

### 4.1. Composition of *Polytomella* sp. ATP synthase

The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae has an atypical subunit composition and a unique overall architecture [6,7]. The presence of atypical subunits was originally proposed based on N-terminal sequences of the polypeptide components of *C. reinhardtii* mitochondrial ATP synthase [40] and mining of the green alga genome [10]. Thus, nine novel subunits, ASA1 to ASA9, were identified and demonstrated to be subunits of the algal mitochondrial ATP synthase [7,8]. The subsequent biochemical characterization of the enzyme was carried out using the chlorophycean alga *Polytomella* sp. This colorless alga, closely related to *Chlamydomonas*, lacks both chloroplasts and cell wall, therefore allowing easy isolation of mitochondria and the subsequent purification of oxidative phosphorylation components [41–43]. To date, genes encoding homologs of these proteins have also been found in the genome of the alga *Volvox carteri* (Doe Joint Genome Institute). The presence of ASA subunits in the mitochondrial ATP synthase seems to be exclusive of the algal lineage of chlorophycean alga closely related to *Chlamydomonas* [44].

Previous work has shown partial resolution of the polypeptides of *Polytomella* ATP synthase by SDS-PAGE [7]. Nevertheless, some subunits migrate together, namely subunits  $\alpha$  and OSCP, and subunits

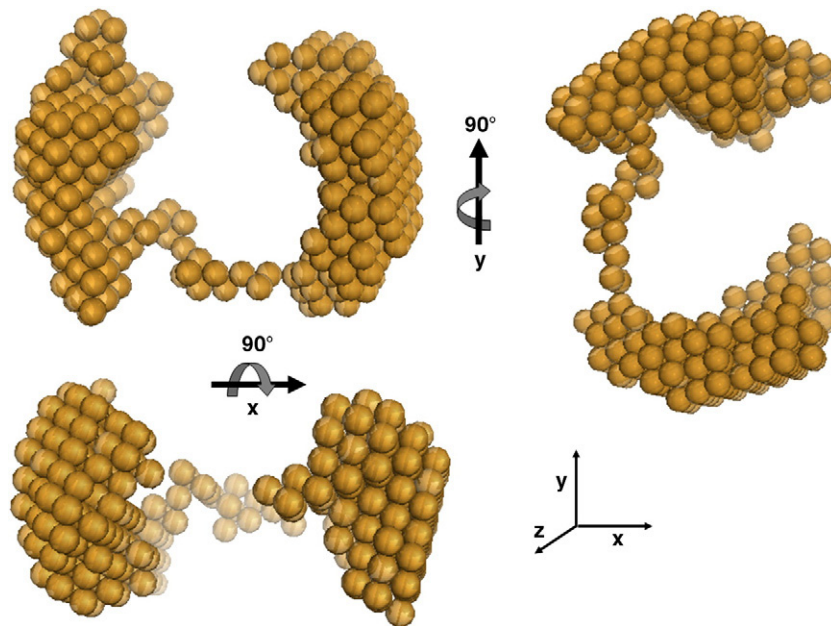




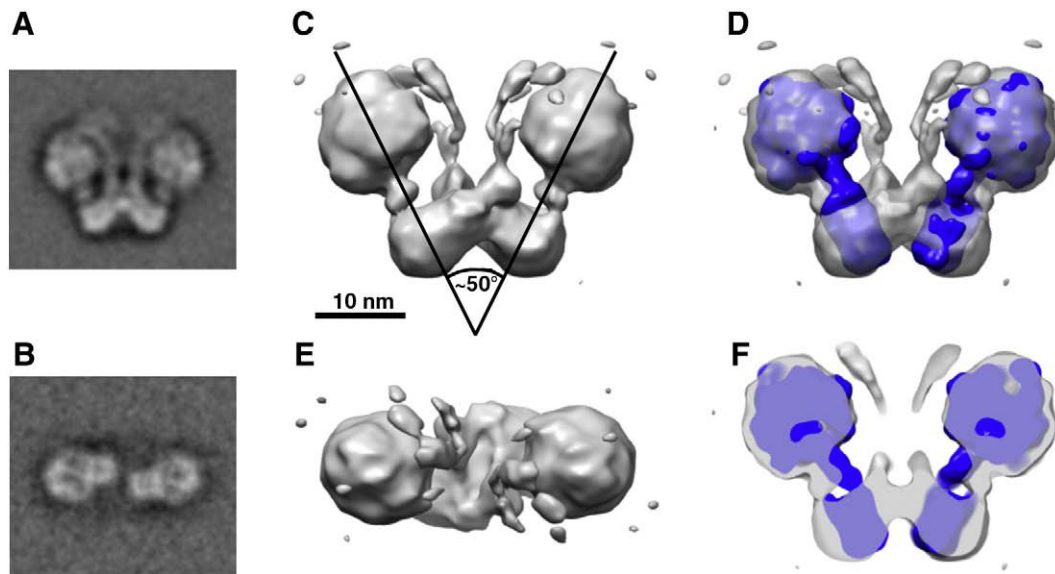
**Fig. 4.** SAXS data of *Polytomella* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. A) Experimental results of intensity as a function of the modulus of scattering vector  $q$  [ $I(q)$ ] with their corresponding errors are shown (white dots); experimental data were fitted using the GNOM program (fit, solid line). B) Pair distance distribution  $p(r)$  of the enzyme calculated using the program GNOM. C) Kratky plot for the scattering of ATP synthase. D) Linear fit for the Guinier plot.

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

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



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



**Fig. 6.** Representative EM images and preliminary 3D structural of the *Polytomella* ATP synthase. A and B) Particle images of the algal ATP synthase obtained after averaging 100 to 150 single-molecule images (A, side view; B, top view). C and D) 3D structural model of the algal mitochondrial ATP synthase derived from EM studies (C, side view; D, top view). E and F) Fitting of the crystal structure model of the yeast  $F_1C_{10}$  subcomplex into the EM-derived electron density of *Polytomella* ATP synthase.

also suggests that no additional polypeptide seems to have escaped detection and that the entire subunit composition of the enzyme is most probably the one listed in Table 1.

#### 4.2. Revisiting the topological disposition of the subunits

Cross-linking reagents have been used to assess close vicinity of polypeptides assembled into a supramolecular complex. Previous work carried out with the *Polytomella* ATP synthase has established neighboring interactions between subunits [7,9]. Here, we extended this work using additional cross-linking agents. The overall cross-link data are summarized in Table 1. Notably, several cross-link products are consistently obtained, even when using different bifunctional reagents, such is the case of  $\alpha + \beta$ ,  $\alpha + \text{OSCP}$ ,  $\text{ASA2} + \text{ASA4}$ , and  $\text{ASA2} + \text{ASA7}$ . In contrast, some subunits do not yield cross-linked products at all; therefore, their possible interactions with other subunits remain obscure when using this particular experimental approach. A second strategy used to identify close vicinity of polypeptides in an oligomeric complex is partial dissociation of the complex into subcomplexes, either by controlled heat dissociation or by TDOC treatment. The generated subcomplexes are assumed to conserve the same subunit–subunit interactions present in the intact complex. This is the first time that interactions between the nonconserved components of the algal enzyme (ASA subunits) and orthodox components (OSCP) has been demonstrated.

The stoichiometry of subunits of orthodox ATP synthases has been studied using different approaches [45–47]. Here, we labelled cysteine residues using fluorescent cysteine-labeling reagents. The obtained data suggest a 1:1:1:1 stoichiometry of subunits ASA3, ASA4, and ASA5 with respect to the  $\gamma$  subunit. It is conceivable that the rest of the ASA subunits are also in a 1:1 stoichiometry with respect to  $\gamma$ , as judged by Coomassie blue staining of tricine–SDS gels. Nevertheless, further experimental work using other labelling approaches is required.

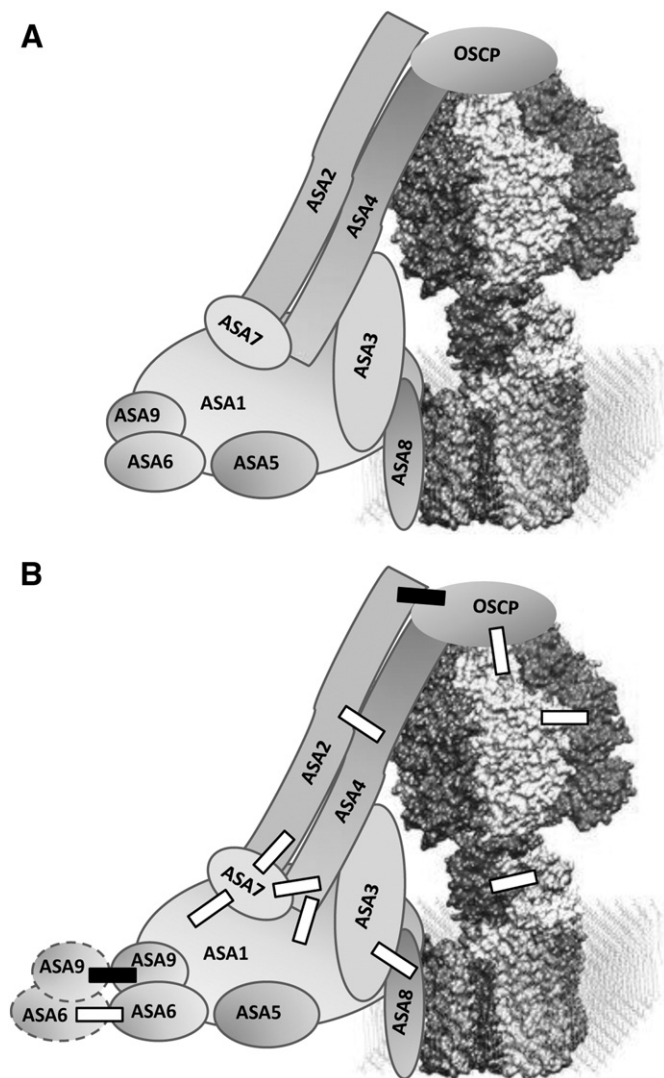
The transmembrane helices (TM) of the polypeptides that constitute the algal ATP synthase were predicted *in silico*. Three subunits seem to cross the inner mitochondrial membrane: subunit *a* (with five TM), subunit *c* (two TM), and subunit ASA8 (with a single TM). In addition, three subunits exhibited hydrophobic pockets: subunits OSCP, ASA5, and ASA6. Full-chain protein structure prediction (3D modelling) yielded globular models for all ASA subunits, except for ASA4 that exhibits an elongated shape with coiled coils.

Altogether, cross-link experiments, dissociation experiments, cysteine labeling, and *in silico* predictions suggest structural features of subunits that are in accordance with the topology model of the algal ATP synthase shown in Fig. 7.

#### 4.3. Overall structure of the complex as inferred from SAXS and EM analyses

X-ray scattering measurements have been used to determine the structure of isolated subunits of ATP synthases, in particular, of the dimeric *b* subunit of the  $F_1F_0$ -ATP synthase of *Escherichia coli* [48] and of the H subunit of the  $A_1A_0$ -ATP synthase of the archaea *Methanocaldococcus jannaschii* [49]. Here, a low-resolution model of the entire *Polytomella* mitochondrial ATP synthase was generated from the analysis of SAXS data. The obtained model clearly indicates the dimeric nature of the *Polytomella* ATP synthase, with a maximum intramolecular distance of 400 Å and a radius of gyration of  $\sim 141$  Å, as calculated with the program GNOM (Fig. 4). The data strongly suggest that the algal enzyme maintains a dimeric structure in solution, with an estimated molecular mass of 1696 kDa, which supports previous data based on BNE–PAGE and theoretical calculations based on the molecular masses of the different subunits [7]. The two main structural bodies most probably reflect the  $F_1F_0$  moieties and the peripheral stalks, which seem to be linked by a region with low X-ray scattering properties. The SAXS analysis suggests that the dimeric nature of the algal mitochondrial ATP synthase is also maintained in aqueous solution.

Electron (cryo)microscopy of single particles has been a powerful tool to determine the structure of intact ATP synthases of beef heart [50] or yeast [51] including the enzyme isolated in its dimeric form [52]. Here, a preliminary 3D model of the *Polytomella* mitochondrial ATP synthase complex was obtained by EM analysis. The model shows the basement of the robust peripheral stalks that protrude from the transmembrane domain of the complex. The peripheral stalks seem to extend from the bottom part of the first monomer towards the upper region of the second monomer. This configuration could not be inferred from previously obtained single-particle images [6]. If confirmed, this arrangement would suggest that dissociation of the dimer would disrupt the structure of the whole complex, giving rise to a structurally unstable monomer. This preliminary model is in accordance with previous biochemical data, which suggests that the stable form of the algal ATP synthase is dimeric and that disruption of



**Fig. 7.** Subunit arrangement of the dimeric algal mitochondrial ATP synthase. A) The model (only half the dimer is shown) is based on the overall structure of the complex found in the SAXS and EM studies and on the data obtained from the detergent dissociation assays and cross-linking experiments. For illustration purposes, the  $F_1F_0$  moiety comprising subunits  $[\alpha_3/\beta_3/\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}]$  corresponds to the yeast  $F_1c_{10}$  subcomplex crystallographic model obtained by Stock et al. [33]. B) Subunit-subunit interactions identified experimentally in this work. White rectangles indicate subunit-subunit interactions inferred from cross-linking experiments. Black rectangles indicate subunit-subunit interactions inferred from generating subcomplexes. ASA6 and ASA9 are shown interacting with the corresponding subunits of the adjacent monomer.

the enzyme into its corresponding monomers is accompanied by a structural instability and partial loss of the ATPase activity of the enzyme [9]. Single-particle EM images of the enzyme show a relatively large mass of the peripheral arm interacting with the upper region of the  $F_1$  sector where OSCP, ASA2, and ASA4 are expected to be localized. This large mass is not evident in the 3D model obtained, and this may be due to the fact that the great majority of the algal ATP synthases are oriented on the carbon film to produce the side view projection in which the ATP synthase appears perpendicular to the long axis of the complex. In comparison, few enzymes were oriented exhibiting a top view.

The model presented here differs from the one recently and independently proposed by Dudkina et al. [53], which shows a bulkier mass of the peripheral arm in the region believed to interact with OSCP. Thus, a larger number of images representing orientations other than the side view would be desirable to further refine the model proposed here.

There are some obvious structural differences between the SAXS and the EM models, the first shows a looser dimer in comparison with the second, however, this may be due both to the resolution of each technique and to the different conditions used, i.e., “free in solution” versus “fixed on a grid.” Nevertheless, both models are consistent with the algal ATP synthase being a dimeric complex.

### Acknowledgments

This research was supported by grants 56619 from CONACyT (Mexico), IN217108 from DGAPA, UNAM (Mexico), CNPq and FAPERJ (Brazil), the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposals D11A-SAXS1-5944, D11A-SAXS1-6714, and D11A-SAXS1-7672, and by grants from the Belgian F.R.S.-FNRS (2.4638.05, 2.4601.08, 1.5.255.08, 1.C057.09, and F.4735.06). P.C. is a research associate from the Belgian F.R.S.-FNRS. We thank Dr. Tomas S. Plivelic, and Dr. Rodrigo A. Martinez (Brazilian Synchrotron Light Laboratory) for assistance in the SAXS beamline setup.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbabo.2010.02.024.

### References

- [1] P.L. Pedersen, Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 349–355.
- [2] M. Nakanishi-Matsui, M. Futai, Stochastic rotational catalysis of proton pumping F-ATPase, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363 (2008) 2135–2142.
- [3] W. Junge, H. Sielaff, S. Engelbrecht, Torque generation and elastic power transmission in the rotary F(O)F(1)-ATPase, *Nature* 459 (2009) 364–370.
- [4] R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernández, D. González-Halphen, Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach, *Plant Physiol.* 132 (2003) 318–330.
- [5] R. van Lis, D. González-Halphen, A. Atteia, Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp., *Biochim. Biophys. Acta* 1708 (2005) 23–34.
- [6] N.V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, H.P. Braun, Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5769–5772.
- [7] M. Vázquez-Acevedo, P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle, D. González-Halphen, The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex, *J. Bioenerg. Biomembr.* 38 (2006) 232–271.
- [8] R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, G. Groth, A. Atteia, New insights into the unique structure of the  $F_0F_1$ -ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1190–1199.
- [9] A. Villavicencio-Queijeiro, M. Vázquez-Acevedo, A. Cano-Estrada, M. Zarco-Zavala, M. Tuena de Gómez, J.A. Mignaco, M.M. Freire, H.M. Scofano, D. Foguel, P. Cardol, C. Remacle, D. González-Halphen, The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 1–13.
- [10] P. Cardol, D. González-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R.F. Matagne, C. Remacle, The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project, *Plant Physiol.* 137 (2005) 447–459.
- [11] J.E. Walker, V.K. Dickson, The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 286–296.
- [12] J. Weber, ATP synthase—the structure of the stator stalk, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 53–56.
- [13] S. Brunner, V. Everard-Gigot, R.A. Stuart, Su e of the yeast  $F_1F_0$ -ATP synthase forms homodimers, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48484–48489.
- [14] G. Arselin, J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M.F. Giraud, A. Dautant, D. Brèthes, J. Velours, The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40392–40399.
- [15] J.R. Gledhill, J.E. Walker, Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 989–992.
- [16] Y.H. Ko, J. Hüllihen, S. Hong, P.L. Pedersen, Mitochondrial F(O)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the  $F_1$  motor shielded by F(O), functional significance, and evidence for an involvement of the unique F(O) subunit F(6), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32931–32939.

- [17] N.V. Dudkina, S. Sunderhaus, H.P. Braun, E.J. Boekema, Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3427–3432.
- [18] A. Atteia, R. van Lis, S.I. Beale, Enzymes of the heme biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic alga *Polytomella* sp, *Eukaryot. Cell* 4 (2005) 2087–2097.
- [19] H. Schägger, Denaturing electrophoretic techniques, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 59–79.
- [20] H. Schägger, Native gel electrophoresis, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 81–104.
- [21] M.A.K. Markwell, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [22] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [23] G. Kellermann, F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, I.L. Torriani, The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 880–883.
- [24] D.I. Svergun, Mathematical methods in small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 485–492.
- [25] H. Fischer, M. de Oliveira Neto, H.B. Napolitano, I. Polikarpov, A. F. Craievich, Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale, *J. Appl. Cryst.* 43 (2010) 101–109.
- [26] D.I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.* 25 (1992) 495–503.
- [27] D.I. Svergun, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.* 76 (1999) 2879–2886.
- [28] V.V. Volkov, D.I. Svergun, Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering, *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 860–864.
- [29] S.J. Ludtke, P.R. Baldwin, W. Chiu, EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, *J. Struct. Biol.* 128 (1999) 82–97.
- [30] M. van Heel, G. Harauz, E.V. Orlova, R. Schmidt, M. Schatz, A new generation of the IMAGIC image processing system, *J. Struct. Biol.* 116 (1996) 17–24.
- [31] Z. Zhang, Y. Zheng, H. Mazon, E. Milgrom, N. Kitagawa, E. Kish-Trier, A.J. Heck, P.M. Kane, S. Wilkens, Structure of the yeast vacuolar ATPase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35983–35995.
- [32] P. Dube, P. Tavares, R. Lurz, M. van Heel, The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry, *EMBO J.* 12 (1993) 1303–1309.
- [33] D. Stock, A.G. Leslie, J.E. Walker, Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase, *Science* 286 (1999) 1700–1705.
- [34] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 2025 (2004) 1605–1612.
- [35] Y. Shirakihara, A.G. Leslie, J.P. Abarahams, J.E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kamabara, K. Saika, Y. Kagawa, M. Yoshida, The crystal structure of the nucleotide-free  $\alpha_3\beta_3$  subcomplex of  $F_1$ -ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 is a symmetric trimer, *Structure* 5 (1997) 825–836.
- [36] M.A. Mallet, R. Lee, Identification of three distinct *Polytomella* lineages based on mitochondrial DNA features, *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (2006) 79–84.
- [37] O. Glatter, Data treatment, in: O. Kratky Glatter (Ed.), *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, New York, 1982, pp. 119–166.
- [38] O. Glatter, Interpretation, in: O. Kratky Glatter (Ed.), *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, New York, 1982, pp. 167–196.
- [39] L.M.T.R. Lima, Y. Cordeiro, L.W. Tinoco, A.F. Marques, C.L. Oliveria, S. Sampath, R. Kodali, G. Choi, D. Foguel, I. Torriani, B. Caughy, J.L. Silva, Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid, *Biochemistry* 45 (2006) 9180–9187.
- [40] S. Funes, E. Davidson, M.G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M.P. King, D. González-Halphen, The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the  $F_1F_0$ -ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6051–6058.
- [41] E.B. Gutiérrez-Cirlos, A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, R. Coria, D. González-Halphen, A highly active ubiquinol-cytochrome *c* reductase (bc1 complex) from the colorless alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas*. Characterization of the heme binding site of cytochrome  $c_1$ , *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9147–9154.
- [42] A. Atteia, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the  $F_0F_1$ -ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 275–284.
- [43] X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome *c* oxidase is encoded in the nucleus of chlamydomonad algae, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30144–30152.
- [44] M. Lapaille, A. Escobar-Ramírez, H. Degand, D. Baurain, E. Rodríguez-Salinas, N. Coosemans, M. Boutry, D. González-Halphen, C. Remacle, P. Cardol, Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial  $F_1F_0$  ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme, *Molecular Biology and Evolution* (in press), doi:10.1093/molbev/msq049.
- [45] J.E. Walker, I.M. Fearnley, N.J. Gay, B.W. Gibson, F.D. Northrop, S.J. Powell, M.J. Runswick, M. Saraste, V.L. Tybulewicz, Primary structure and subunit stoichiometry of  $F_1$ -ATPase from bovine mitochondria, *J. Mol. Biol.* 184 (1985) 677–701.
- [46] C. Hekman, J.M. Tomich, Y. Hatefi, Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the  $F_0$  subunits, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13564–13571.
- [47] M. Bateson, R.J. Devenish, P. Nagley, M. Prescott, Single copies of subunits *d*, oligomycin-sensitivity conferring protein, and *b* are present in the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7462–7466.
- [48] P.A. Del Rizzo, Y. Bi, S.D. Dunn, B.H. Shilton, The “second stalk” of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain, *Biochemistry* 41 (2002) 6875–6884.
- [49] G. Biuković, M. Rössle, S. Gayen, Y. Mu, G. Grüber, Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of the peripheral stalk subunit H of the  $A_1A_0$  ATP synthase from *Methanocaldococcus jannaschii* and its binding to the catalytic A subunit, *Biochemistry* 46 (2007) 2070–2078.
- [50] J.L. Rubinstein, J.E. Walker, R. Henderson, Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy, *EMBO J.* 22 (2002) 6182–6192.
- [51] W.C. Lau, L.A. Baker, J.L. Rubinstein, Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase, *J. Mol. Biol.* 382 (2008) 1256–1264.
- [52] F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens, J.J. García, Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel  $F_0$  bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 12356–12358.
- [53] N.V. Dudkina, G.T. Oostergetel, D. Lewejohan, H.P. Braun, E.J. Boekema, Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by 2 cryo-electron tomography, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 272–277.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Introduction

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

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

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

In this work, we explored the ATP hydrolytic activity of the mitochondrial ATP synthase purified from *Polytomella* sp. The isolated enzyme exhibited a very low ATPase activity that increased upon heat treatment, due to its dissociation and the concomitant release of the F<sub>1</sub> sector. Oligomycin was found to stabilize the dimeric structure of the enzyme, providing partial resistance to heat dissociation. Incubation in the presence of several non-ionic detergents increased the ATPase activity up to 7.0–9.0 Units/mg. The detergent-activated enzyme is fully sensitive to oligomycin and is readily inactivated by heat treatment. It was previously shown that upon incubation at 60°C for short periods of time the mitochondrial ATP synthase purified from *Polytomella* sp. dissociated into monomers, and subsequently disassembled into F<sub>1</sub> moieties and free polypeptides (Vázquez-Acevedo et al. 2006).

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

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

## Materials and methods

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

*Detergents* Octaethylene-glycoldodecyl ether (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) and n-dodecanoyl sucrose were obtained from Calbiochem. Lauryldimethylamine oxide (LDAO) was from Millmaster Onyx International (New Jersey, USA). Octanoyl-N-methylglucamide and Decanoyl-N-methylglucamide were obtained from Boehringer Mannheim. The rest of the utilized detergents were from Sigma.

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

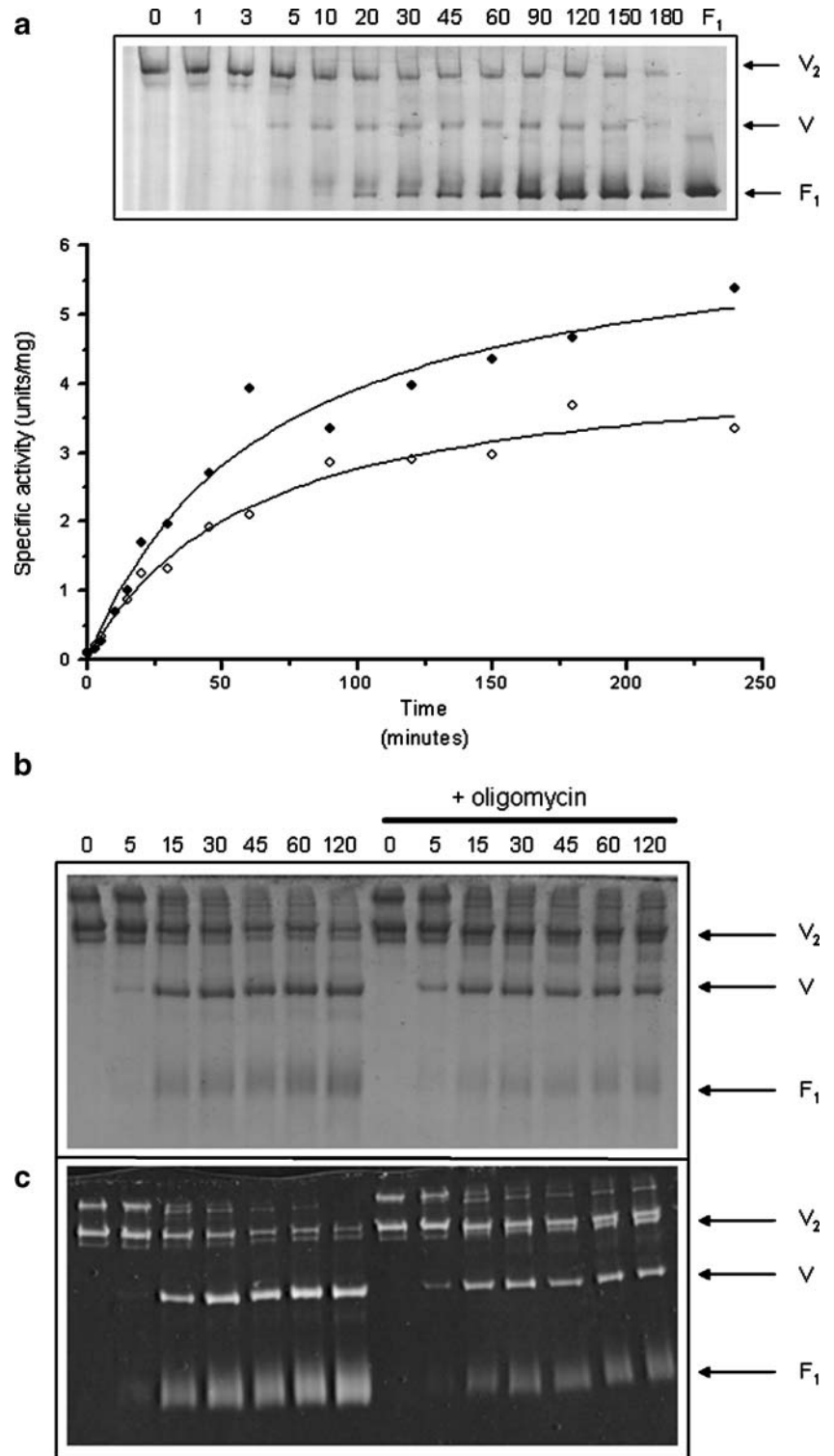
*Protein analysis* Proteins were solubilized in the presence of n-dodecyl- $\beta$ -maltoside and subjected to BN-PAGE (Schägger 1994). BN-PAGE was usually carried out in 4%–12% acrylamide gradient gels. Denaturing SDS-Tricine-PAGE was carried out as in Schägger (1994). Protein concentrations were estimated according to Markwell et al. (1978). Cross-linking experiments were carried out with the water-insoluble, homo-bifunctional, thiol-cleavable reagent dithiobis(succinimidyl)propionate (DSP). The enzyme, in its dimeric or monomeric form (3 mg protein/ml), was incubated in a buffer containing 20 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM sodium EDTA, 10 mM succinate, 35 mM NaCl, 2 mM ATP and 0.1 mg/ml of n-dodecyl- $\beta$ -maltoside, in the

presence of 0.2 mM DSP, for 30 min, at 4 °C. The reaction was stopped by the addition of 25 mM Tris (pH 8.0) (final concentration). The sample (120 µg of protein) was subjected to SDS- Tricine-PAGE [7% (w/v) acrylamide] in non-reducing conditions. The lanes of interest were cut and incubated for 1 h in the presence of 50 mM 1,4-

dithiothreitol, 0.1% SDS, 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine (pH 8.25) and loaded onto 2D-SDS-Tricine-PAGE [12% (w/v) acrylamide].

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

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



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

**ATPase activity measurements** ATPase activity was measured spectrophotometrically following the oxidation of NADH at 340 nm, using the ATP regenerating system described by Pullman et al. (1960) with modifications. The assay medium contained 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 30 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM Tris-sulfate (pH 7.4), 3 mM sodium ATP, 3 units of pyruvate kinase, 4.5 units of lactate dehydrogenase, 1.5 mM of phosphoenol pyruvate, and 0.3 mM NADH. Where indicated, detergents at different concentrations were added. ATPase activity is expressed in Units/mg ( $\mu$ moles ATP hydrolyzed min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>). Usually, assays were carried out with 20  $\mu$ g of protein. To assay oligomycin sensitivity, samples were preincubated 30 min in the presence of 10  $\mu$ g/ml oligomycin. The inhibitor was also added to the assay medium at the same final concentration to attain maximal inhibition (98%). Preincubation alone in the presence of the inhibitor resulted only in a 50% loss of activity. DMSO was used as vehicle when adding the inhibitor.

**In-gel ATPase activity** ATPase activity was visualized after BN-PAGE (Zerbetto et al. 1997; Wittig and Schagger 2005). The gels were incubated for 3 h in a buffer containing 270 mM glycine and 35 mM Tris-HCl (pH 8.4). Then, the following reagents were added: 8 mM ATP, 14 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.2% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> until the white precipitates of lead phosphate were visible. The reaction was stopped by adding 50% methanol.

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

## Results

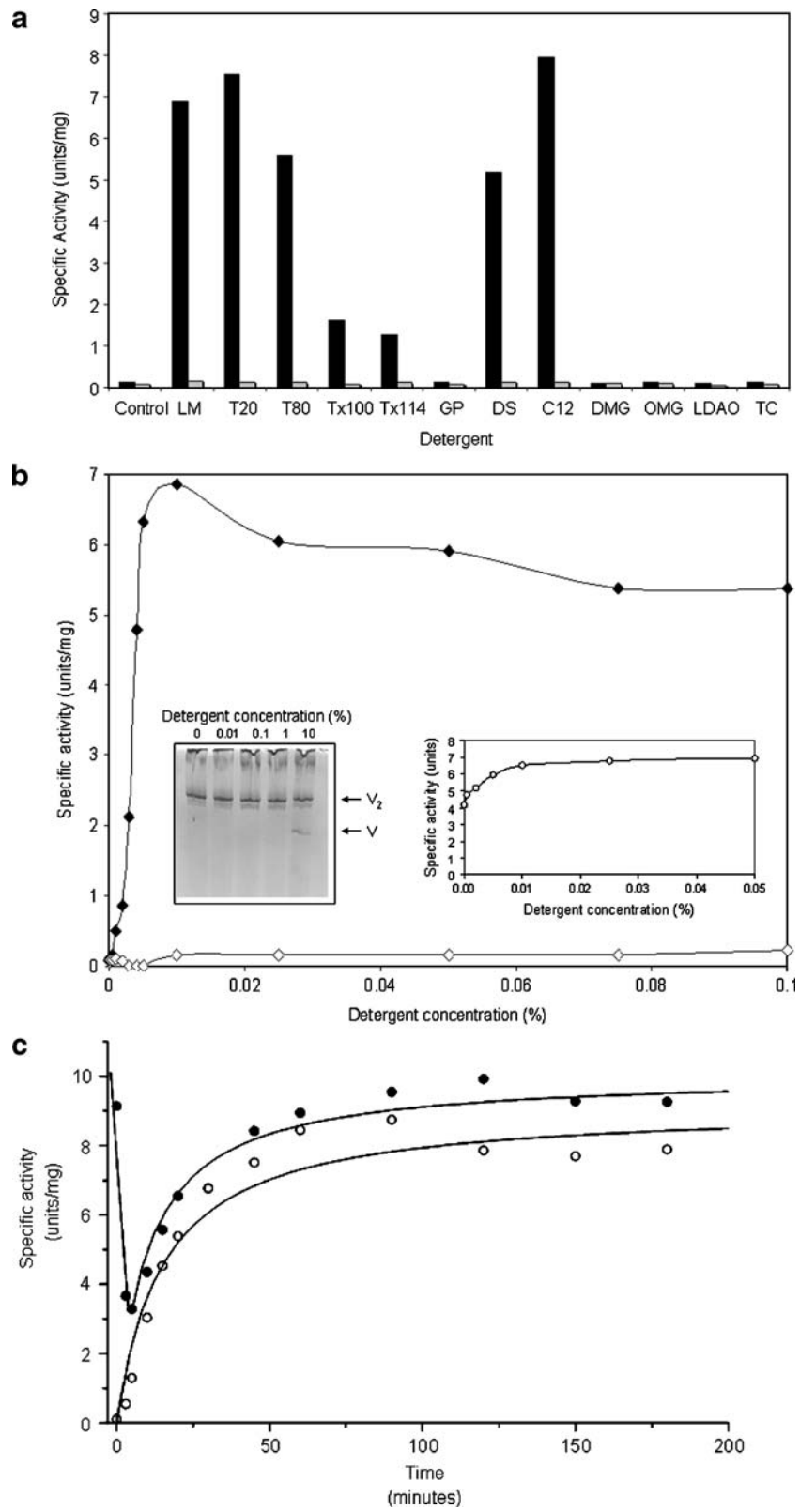
**The mitochondrial ATP synthase from *Polytomella sp.*, as isolated, exhibits a very low ATPase activity that increases upon heat treatment** The algal enzyme, as obtained from the glycerol gradient centrifugation step (Vázquez-Acevedo

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

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

**Fig. 2** Effect of detergents on the ATPase activity of the ATP synthase from *Polytomella sp.* Panel A) ATPase activity at 25 °C of the algal enzyme in the presence of various detergents (black bars). Detergents were added to the ATPase activity assay medium at a final concentration of 0.01% (w/v). Control: no detergent added; LM, lauryl maltoside; T20, Tween 20; T80, Tween 80; Tx100, Triton X100; Tx114, Triton X114; GP, n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; DS, n-dodecanoyl sucrose; C<sub>12</sub>, octaethylene glycol monododecyl ether; DMG, decanoyl-N-methylglucamide; OMG, octanoyl-N-methylglucamide, LDAO, lauryldimethylamine oxide, and TC, taurodeoxycholate. To assay oligomycin sensitivity (gray bars), samples were preincubated 30 min in the presence of 10  $\mu$ g/ml oligomycin. The inhibitor was also added to the assay medium at a final concentration of 5  $\mu$ g/ml. Panel B) Effect of increasing concentrations of LM in the assay medium on the ATPase activity of the enzyme. Filled rhomboids, activity in the absence of oligomycin; open rhomboids, activity in the presence of oligomycin. Left side inset : BN-PAGE electrophoretic pattern of the dimeric algal ATP synthase (V<sub>2</sub>) incubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of LM; 60  $\mu$ g of protein were loaded in each lane. Only at concentrations as high as 10% LM, the appearance of a discrete band of the monomeric form (V) was observed. Right side inset : effect of increasing concentrations of LM in the assay medium on the ATP hydrolysis of the F<sub>1</sub> subcomplex. The F<sub>1</sub> sector was prepared by incubating the algal ATP synthase for two minutes at 60 °C. The assayed ATP hydrolytic activity was completely insensitive to oligomycin. Panel C) ATP hydrolytic activity of the purified algal ATP synthase as a function of time at 45 °C. The ATPase assay medium contained 0.01% LM. Filled rhomboids, activity in the absence of oligomycin; open rhomboids, activity in the presence of oligomycin





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

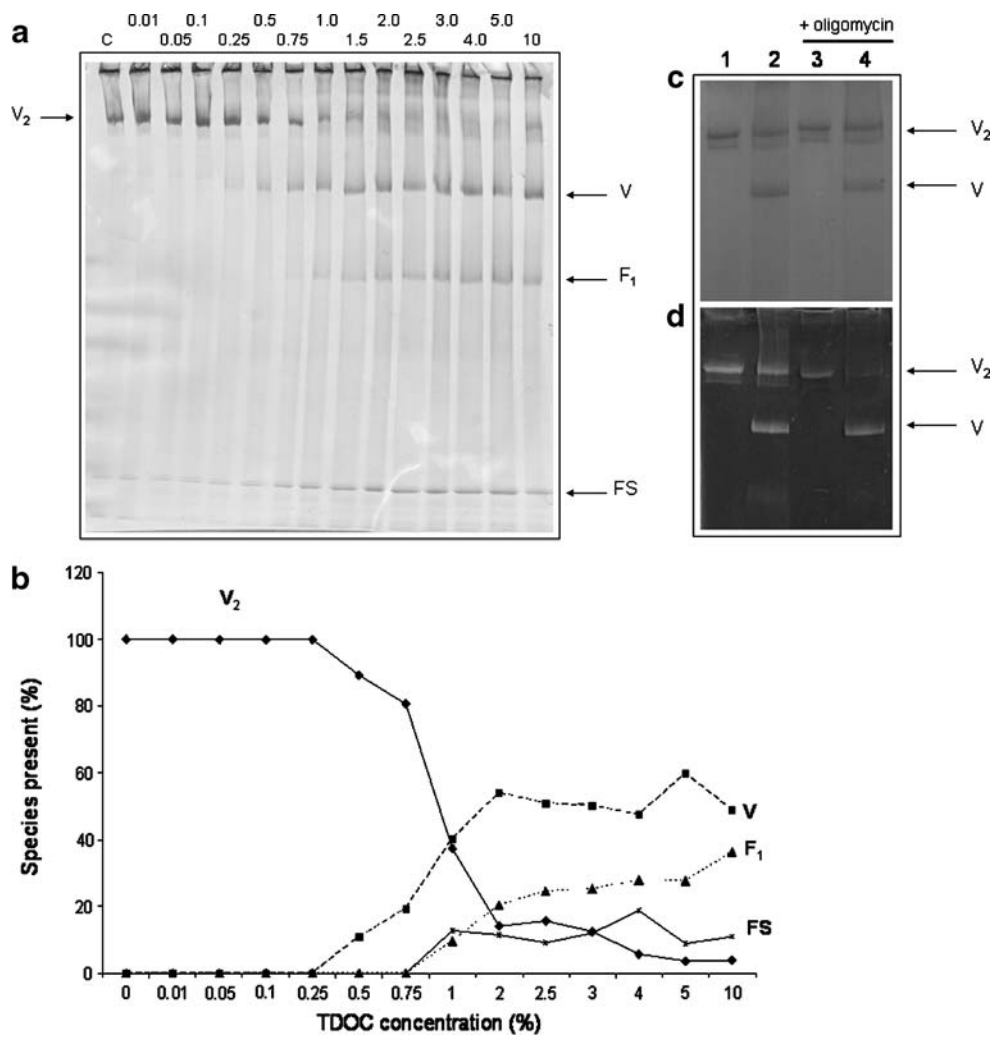
When the algal enzyme was incubated at 45 °C for increasing periods of time and its activity measured in the presence of detergent in the assay medium (LM 0.01%), a different pattern of activation was observed (Fig. 2C). In a first phase, the original activity, which was fully sensitive to oligomycin,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

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

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

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

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



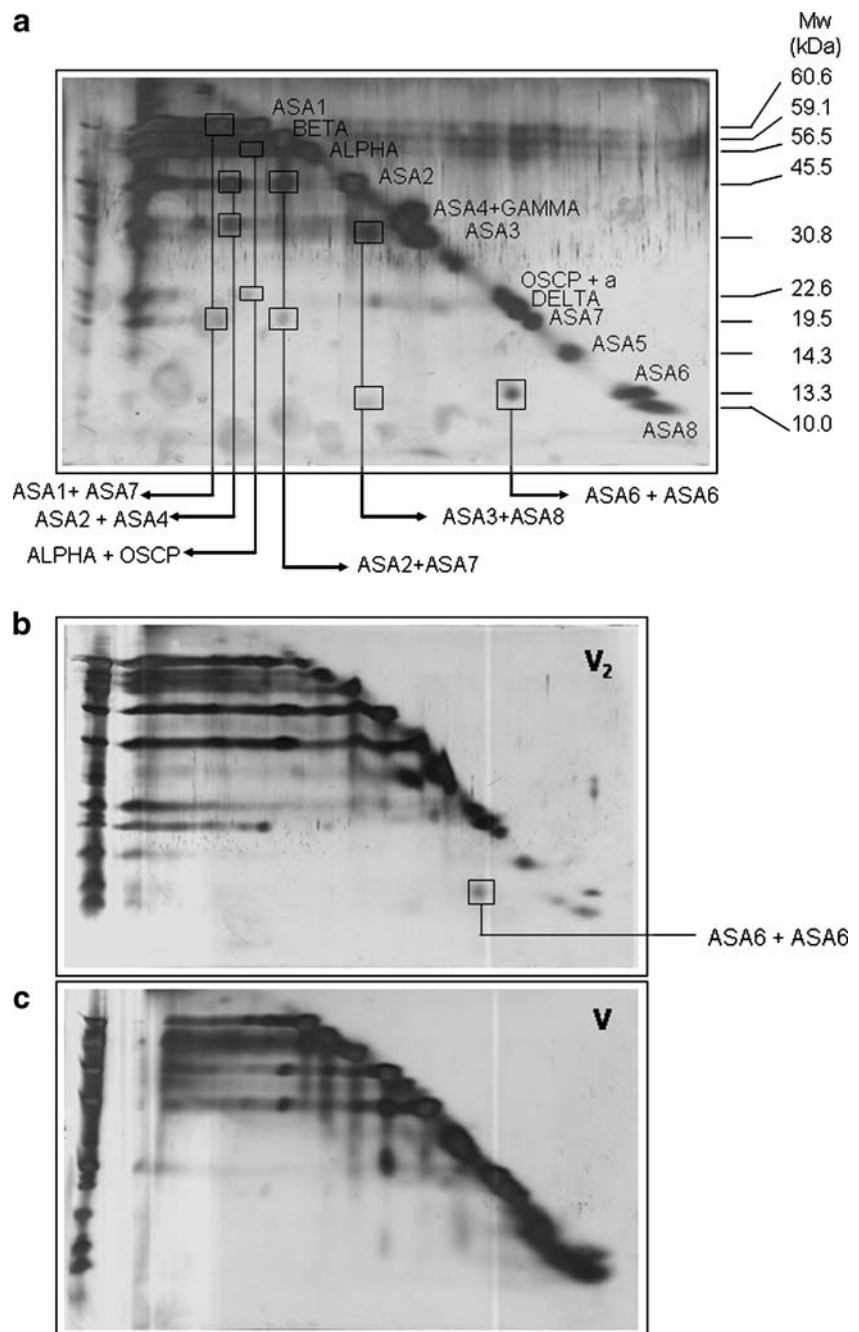
**Fig. 3** Effect of increasing TDOC concentration on the oligomeric state of the ATP synthase from *Polytomella* sp. Panel A) BN-PAGE of purified ATP synthase samples incubated in the presence of TDOC at increasing concentrations (% w/v) in ice, for 30 min; 100 μg of protein were loaded in each lane. The control lane in the absence of the detergent is labelled C. Dimer (V<sub>2</sub>), monomer (V); F<sub>1</sub> sector (F<sub>1</sub>), Free subunits (FS). Panel B) Quantitation of the oligomeric forms of the algal ATP synthase as a function of TDOC concentration. Data were taken from the densitometric analysis of the gel shown in panel A. Curves denote the % of the different forms of the enzyme; 100% is the

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

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

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

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

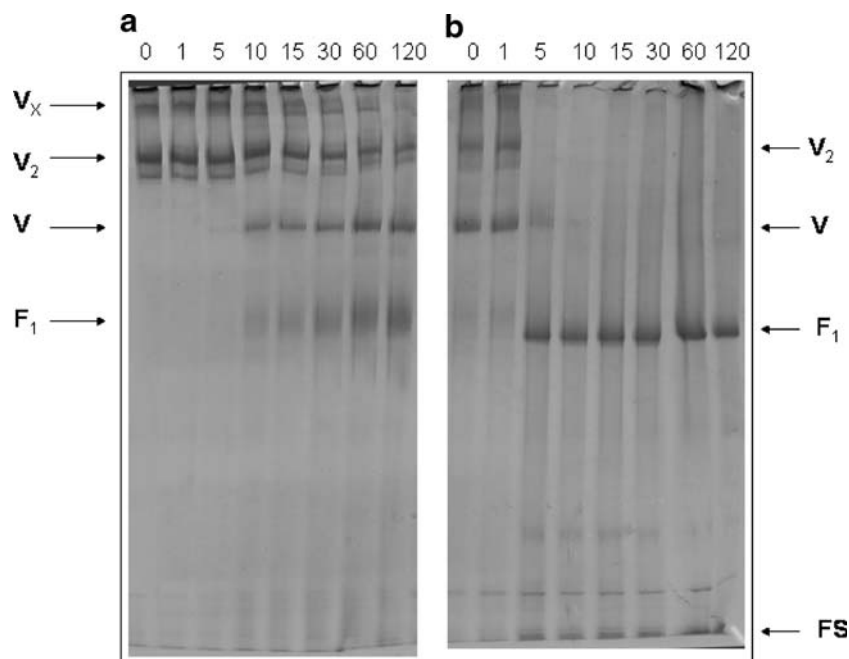


*Properties of the dimeric and monomeric mitochondrial ATP synthase of Polytomella sp.* The dimeric and monomeric forms of the enzyme were subjected to different treatments: high temperature, high hydrostatic pressures, and proteolysis. While the dimeric enzyme was relatively stable to incubation for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

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

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

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



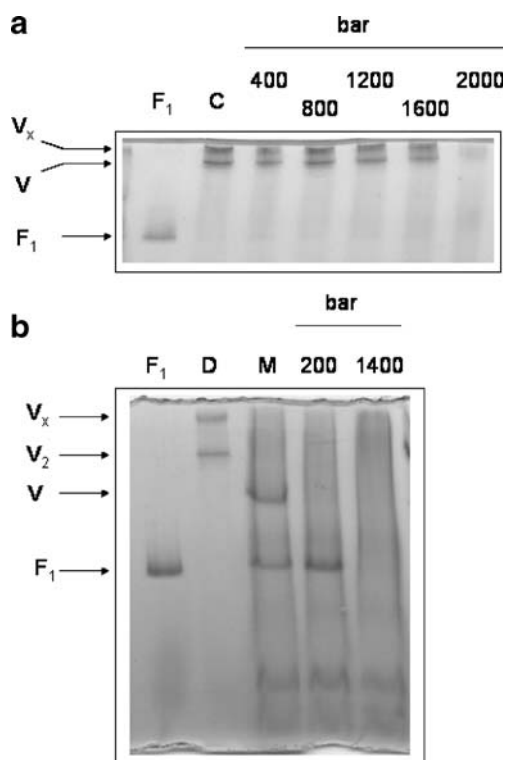
(Fig. 6A). In contrast, the monomeric enzyme released  $F_1$  moieties at barely 200 bar, and completely dissociated into free subunits at 1,200 bar (Fig. 6B).

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

## Discussion

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

synthase exhibit a very low ATPase activity that readily increases when incubated at relatively high temperatures. The enzyme can also be activated by non-ionic detergents. LM in the activity assay medium increased the ATPase activity of the enzyme. This is noteworthy, since LM was in contact with the enzyme throughout the purification procedure. The isolated enzyme contained detergent at a 0.1 (w/w) detergent/protein ratio. In this regard it may be mechanistically relevant that the 200-fold activation was achieved when LM was added to the ATPase activity assay cuvette at a 5.0 (w/w) detergent/protein ratio. This 50-fold increase in the detergent/protein ratio may explain the strong activation of the ATPase. The excess detergent may either induce a conformational change in the enzyme, or alternatively, it may release a yet undetermined inhibitory factor, analogous to the regulatory protein IF<sub>1</sub> in the bovine enzyme (Gledhill et al. 2007). Activation of the ATP hydrolytic activity of other ATP synthases has been described. The detergent LDAO stimulated 5 to 6-fold *Escherichia coli* ECF<sub>1</sub> and ECF<sub>1</sub>-Fo ATPase activities in a concentration-dependent manner. The detergent effect was attributed to a release of the inhibitory action of subunit  $\epsilon$  on subunit  $\beta$  (Löttscher et al. 1984). LDAO also activated ATP hydrolysis of the mitochondrial F<sub>1</sub>Fo-ATP synthase, probably due to the release of the inhibitor protein IF<sub>1</sub> (Vázquez-Laslop and Dreyfus 1986). The mechanism by which LM stimulates the ATP hydrolytic activity of the algal mitochondrial ATP synthase remains to be ascertained, since an orthodox inhibitor protein does not seem to be present in the isolated enzyme. Also, a homolog of the gene encoding the bovine ATPase inhibitor protein IF<sub>1</sub>



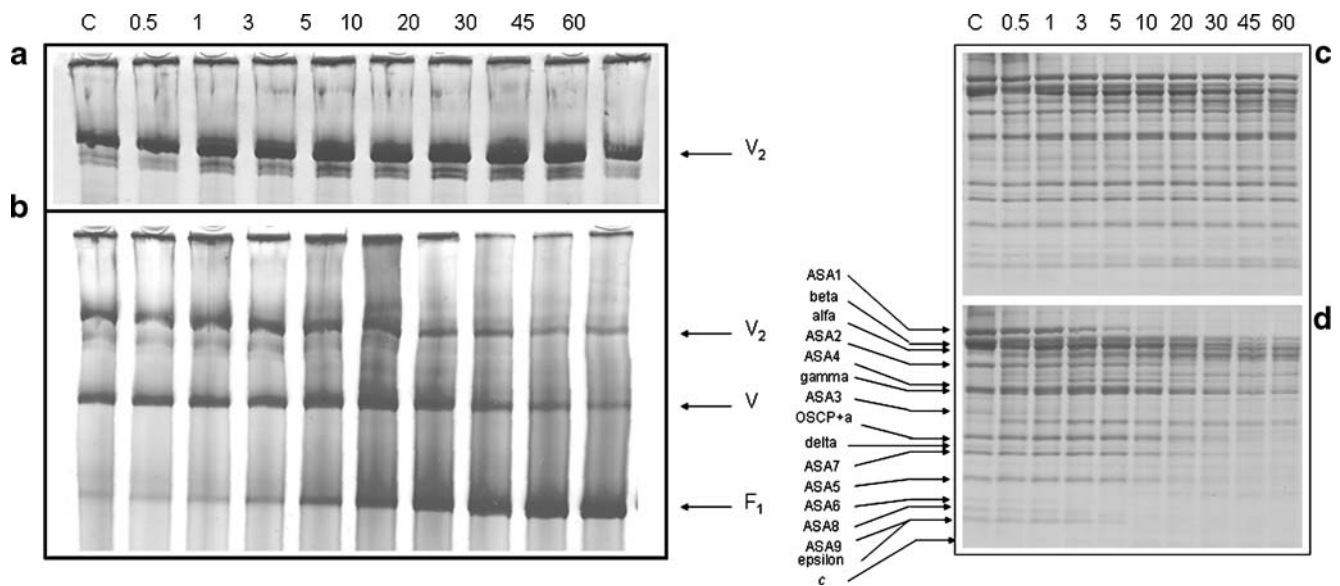
**Fig. 6** Effect of high hydrostatic pressures upon the dimeric and monomeric forms of the algal ATP synthase. Panel A) Incubation of the dimeric algal ATP synthase at high hydrostatic pressures. Lane F<sub>1</sub> shows the F<sub>1</sub> sector generated by heating the ATP synthase for 2 min at 60 °C; lane C, uncompressed, intact, dimeric ATP synthase. The five following lanes show the enzyme subjected for 30 min to increasing high hydrostatic pressures (in bars). Panel B) Incubation of the monomeric algal ATP synthase at high hydrostatic pressures. Lane F<sub>1</sub> shows the F<sub>1</sub> sector generated by heating the ATP synthase for 2 min at 60 °C; lane D, intact, dimeric ATP synthase; Lane M, monomeric form of the enzyme. The two following lanes show the monomeric enzyme subjected for 15 min to increasing high hydrostatic pressures (in bars). The oligomeric (V<sub>x</sub>), dimeric (V<sub>2</sub>), and monomeric (V) forms of the enzyme are indicated, as well as the F<sub>1</sub> sector. 50 µg of protein were loaded in each lane

could not be identified in the genome of the closely-related green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Cardol et al. 2005). LM activates the hydrolytic activity of the ATP synthase of *Polytomella* sp. possibly exerting a conformational change upon subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , or  $\epsilon$ . It was previously proposed that the C-terminal extensions of the chlorophycean ATP synthase  $\beta$  subunits, originally described by Franzén and Falk (1992), could function similarly to the inhibitor protein IF<sub>1</sub> (Atteia et al. 1997). The possible regulatory role of these extensions remains to be explored.

**ATPase activity of *Polytomella* mitochondrial ATP synthase and oligomycin sensitivity** Oligomycin is a classical inhibitor of proton translocation in F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPase (Slater 1967; Tzagoloff 1970). Sensitivity to oligomycin is related to the

structural integrity of the enzyme. If F<sub>1</sub> is detached from F<sub>o</sub>, although ATP hydrolysis may take place, its sensitivity to oligomycin is lost. The inhibitor interacts with subunits *a* and *c* of the F<sub>o</sub> sector (John and Nagley 1986; Galanis et al. 1989). Oligomycin was found to be a potent inhibitor of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella*, when it was preincubated with the enzyme and also added in the assay medium. In these conditions, oligomycin inhibited more than 98% of the detergent-stimulated ATPase activity of the complex. The high sensitivity of the algal ATP synthase to oligomycin, suggests that the increase in ATP activity by non-ionic detergents does not involve dissociation of the dimer, indeed, sensitivity to oligomycin was lost when dissociation of the enzyme was induced by heat treatment. This process was accompanied by monomerization and eventual disruption of the ATP synthase into F<sub>1</sub> sectors and free subunits (Fig. 1A). Oligomycin also seems to partially prevent the heat-induced dissociation of the dimeric algal ATP synthase, providing some ligand-induced thermostability to the complex (Fig. 1B). In this regard, it is noted that binding of ligands may confer thermostability to ATP synthases, i.e., the binding of Mg<sup>2+</sup>-ADP to the F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-type ATP synthase from the thermophilic *Bacillus* PS3 (Villaverde et al. 1997).

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



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

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

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

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

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

The effects of high hydrostatic pressure on the mammalian mitochondrial ATP synthase have been studied before (Penniston 1971; Dreyfus et al. 1988). While the F<sub>1</sub> portion lost activity upon compression-decompression (unless protected by 30% glycerol), the beef heart F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase complex was resistant to pressures up to 1,700 bar, and retained activity upon decompression (Dreyfus et al. 1988). The algal F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase retained its dimeric conformation after compression at 1,600 bar and decompression, whereas the monomeric form of the enzyme readily dissociated when subjected to the relatively low pressures of 200 bar.

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

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

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

## References

- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schägger H (1998) Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17:7170–7178
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brèthes D, Velours J (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 279:40392–40399
- Attea A, Dreyfus G, González-Halphen D (1997) Characterization of the alpha and beta-subunits of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1320:275–284
- Bornhövd C, Vogel F, Neupert W, Reichert AS (2006) Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem* 281:13990–13998
- Brunner S, Everard-Gigot V, Stuart RA (2002) Structure of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase forms homodimers. *J Biol Chem* 277:48484–48489
- Cardol P, González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C (2005) The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol* 137:447–459
- Dreyfus G, Guimaraes-Motta H, Silva JL (1988) Effect of hydrostatic pressure on the mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* 27:6704–6710
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005) Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett* 579:5769–5772
- Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* 580:3427–3432
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* 134:1450–1459
- Franzén LG, Falk G (1992) Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol Biol* 19:771–780
- Galanis M, Mattoon JR, Nagley P (1989) Amino acid substitutions in mitochondrial ATP synthase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to venturicidin or ossamycin resistance. *FEBS Lett* 249:333–336
- Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2007) How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15671–15676
- Golden TR, Pedersen PL (1998) The oligomycin sensitivity conferring protein of rat liver mitochondrial ATP synthase: arginine 94 is important for the binding of OSCP to F<sub>1</sub>. *Biochemistry* 37:13871–13881
- González-Halphen D, Lindorfer MA, Capaldi RA (1988) Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochemistry* 27:7021–7031
- Hong S, Pedersen PL (2008) ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:590–641
- Horvath A, Kingan TG, Maslov DA (2000) Detection of the mitochondrially encoded cytochrome c oxidase subunit I in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. Evidence for translation of unedited mRNA in the kinetoplast. *J Biol Chem* 275:17160–17165
- Jansch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *The Plant Journal* 9:357–368
- John UP, Nagley P (1986) Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 6 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin resistance. *FEBS Lett* 207:79–83
- Ko YH, Hüllihen J, Hong S, Pedersen PL (2000) Mitochondrial F(0)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F<sub>1</sub> motor shielded by F(0), Functional significance, evidence for an involvement of the unique F(0) subunit F(6). *J Biol Chem* 275:32931–32939
- Krause F, Reifschneider NH, Gotom S, Dencher NA (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 329:583–590
- Lötscher HR, deJong C, Capaldi RA (1984) Interconversion of high and low adenosinetriphosphatase activity forms of *Escherichia coli* F<sub>1</sub> by the detergent lauryldimethylamine oxide. *Biochemistry* 23:4140–4143
- Markwell MAK, Hass SM, Biber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206–210
- Meyer B, Wittig I, Trifilieff E, Karas M, Schägger H (2007) Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* 10:1690–1699
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García JJ (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 102:12356–12358
- Paumard P, Arselin G, Vaillier J, Chaignepain S, Bathany K, Schmitter JM, Brèthes D, Velours J (2002) Two ATP synthases can be linked through subunits *i* in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 41:10390–10396
- Penniston JT (1971) High hydrostatic pressure and enzymic activity: inhibition of multimeric enzymes by dissociation. *Arch Biochem Biophys* 142:322–332
- Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.



- I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 235:3322–3329
- Schägger H (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52:119–128
- Schägger H, in: von Jagow G, Schägger H, (Eds.) (1994) *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic, San Diego, pp. 59–79
- Silva JL, Foguel D, Da Poian AT, Prevelige PE (1996) The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Curr Opin Struct Biol* 6:166–175
- Slater EC (1967) Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. *Methods Enzymol* 10:48–57
- Souza MO, Creczynski-Pasa TB, Scofano HM, Gräber P, Mignaco JA (2004) High hydrostatic pressure perturbs the interactions between CF(0)F(1) subunits and induces a dual effect on activity. *Int J Biochem Cell Biol* 36:920–930
- Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27:1154–1160
- Tzagoloff A (1970) Assembly of the mitochondrial membrane system. 3. Function and synthesis of the oligomycin sensitivity-conferring protein of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 245:1545–1551
- van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol* 132:318–330
- van Lis R, González-Halphen D, Atteia A (2005) Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta* 1708:23–34
- van Lis R, Mendoza-Hernández G, Groth G, Atteia A (2007) New insights into the unique structure of the FoF<sub>1</sub>-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 144:1190–1199
- Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, González-Halphen D (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg Biomembr* 38:271–282
- Vázquez-Laslop N, Dreyfus G (1986) Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase activation by an amine oxide detergent. *J Biol Chem* 261:7807–7810
- Villaverde J, Cladera J, Padrós E, Rigaud J-L, Duñach M (1997) Effect of Nucleotides on the Thermal Stability and on the Deuterium Kinetics of the Thermophilic F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP Synthase. *Eur J Biochem* 244:441–448
- Walker JE, Dickson VK (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1757:286–296
- Wittig I, Schägger H (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5:4338–4346
- Yao H, Stuart RA, Cai S, Sem DS (2008) Structural characterization of the transmembrane domain from subunit e of yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase: a helical GXXXG motif located just under the micelle surface. *Biochemistry* 47:1910–1917
- Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 18:2059–2064
- Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biophys Biochim Acta* 1793:5–19

# LA MITOCONDRIA COMO FÁBRICA DE COFACTORES: BIOSÍNTESIS DE GRUPO HEMO, CENTROS Fe-S Y NUCLEÓTIDOS DE FLAVINA (FMN/FAD)

Alexa Villavicencio-Queijeiro

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-242, C.P.  
04510, Coyoacán, México, D.F. E-mail: queijeiro@email.fc.unam.mx.

## RESUMEN

Los cofactores hemo, centros Fe-S y los nucleótidos de flavina (FMN y FAD) son esenciales para muchos organismos, existen un gran número de proteínas que dependen de ellos para llevar a cabo sus funciones biológicas. Estos cofactores han sido reconocidos como esenciales para las reacciones de óxido-reducción, pero también están involucrados en otros procesos celulares como la catálisis química, la regulación, la señalización y la detección de señales intra y extra celulares. Diversos grupos de investigación han contribuido al establecimiento de las rutas bioquímicas por las que se sintetizan estos cofactores, así como a la forma en que se transportan y regulan en los diferentes organismos. Todo este conocimiento ha permitido asociar algunas enfermedades con defectos metabólicos en estas rutas de biosíntesis, así como plantear nuevas estrategias terapéuticas y algunas aplicaciones biotecnológicas.

**Palabras Clave:** Biosíntesis, centros Fe-S, cofactores, grupo hemo, nucleótidos de flavina.

## ABSTRACT

Iron-sulphur clusters, heme cofactors and flavin-nucleotides are essential for many microorganisms. There are many proteins that depend upon them to perform their biological activities. These cofactors have been recognized as essential for redox reactions and are also involved in many cellular functions such as chemical catalysis, regulation and signalling. Many groups have contributed to the establishment of the biochemical routes by which these cofactors are synthesized, transported and regulated in different organisms, all this knowledge has allowed to link defects on these routes with diseases and syndromes, as well as to propose new therapeutic strategies and biotechnological applications.

**Key Words:** Biosynthesis, iron-sulphur clusters, cofactors, heme group, flavin nucleotides.

## INTRODUCCIÓN

Muchos microorganismos crecen en presencia de glucosa y sales inorgánicas, generando energía catabólica mediante la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa. También sintetizan simultáneamente componentes universales como aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos y vitaminas, a partir de los intermediarios que se producen en el catabolismo.

Las rutas biosintéticas de estos componentes se han establecido utilizando a la bacteria *Escherichia coli* como modelo de los

procariontes y a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de los eucariontes. Por mucho tiempo se pensó que estas vías eran ubicuas entre todos los microorganismos, pero ahora se sabe que los procariontes y los eucariontes emplean rutas diferentes para sintetizar los mismos componentes, sobre todo para la biosíntesis de cofactores. Muchas proteínas dependen de cofactores para llevar a cabo su función; de manera general estos compuestos de bajo peso molecular se unen en motivos de secuencia bien definidos y evolutivamente conservados ya sea de manera covalente o no covalente. Entre los cofactores orgánicos se encuentran varios nucleótidos (flavín-mononucleótido y flavín adenín dinucleótido), vitaminas (biotina, pantotenato y folato), compuestos metalorgánicos que pueden

contener elementos metálicos como hierro y molibdeno (hemo y nitrogenasas). También existen cofactores inorgánicos, como iones metálicos  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{1+/2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{1+/2+}$  que regularmente se encuentran en sitios de unión mononucleares.

En esta revisión se abordarán las rutas de biosíntesis del grupo hemo, de los centros Hierro-Azufre y de los nucleótidos de flavina (FMN y FAD).

### GRUPO HEMO

El hierro es indispensable para la vida; funciona como un cofactor metálico en varias enzimas, que pueden o no ser hemoproteínas. Las hemoproteínas están involucradas en un amplio espectro de funciones biológicas cruciales que incluyen la unión a oxígeno (hemoglobinas), el metabolismo de oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas) y la transferencia de electrones (citocromos). Por tanto, el grupo hemo se forma en casi todos los sistemas vivos, excepto por algunos anaerobios obligados y ciertos organismos unicelulares que presentan auxotrofia por las porfirinas y/o por el grupo hemo.

Los estudios que se han hecho han llevado a pensar que el grupo hemo es solamente un grupo prostético, que puede estar o no unido covalentemente y que cumple una función biológica de acuerdo con los requerimientos celulares, pero esto sólo representa una parte de un papel mucho más amplio y complejo. Por ejemplo, se ha descrito que el hemo funge como regulador de la expresión de varios factores de transcripción<sup>1</sup>. Se le ha relacionado también con el control en canales iónicos de potasio activados por calcio<sup>2</sup> y en la regulación del ciclo circadiano<sup>3</sup>. Recientemente, se le ha adjudicado un papel preponderante en la enfermedad de Alzheimer, aunque aún no se sabe si la deficiencia del hemo puede ser una causa del síndrome o si es consecuencia de los cambios dramáticos que se suscitan con la enfermedad<sup>4</sup>.

Estructuralmente el grupo hemo está compuesto por un átomo de hierro y un anillo orgánico heterocíclico de gran tamaño denominado porfirina, es decir un tetrapirrol cíclico en el que los 4 anillos de pirrol están unidos por enlaces metileno (=CH-) y en el centro de este anillo se encuentra el átomo de hierro (Figura 1). Aunque presenta cargas negativas que le confieren un extremo polar, el grupo hemo tiene propiedades apolares y es por tanto insoluble en agua por lo que se sitúa en una cavidad hidrofóbica dentro de las proteínas. Resulta interesante el hecho de que los anillos de porfirina que tienen metal unido ya estaban presentes cuando la fotosíntesis apareció en la tierra, lo que indica que algunos organismos ya sintetizaban hemo incluso antes de que el oxígeno estuviera presente en la atmósfera terrestre<sup>5</sup>.

### BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO

En animales, hongos y procariontes de la división de las  $\alpha$ -proteobacterias el grupo hemo es sintetizado mediante 8 pasos

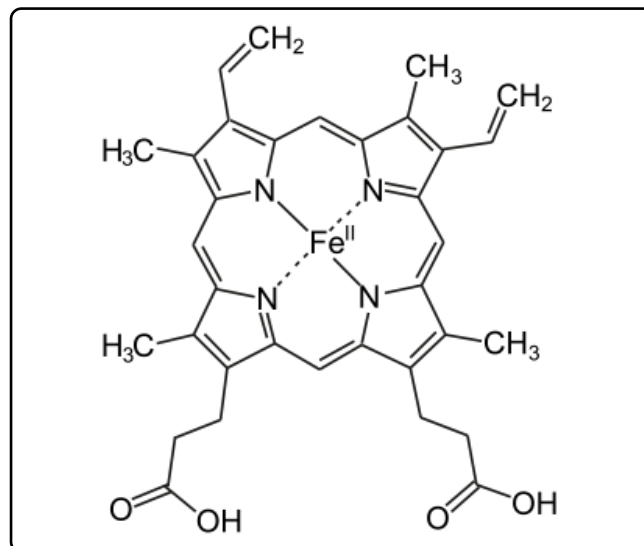


Figura 1. Estructura del grupo hemo, se pueden observar los 4 anillos pirrólicos y el átomo de hierro ferroso al centro.

enzimáticos. En eucariontes el proceso está espacialmente dividido: 4 pasos se llevan a cabo en el citoplasma y 4 en la mitocondria (Figura 2). Las porfirinas libres no cumplen una función en la célula y generalmente se producen accidentalmente como productos secundarios de la síntesis del grupo hemo. De manera normal, la biosíntesis del grupo hemo es extremadamente eficiente, con un uso casi total de los intermediarios de porfirina.

El primer paso consiste en la condensación entre la glicina y la succinil coenzima A en ácido 5 aminolevulínico (ALA). Esta reacción es catalizada por la sintasa del ácido aminolevulínico (ALAS). El precursor de la enzima es sintetizado en el citosol y dirigido a la mitocondria mediante un péptido señal que es removido posteriormente, lo que permite el plegamiento, dimerización y la adición del cofactor piridoxal fosfato. Se sabe que la mayoría de las proteínas ALAS contienen de 2 a 3 motivos (HRMs) que están involucrados en la regulación a nivel postraduccional, ya que el grupo hemo se une a ellos previniendo la translocación del precursor a la mitocondria con el concomitante resultado de una concentración menor de ALAS en la matriz mitocondrial.

Después de ser sintetizado el producto es transportado al citoplasma; la deshidratasa de ALA (ALAD) condensa 2 moléculas para formar 4 porfobilinógeno (PBG), este compuesto ya tiene el anillo pirrólico. La ALAD puede dividirse en 2 clases: zinc-dependiente, que está presente en los animales, las levaduras y las bacterias y la magnesio-dependiente presente en las plantas.

A continuación la enzima desaminasa de PBG (PBGD) toma 4 moléculas de PBG para dar lugar al precursor inestable

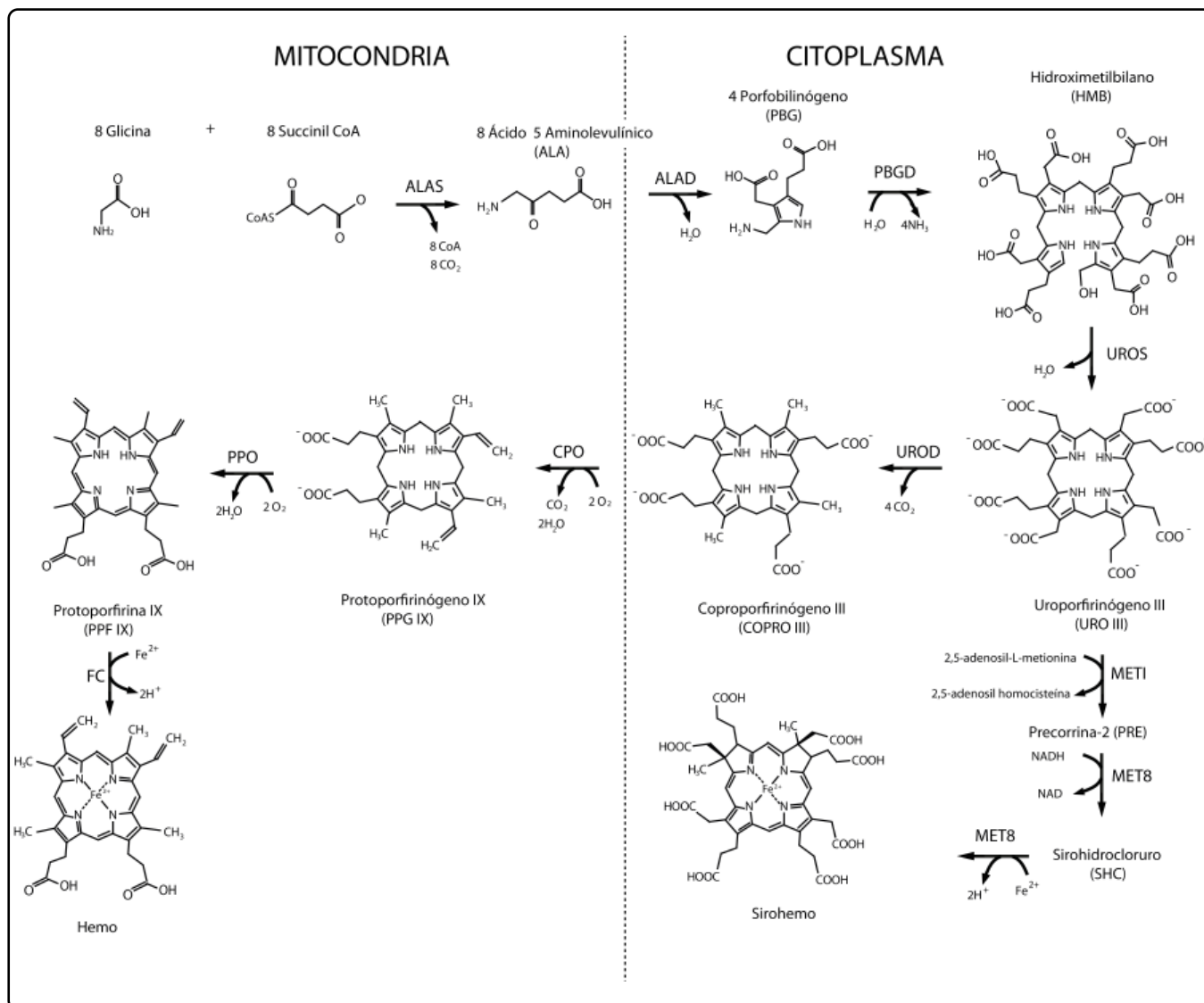


Figura 2. Ruta de biosíntesis del grupo hemo. Del lado izquierdo se muestran las reacciones que se llevan a cabo en la mitocondria y del lado derecho las que se llevan a cabo en el citoplasma. La nomenclatura es la siguiente, para las enzimas: ALAS (sintasa de ALA); ALAD (deshidratasa de ALA); PBGD (desaminasa de PBG); UROS (sintasa de URO); UROD (descarboxilasa de URO); CPO (oxidasa de COPRO III); PPO (oxidasa de PPG IX); FC (ferroquelatasa); MET1 y MET8 (transmetilasas de URO III). Modificada de Franken (2011)<sup>6</sup>.

hidroximetilbilano (HMB), es en este paso donde se produce la estructura tetrapirrólica característica del hemo. En *S. cerevisiae* este es el paso limitante en la síntesis de hemo; la expresión del gen *hem3*, que da lugar a la proteína PBGD, es constitutiva pero se reprime en presencia de fuentes de carbono fermentables y en condiciones de hipoxia<sup>7</sup>. Si bien se tiene ya una estructura tetrapirrólica, ésta difiere mucho de la del grupo hemo pues carece del átomo central de hierro ferroso y el anillo contiene sólo 8 de los 11 dobles enlaces que debe tener. Además las cadenas laterales están cargadas y dado que los grupos hemo actúan en el interior apolar de las proteínas, el carácter polar debe modificarse a uno menos polar.

La uroporfirinógeno III sintasa (UROS) cataliza la ciclización del HMB a uroporfirinógeno III (UROIII). Esta molécula es el precursor de todos los tetrapirroles, además de ser el intermediario común entre la vía de síntesis del grupo hemo y del sirohemo; este último es cofactor de las reductasas de nitrito y sulfito y se abordará posteriormente. La quinta enzima de la vía de biosíntesis del grupo hemo es la uroporfirinógeno III descarboxilasa (UROD), que cataliza la descarboxilación de 4 cadenas laterales de acetilo del uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III (COPROIII).

Con excepción de la levadura *S. cerevisiae*, el producto es transportado a la mitocondria, donde es convertido a

protoporfirinógeno IX por la coproporfirinógeno III oxidasa (CPO). Ésta es la primera reacción de la vía que requiere oxígeno para la descarboxilación oxidativa de las cadenas laterales carboxietil 2- y 4- del sustrato COPROIII, para dar lugar a 2 grupos vinilo en el protoporfirinógeno IX<sup>8</sup>. En *S. cerevisiae* la CPO está asociada a la membrana externa mitocondrial con el sitio activo orientado hacia el citosol; la diferencia entre la proteína de la levadura y la de los vertebrados es la presencia o ausencia del péptido señal.

El siguiente paso consiste en la oxidación del protoporfirinógeno con la transferencia de 6 electrones mediada por la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) para obtener protoporfirina IX (PPIX). Esta reacción dependiente de oxígeno es llevada a cabo en 3 ciclos independientes por la PPO, en cada uno se transfieren 2 electrones<sup>9</sup>. El producto final, el grupo hemo, es formado por la ferroquelatasa (FC) que cataliza la inserción de un átomo ferroso en la protoporfirina IX<sup>10</sup>.

En eucariontes la apoproteína es sintetizada en el citosol y es translocada a su destino final: la matriz mitocondrial. Esta translocación requiere energía dado que involucra la remoción de la secuencia líder en el amino terminal y el ensamblaje del centro hierro-azufre [2Fe-2S].

#### TRANSPORTE DEL HIERRO Y HEMO

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre pero su adquisición e incorporación en los sistemas biológicos es muy difícil dada la alta toxicidad del hierro ferroso y la insolubilidad del hierro férrico. A pesar de estos desafíos los organismos han desarrollado mecanismos para importar y utilizar el hierro.

El hierro es transportado de los sitios donde se absorbe y se almacena a aquellos donde es utilizado por la proteína transferrina. Esta proteína es tan importante que se le considera también parte de la maquinaria de síntesis del grupo hemo. Se ha demostrado que es la única fuente de donde la ferroquelatasa toma el hierro necesario para llevar a cabo el último paso en la síntesis del grupo hemo<sup>11</sup>. Se ha visto que humanos y ratones con transferrinemia hereditaria tienen anemia hipocrómica microcítica, esto se correlaciona con la dependencia de la ruta de síntesis de hemoglobina en el hierro proveniente de la transferrina<sup>12</sup>.

Después de la síntesis del hemo, su transporte o el de sus intermediarios es también un paso limitante en la producción de hemoproteínas. Probablemente se requiere un transporte dirigido para proveer de cantidades suficientes del grupo hemo a diferentes organelos como el retículo endoplásmico, el núcleo y los peroxisomas. Dada la naturaleza hidrofóbica y la reactividad del grupo hemo es poco probable que éste se difunda libremente en el citosol.

Aunque el campo de investigación del transporte del grupo hemo y sus intermediarios está en ciernes, se han identificado algunos transportadores en las células de mamífero: la proteína acarreadora de hemo 1 (HCP1), la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y el receptor del virus C involucrado en la leucemia felina (FLVCR)<sup>13</sup>. Además de estos transportadores se ha descrito a la subfamilia B perteneciente a la superfamilia de los transportadores ABC. El ABCB6 es el transportador del intermediario COPRO, fue localizado inicialmente en la membrana externa mitocondrial y se sabe que puede transportar con menor afinidad otras porfirinas. Se han localizado isoformas de este transportador en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi<sup>14</sup>. Defectos en este transportador han sido relacionados con el síndrome metabólico letal en niños recién nacidos<sup>15</sup>. El transportador ABCB7 se encuentra en la membrana interna mitocondrial y es esencial, ya que la interrupción del gen que lo codifica es letal. Este transportador se requiere para la maduración de las proteínas Fe-S en el citosol y para el transporte de los intermediarios de esta ruta. De manera interesante ABCB7 parece estar involucrado en la síntesis de hemo a través de una interacción con la ferroquelatasa.

Algunos microorganismos presentan también otro mecanismo para el transporte de hierro: los sideróforos, que son compuestos solubles en agua y derivados del ácido hidroxámico, cuya función es acoplarse al hierro en su estado de oxidación +3, lo que permite su transporte dentro de la célula por mecanismos de transporte activo. Algunos ejemplos de sideróforos producidos por bacterias y hongos son: ferricromo (*Ustilago sphaerogena*), enterobactina (*Escherichia coli*), enterobactina y bacillibactina (*Bacillus subtilis*), ferrioxamina B (*Streptomyces pilosus*), fusarinina C (*Fusarium roseum*), vibriobactina (*Vibrio cholerae*), azotobactina (*Azotobacter vinelandii*) y pseudobactina (*Pseudomonas B 10*).

#### RAMA DEL SIROHEMO

Como se mencionó, UROIII es un intermediario común para las vías de síntesis del grupo hemo y del sirohemo. El sirohemo es un grupo prostético similar al grupo hemo presente en las sulfito y nitrito reductasas y está involucrado en la reducción del sulfito y nitrito a sulfuro y amoniaco, respectivamente. La importancia del sirohemo se puede ejemplificar con la función de las sulfito reductasas que son indispensables para la síntesis de los aminoácidos metionina y cisteína<sup>16</sup>.

El sirohemo es sintetizado en 4 pasos a partir del UROIII; dos S-adenosil-L-metionina transmetilaciones, una deshidrogenación y una ferroquelación. En *E. coli* todas estas funciones son llevadas a cabo por la proteína cysG. En comparación, la levadura *S. cerevisiae* posee 2 enzimas; MET1p cataliza la reacción de transmetilación y MET8p que es responsable de las reacciones de deshidrogenación y ferroquelación<sup>17</sup>.

## PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON EL GRUPO HEMO

El grupo hemo está involucrado en muchos procesos esenciales en la mayoría de los organismos. Como resultado de esto, su ruta de síntesis está muy conservada (aunque con algunas modificaciones) y fuertemente regulada, debido a la naturaleza reactiva del hemo y sus intermediarios. A pesar de lo anterior los mecanismos por los que se regula no parecen estar conservados entre los eucariontes.

Se ha descrito un gran número de enfermedades relacionadas con este grupo y en varias de ellas ocurre la presencia de precursores de hemo en las heces o la orina, volviéndolas de color rojo oscuro. Existen un gran número de afectaciones hereditarias en la síntesis de porfirinas, a las que se conoce de manera general como porfirias. En total existen 7 tipos de porfirias; 4 son agudas y se han denominado así porque generalmente causan repentinos ataques de dolor abdominal que duran varios días. Las otras 3 afectan principalmente a la piel y no causan síntomas agudos en otros órganos. Todas las porfirias se deben a un defecto en alguna de las 7 enzimas de la vía de síntesis del grupo hemo.

La biosíntesis del grupo hemo requiere de manera indirecta vitamina B6, riboflavina, biotina, ácido pantoténico y ácido lipoico, así como zinc, hierro y cobre que son esenciales para la producción del succinil CoA. También se sabe que en el envejecimiento se presenta un fenómeno de hipometabolismo lo que ocasiona una disminución en los requerimientos de la ruta y a su vez cambios en la concentración del grupo hemo. Por lo anterior, se ha relacionado al hemo con enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento, tales como la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que las afectaciones en el metabolismo de hemo se traducen en decaimiento mitocondrial, estrés oxidativo y acumulación de hierro, siendo todas estas características del envejecimiento.

Las porfirinas tienen también una utilidad médica: la terapia fotodinámica es un tratamiento alternativo para el cáncer de piel,

ya que permite la eliminación selectiva de las células cancerígenas. Es una técnica no invasiva en la que se administran de manera intravenosa porfirinas que se concentran en los tumores malignos, después se hace incidir luz sobre el tumor, la luz es absorbida por las porfirinas que al activarse reaccionan con el oxígeno, produciéndose así especies reactivas de oxígeno, lo que al final se traduce en la destrucción de las células malignas.

## Centros Hierro-Azufre

Los centros Hierro-Azufre (Fe-S) son cofactores pequeños y ubicuos que representan uno de los catalizadores más antiguos en la evolución de las biomoléculas. Están involucrados en procesos bioquímicos fundamentales que incluyen fotosíntesis, regulación de la actividad enzimática, respiración mitocondrial, fijación de nitrógeno, unión y activación de sustratos, biogénesis de ribosomas, catálisis redox, replicación y reparación de ADN, regulación de la expresión genética y metabolismo de nucleótidos.

El hierro y el azufre son dos de los elementos más versátiles y cruciales en el planeta y su importancia biológica es incuestionable. Los centros Fe-S contienen hierro y azufre en diferentes relaciones molares. Los más sencillos y comunes son el rómbico [2Fe-2S] y el cúbico [4Fe-4S]; en la Figura 3 se muestran estas estructuras. Existen otros [3Fe-4S] en enzimas como la ferredoxina I en bacterias y más complejos [8Fe-7S] como el que está presente en la nitrogenasa Mo-Fe, cuyo centro se compone de hierro y molibdeno<sup>18</sup>.

En la mayoría de las proteínas hierro-azufre, el hierro se une a residuos de cisteína, aunque también las cadenas laterales de la histidina, la serina y del ácido aspártico pueden funcionar como ligandos. A pesar de que se han identificado un gran número de proteínas hierro-azufre no se ha encontrado un motivo consenso que permita predecir si una proteína puede unir un centro Fe-S. La función más común de los centros Fe-S es la transferencia de electrones basada en la propensión del hierro a cambiar entre sus estados de oxidación +2 y +3<sup>19</sup>. Dentro

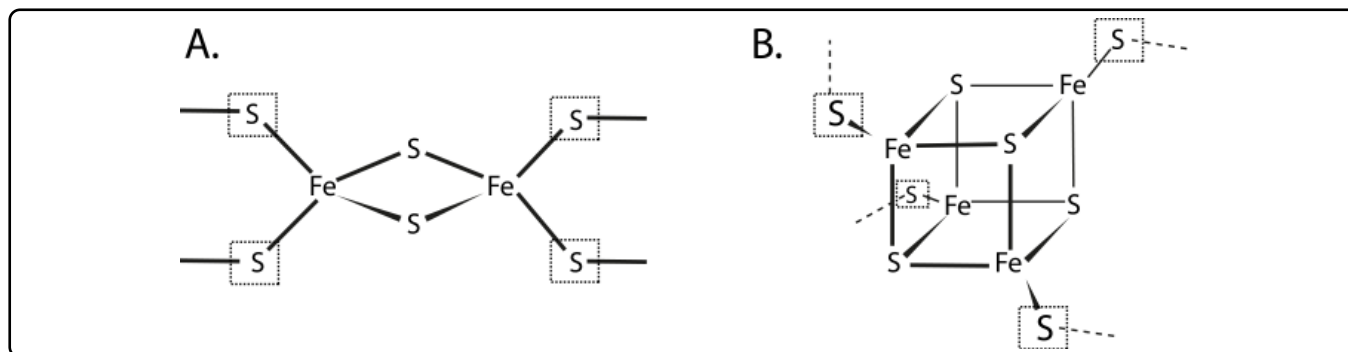


Figura 3. Representación esquemática de los centros Fe-S más comunes en proteínas. A. Rómbico y B. Cúbico. Se muestran también los átomos de azufre provenientes de un residuo de cisteína dentro de la proteína, encerrados en un cuadrado discontinuo.

de un ambiente proteico los centros Fe-S adoptan potenciales redox desde -500 mV hasta +300 mV lo que los convierte en excelentes donadores y aceptores de electrones<sup>20</sup>. Algunas proteínas de este grupo son los complejos mitocondriales I y III, el fotosistema I, las ferredoxinas e hidrogenasas.

Otra función muy estudiada de los centros Fe-S es la de la catálisis enzimática, el ejemplo clásico es la aconitasa que posee un centro cúbico [4Fe-4S] con un hierro que no está coordinado con la proteína, el hierro funciona como un ácido de Lewis para ayudar a la sustracción de una molécula de agua del citrato, que es convertido a isocitrato. Un tercer papel de los centros Fe-S es el de sensores de las condiciones ambientales o intracelulares para regular la expresión genética. Ejemplos de este tipo de proteínas son los factores de transcripción bacterianos FNR, IscR y SoxR que perciben oxígeno, centros Fe-S y superóxido, respectivamente.

### BIOSÍNTESIS DE CENTROS Fe-S

La química ha revelado que existe una gran diversidad de centros Fe-S en las proteínas, si bien la estructura de los centros Fe-S es sencilla, su biogénesis requiere complejas maquinarias proteicas y diferentes rutas para su ensamblaje. Los centros Fe-S son ensamblados a partir de hierro, asociado a proteínas transportadoras y azufre, este último proviene de residuos de cisteína. El proceso se lleva a cabo en proteínas que fungen como andamios y, posteriormente, se transfieren a las apoproteínas receptoras.

La maduración de las proteínas hierro-azufre ha sido intensamente estudiada en *E. coli* y en *A. vinelandii*; este último es un

organismo fijador de nitrógeno. Se han identificado 3 sistemas diferentes para la biogénesis de estas proteínas: el sistema de fijación del nitrógeno (NIF), encargado específicamente de la maduración de la nitrogenasa en bacterias azotófitas; los sistemas ISC (de centros Fe-S) y SUF (factor de utilización del azufre) encargados de la generación de proteínas Fe-S que cumplen funciones de mantenimiento en la célula en condiciones normales y de estrés oxidativo, respectivamente.

Durante la evolución las maquinarias ISC y SUF se transfirieron por endosimbiosis a eucariontes que poseen proteínas Fe-S en la mitocondria, citosol y núcleo<sup>21,22</sup>. El sistema ISC está presente en mitocondrias, en tanto que los plástidos albergan al sistema SUF. En el citosol y núcleo eucarionte el ensamblaje de proteínas Fe-S requiere de la acción coordinada de la maquinaria ISC de ensamblaje mitocondrial y del sistema ISC de exportación. La maduración de las proteínas Fe-S depende de la maquinaria de ensamblaje citosólica (CIA), que está presente en virtualmente todos los eucariontes.

La levadura *S. cerevisiae* ha servido como un organismo modelo para el estudio detallado de la biosíntesis de proteínas Fe-S en eucariontes<sup>23,24</sup>. A pesar de las diferencias obvias entre los sistemas de bacterias y eucariontes existen principios básicos que subyacen a la síntesis *in vivo* de los centros Fe-S y el ensamblaje en apoproteínas; esto se muestra en la Figura 4.

Los sistemas NIF, ISC, SUF y CIA tienen reglas biosintéticas en común. El proceso de biosíntesis puede dividirse en 2 pasos principales: el ensamblaje *de novo* de un centro Fe-S en una proteína de andamiaje y la transferencia del centro Fe-S de la

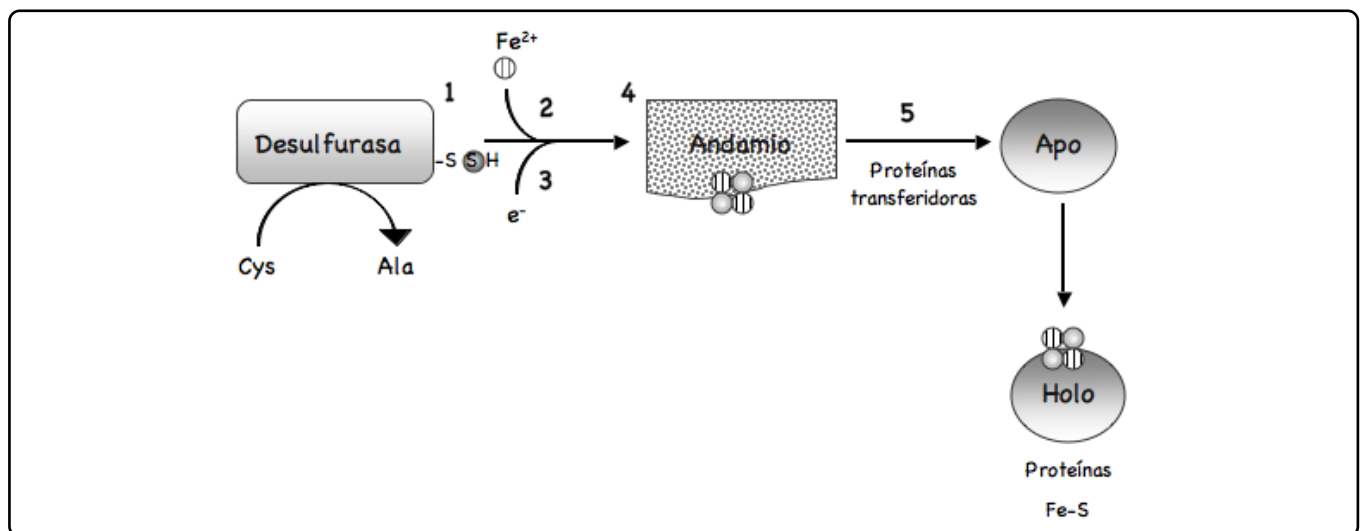


Figura 4. Esquema general del mecanismo de biosíntesis de centros Fe-S. (1) Una desulfurasa libera el azufre de un residuo de cisteína que se convierte en alanina. (2) El hierro es donado por una proteína transportadora que se une al andamio, al hierro y a la desulfurasa. (3) Se transfieren electrones para la reducción del azufre. (4) Se ensambla el centro Fe-S en una plataforma que funciona como andamio. (5) El centro ya ensamblado es transferido a la apoproteína con lo que se obtiene la forma activa de la proteína. Modificado de Lill (2009)<sup>25</sup>.

proteína andamio a la apoproteína, así como su posterior incorporación a la cadena polipeptídica. Cada uno de estos pasos involucra la participación de muchas proteínas y cofactores que ejecutan reacciones específicas que definen principios generales que son aplicables a todos los sistemas conocidos, aunque para algunos sistemas falta determinar reacciones parciales específicas a cada uno.

Los números que se muestran en la Figura 4 corresponden a los siguientes pasos:

1. Donador de azufre: una desulfurasa de cisteína (NifS, IscS o SufS) libera el azufre necesario para la formación del centro Fe-S, éste proviene de un residuo de cisteína que se transforma en alanina, la transferencia implica la formación de un intermediario persulfuro entre el azufre que se transfiere y un residuo de cisteína conservado en la desulfurasa. Este intermediario se transfiere después a residuos conservados de cisteína en proteínas auxiliares como SufE o directamente a proteínas andamio.

2. Donador de hierro: dado que es poco probable que el hierro se encuentre libre en solución, deben existir donadores de hierro que garanticen su entrega a proteínas de andamiaje. Esta función es llevada a cabo por la proteína bacteriana CyaY (Yfh1 en mitocondrias), que une al hierro, a la desulfurasa y a la proteína andamio Isu1/IscU.

3. Transferencia de electrones: se requieren electrones para llevar a cabo la reducción del elemento azufre ( $S^0$ ) proveniente de la cisteína a sulfuro ( $S^{2-}$ ) que es la forma presente en los centros Fe-S. Esta función podría recaer en la ferredoxina reductasa y la ferredoxina del sistema ISC y por el dominio de ferredoxina reductasa de NifU en el sistema NIF.

4. Proteínas de andamiaje: estas proteínas sirven como plataforma para la biosíntesis de novo de los centros Fe-S. Contienen residuos de cisteína muy conservados y unen al centro Fe-S de forma lábil, por lo que el centro puede ser transferido e integrado establemente a su proteína blanco. Los andamios más conservados son las proteínas bacterianas IscU y SufU y en los eucariontes Isu1. Las proteínas NFU y NifU en plástidos. En bacterias existen también las proteínas SufA e IscA.

5. Transferencia del centro Fe-S: existen factores específicos involucrados en la transferencia del centro Fe-S de la proteína andamio a la apoproteína. Estas proteínas pueden tener 3 funciones: inducir la disociación del centro Fe-S del andamio; garantizar la transferencia correcta y específica del centro a la apoproteína adecuada y promover el correcto ensamblaje del centro en los sitios aceptores adecuados. Entre estas proteínas se encuentran Ssq1 y Jac1, que son mitocondriales, HscA y HscB que son chaperonas del sistema bacteriano ISC y Nar1 y Cia1 de la maquinaria CIA.

### SISTEMA ISC (BACTERIAS Y MITOCONDRIAS)

El estudio experimental de la biogénesis de las proteínas Fe-S fue impulsado por la identificación del operón bacteriano *isc*<sup>26</sup>. Este descubrimiento no sólo tuvo efecto en la investigación del ensamblaje de estas proteínas en bacterias, sino que también potenció los primeros intentos por identificar la biogénesis de estas proteínas en eucariontes. Dada la relación evolutiva entre bacterias y mitocondrias, se han identificado y caracterizado funcionalmente componentes en mitocondrias que son homólogos al sistema ISC bacteriano<sup>27</sup>.

En la Figura 5 se muestra cómo se lleva a cabo este proceso: de manera inicial el centro Fe-S se ensambla de manera transitoria en la proteína de andamiaje IscU (bacterias) e Isu1 (mitocondrias), que contiene 3 residuos conservados de cisteína. Posteriormente el centro es transferido de IscU/Isu1 a la apoproteína correspondiente mediante la coordinación con residuos específicos. La primera reacción, es decir el ensamble del centro Fe-S en la proteína IscU/Isu1, depende de forma crítica de una desulfurasa de cisteína (abordada previamente) que actúa como donador del sulfuro. En bacterias esta reacción es llevada a cabo por IscS que es muy similar a NifS, que es el miembro fundador de esta familia de proteínas y está involucrada en la maduración de la nitrogenasa<sup>28</sup>.

En las bacterias, IscS es una proteína dimérica con 2 dominios; un dominio posee el sitio de unión de piridoxal fosfato y un dominio más pequeño que contiene el sitio activo que retiene transitoriamente el azufre liberado de la cisteína como persulfuro y lo transfiere a IscU. En las mitocondrias la función de desulfurasa de cisteína es llevada a cabo por el complejo de las proteínas Nfs1 (similar a IscS) e Isd11, *in vivo* este complejo se encarga de transferir el azufre de Nfs1 a Isu1 (IscS e IscU en bacterias)<sup>29,30</sup>.

Se cree que en levaduras y bacterias la proteína de unión a hierro Frataxina (Yfh1 en levadura y CyaY en bacterias) funciona como el donador del hierro al interactuar con Nfs1-Isu<sup>31,32</sup>. El ensamblaje de los centros Fe-S en Isu1 (la proteína andamio) depende de la transferencia de los electrones de la reductasa mitocondrial ferredoxina Yah1 (Fdx en bacterias), la cual recibe a los electrones de la ferredoxina-reductasa Arh1 y de NADH<sup>33</sup>.

El segundo paso en la biogénesis comprende formalmente la liberación del centro Fe-S de la proteína de andamiaje (IscU/Isu1), el cual es transferido y ensamblado en la apoproteína blanco, estos 3 pasos no han podido ser evaluados experimentalmente de manera individual pero se sabe que en bacterias el proceso es asistido por un sistema de chaperonas; HscA que establece una interacción dependiente de ATP muy específica con la proteína de andamiaje (IscU/Isu1), y HscB que induce un cambio estructural en IscU/Isu1, con lo que desestabiliza al centro Fe-S facilitando así su disociación y posterior inserción en la apoproteína.



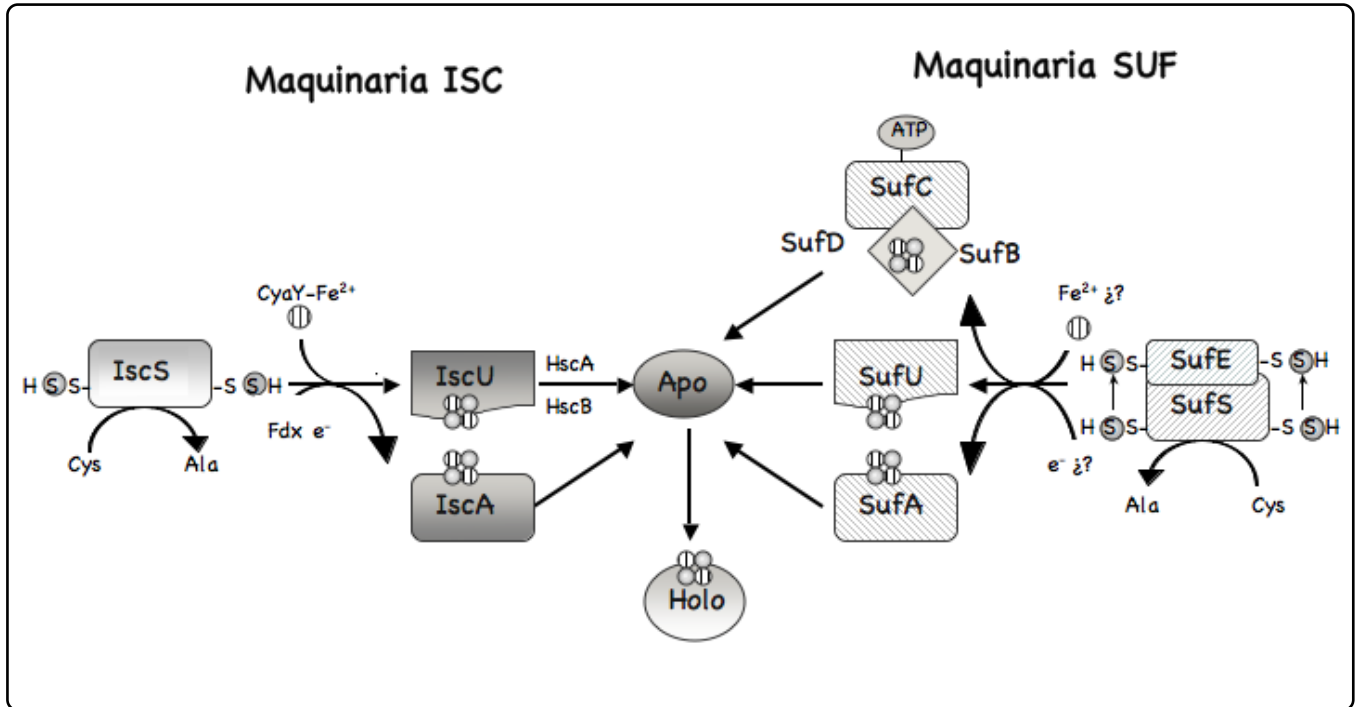


Figura 5. Modelo para la biogénesis de proteínas Fe-S en bacterias: sistema ISC y SUF. En la Tabla I se muestra la equivalencia de las proteínas en los sistemas NIF e ISC bacteriano, ISC mitocondrial y SUF bacteriano, así como de la maquinaria CIA en eucariotes. Modificado de Lill (2009)<sup>25</sup>.

El sistema ISC descrito previamente se encarga de la síntesis de la mayoría de las proteínas con centros Fe-S, pero se sabe que hay algunas proteínas cuya maduración requiere la participación de más componentes, tal es el caso de los miembros de la superfamilia Aconitasa y las proteínas SAM, en cuya biogénesis están involucradas las proteínas mitocondriales Isa1, Isa2 e Iba57<sup>34</sup>. Otra clase de proteínas particulares son las ErpA, que son esenciales para el crecimiento y están involucradas en la maduración de una proteína Fe-S de la ruta de biosíntesis de isoprenoides<sup>35</sup>.

**SISTEMA SUF (BACTERIAS Y PLÁSTIDOS)**

En *E. coli* la interrupción del operón *isc* no está asociada a un fenotipo notorio, la viabilidad celular se afecta sólo cuando se inactiva de manera simultánea al sistema SUF<sup>36</sup>. Los genes *suf* están organizados en un operón que se induce en condiciones de estrés oxidativo y cuando el hierro está en concentraciones limitadas<sup>37</sup>. La expresión de los genes de los operones *isc* y *suf* se regula de manera coordinada por las proteínas Fe-S: IscR y SufR, que funcionan como represores transcripcionales de su respectivo operón. Cuando las concentraciones de hierro son bajas o la célula está en condiciones de estrés oxidativo, la forma inactiva (apo) de IscR activa aún más al operón *suf*, lo que muestra que ambas proteínas están ligadas en la maduración eficiente de las proteínas Fe-S<sup>38</sup>.

Los componentes de la maquinaria SUF están presentes en muchos procariontes, incluyendo a las arqueas y las bacterias fotosintéticas. Estos componentes llevan a cabo algunas de las funciones previamente descritas.

El complejo SufS/SufE funge como desulfurasa de cisteína, SufS es similar a IscS o NifS pero su mecanismo es diferente: SufE estimula la actividad de SufS en más de 10 veces lo que permite que el intermediario persulfuro unido en un residuo de cisteína en SufS se transfiera a un residuo de cisteína en SufE, de donde pasa a las proteínas andamio<sup>39,40</sup>.

Aunque no se ha descrito qué proteína pudiera ser la responsable de donar el hierro, es de esperarse que exista un componente con esta actividad en la vía. Varias proteínas SUF podrían fungir como andamios para la síntesis *de novo* de centros Fe-S, aunque su papel específico debe ser clarificado. La homología funcional entre los componentes del sistema ISC y del sistema SUF se muestra en la Tabla I.

Las proteínas del sistema SUF están presentes también en plástidos, lo que refuerza que esta vía es menos sensible a altas concentraciones de oxígeno. La funcionalidad de las proteínas SufS, SufE y SufA se ha confirmado mediante experimentos *in vitro* y ensayos de complementación en bacterias, pero la evidencia directa de su función *in planta* ha sido más difícil de lograr<sup>41</sup>.

Función	NIF (bacterias)	SUF (bacterias)	ISC (bacterias)	ISC (mitocondrias)	CIA (eucariontes)
Desulfurasa de cisteína donadora de azufre	NifS	SufS-SufE	Isc S	Nfs1-Isd11	Nfs1-Isd11 mitocondriales
Andamio tipo U	NifU (N-terminal)	Suf U	Isc U	Isu1,Isu2	-
Andamio tipo A	Isc A <sup>nif</sup>	Suf A	Isc A, Erp A	Isa1,Isa2,Iba57	-
Andamio tipo NFU	NifU (C-terminal)	-	Nfu A	Nfu1	-
Andamio para el ensamblaje del centro Fe-S	-	Suf B	-	-	-
Andamio NTPasa P-loop	-	-	-	Ind1¿?	Cdf1-Nbp35
Transferencia de electrones	NifU (dominio central)	-	Fdx	Yah1-Arh1	-
Donador de hierro	-	-	CyaY	Yfh1 (frataxina)	-
Transferencia del centro a la proteína blanco	-	Suf C ¿?	HscA, HscB	Ssq1, Jacq1, Mge1, Grx5	Nar1-Cia1

Tabla I. Compilación de los componentes centrales involucrados en la biogénesis de proteínas Fe-S, se muestran las proteínas de los sistemas SUF en bacterias, ISC en bacterias, ISC en mitocondrias y CIA en eucariontes.

## BIOGÉNESIS DE PROTEÍNAS FE-S CITOSÓLICAS Y NUCLEARES

La maduración de las proteínas Fe-S tanto en el citosol como en el núcleo depende estrictamente de la maquinaria mitocondrial ISC. Se han encontrado niveles bajos de proteínas de la maquinaria ISC en el citosol de células humanas en cultivo, por lo que se ha sugerido que la maquinaria ISC produce un componente (X en la Figura 6) que aún no ha sido caracterizado pero que podría contener azufre y al ser exportado de la matriz mitocondrial al citosol estar involucrado en el proceso de maduración de las proteínas Fe-S<sup>42,43</sup>.

Se desconoce si el hierro también es exportado de la mitocondria o si proviene del citosol. La proteína Atm1 es la encargada del transporte, pertenece a la superfamilia de transportadores ABC y se encuentra en la membrana interna mitocondrial. Otro componente que se requiere para la exportación es la oxidasa de sulfhidrilo Erv1, que se localiza en el espacio intermembranal, esta proteína también cataliza la formación de puentes disulfuro durante la importación de proteínas al espacio intermembranal, mediada por Mia-40. Se ha observado que levaduras en las que el glutatión (GSH) está agotado muestran un fenotipo similar al de la falta de Atm1 o Erv1, es decir, fallas en la biogénesis de proteínas Fe-S sin que se afecte el ensamblaje, por lo que se ha establecido que Atm1, Erv1 y GSH forman a la maquinaria de exportación ISC<sup>44</sup>.

La maduración de las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares involucra a la maquinaria citosólica de ensamblaje de proteínas

Fe-S (CIA), que está compuesta de 5 proteínas, que se muestran en la Tabla I (ver también la Figura 6). Con base en estudios *in vivo* e *in vitro*, el proceso puede dividirse en 2 reacciones parciales; primero, un centro Fe-S es ensamblado transitoriamente en las NTPasas Cfd1 y Nbp35, que forman un complejo heterotetramérico y que funcionan como andamio, como se mencionó previamente, este paso requiere a la maquinaria mitocondrial ISC. Posteriormente, el centro Fe-S es transferido a las apoproteínas, este proceso es asistido por las proteínas Nar1 y Cia1, pertenecientes al sistema CIA. A su vez Cdf1 y Nbp35 participan en la maduración de Nar1, por lo que esta proteína es parte y blanco del sistema CIA, con lo que se establece un mecanismo de retroalimentación en el sistema. La holoproteína Nar1 está encargada de transferir los centros Fe-S a las apoproteínas blanco mediante la interacción con Cia1<sup>45</sup>.

Si bien el organismo modelo en el que se ha estudiado la biogénesis de centros Fe-S en eucariontes es la levadura *S. cerevisiae*, este proceso se conserva en todos los eucariontes, lo que se ha comprobado con estudios funcionales en modelos de cultivo celular, ratones, pez cebra y *Drosophila* en los que se han encontrado a las proteínas Nfs1, Isu1, frataxina, Atm1, Nbp35 y Nar1, así como genes duplicados de los sistemas ISC y CIA, lo que sugiere que en vertebrados el proceso podría ser más complejo<sup>24</sup>.

La mayoría de los componentes de los sistemas ISC y CIA son esenciales para la viabilidad de la levadura y de las células humanas; de hecho, se sabe que la biogénesis de centros Fe-S

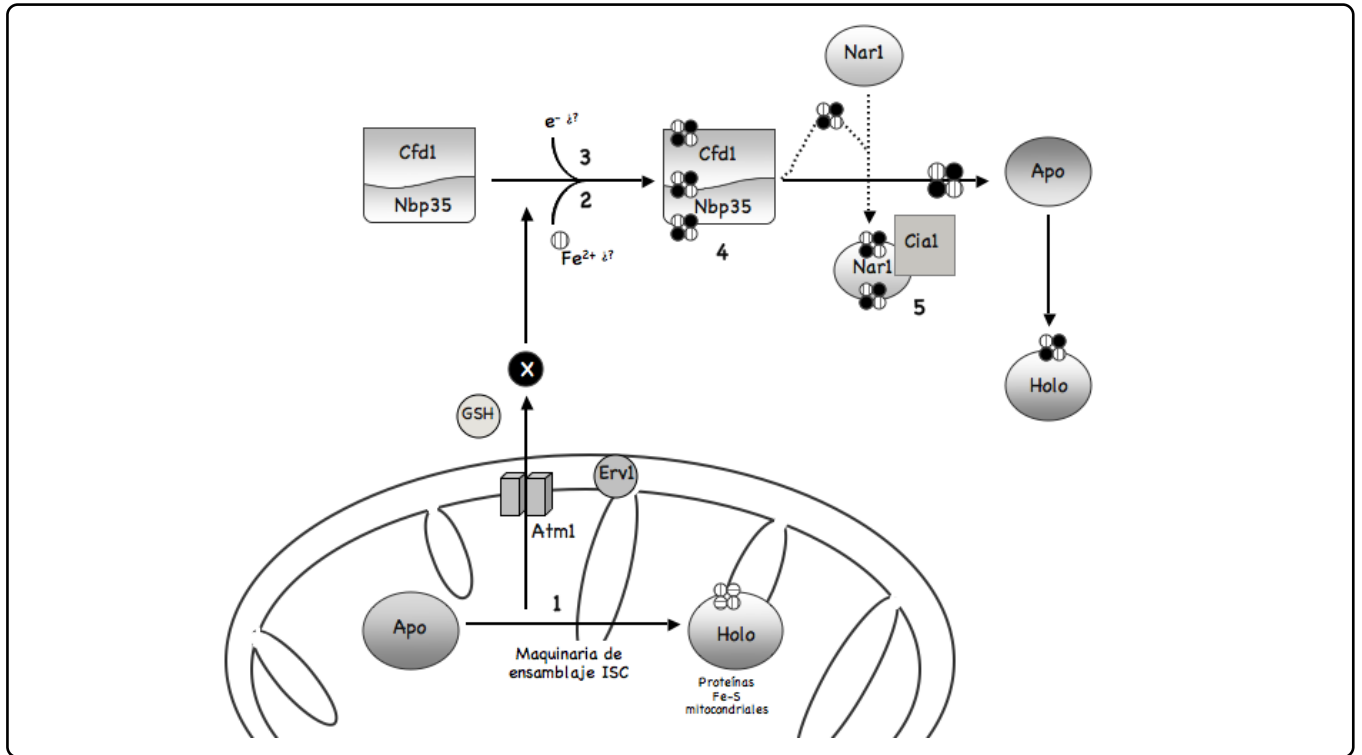


Figura 6. Funciones de la maquinaria ISC y CIA en la biogénesis de proteínas Fe-S en el citosol y núcleo de los eucariontes. Los números corresponden a los pasos descritos en la Figura 4. Modificado de Lill (2009)<sup>25</sup>.

es la única función indispensable para la viabilidad de la levadura, a diferencia de los defectos en la fosforilación oxidativa en los que las levaduras pueden crecer en medios fermentables como la glucosa. Dado que la única proteína mitocondrial en levaduras que se sabe es esencial y contiene centros Fe-S es la ferredoxina Yah1, se cree que este fenotipo se debe a que la maquinaria ISC está involucrada en la maduración de proteínas Fe-S extramitocondriales. El primer ejemplo de una proteína Fe-S esencial en el citosol es la proteína Rli1, que pertenece a la superfamilia ABC y está involucrada en el ensamblaje y exportación del núcleo del ribosoma.

Recientemente se identificaron dos proteínas Fe-S que también son esenciales: Rad3 que funciona en la reparación de ADN por escisión de nucleótidos y Pri2 que está implicada en la síntesis de moldes de ARN en la replicación del ADN<sup>46,47</sup>. Estos ejemplos son una muestra de la relación tan importante que guardan las mitocondrias con otros procesos fundamentales para la vida como es el proceso de maduración de proteínas Fe-S extra mitocondriales.

El papel tan preponderante de las mitocondrias en la biogénesis de proteínas Fe-S ha planteado la pregunta de cómo los organismos amitocondriados (*Giardia*, *Microsporidia* y *Entamoeba*), que no poseen mitocondrias canónicas llevan a cabo el ensamblaje de sus proteínas Fe-S. La información

genómica de algunos de estos organismos ha mostrado que existen homólogos de las maquinarias ISC y CIA, en tanto que los genes de otros procesos clásicos de la mitocondria como la respiración, la biosíntesis del grupo hemo o los del ciclo del ácido cítrico no se encuentran. El proceso de biogénesis de los centros Fe-S en organismos amitocondriados se lleva a cabo en un pequeño organelo de doble membrana denominado mitosoma que contiene a las chaperonas Hsp60 y Hsp70, que son utilizadas como marcadores de este organelo. Se ha aceptado que los mitosomas descienden de mitocondrias y que en el curso de la evolución fueron perdiendo las funciones que les eran indispensables por su estilo intracelular de vida. Se ha encontrado que en mitosomas de *Giardia* y *Microsporidia* está presente el sistema ISC, por lo que la biogénesis de proteínas Fe-S parece ser una función remanente de estos organelos<sup>48,49</sup>.

### ENFERMEDADES ASOCIADAS A DEFICIENCIAS DEL GRUPO Fe-S

La biogénesis de los centros Fe-S es de vital importancia en mamíferos, esto se ha documentado en varias enfermedades que están asociadas a defectos en la biogénesis de los centros Fe-S o de las proteínas Fe-S.

La falta de frataxina, el donador putativo de hierro para la formación de los centro Fe-S es la causa de la ataxia de Friedrich, que es una enfermedad neurodegenerativa asociada a defectos

en las proteínas Fe-S y a la acumulación de hierro. También se han identificado algunas enfermedades con fenotipos hematológicos, como la anemia microcítica y la protoporfiria eritropoyética, lo que resalta la conexión que existe entre la biogénesis de proteínas Fe-S y la hematopoyesis. Esto se explica por el hecho de que la biogénesis de proteínas Fe-S es crucial para la maduración de la proteína IRP1 que regula la síntesis general de proteínas involucradas en la asimilación, almacenamiento y utilización del hierro.

Otro ejemplo es la enzima ALAS2 (aminolevulinato sintasa) que cataliza el primer paso de la biosíntesis del grupo hemo en las mitocondrias (Figura 2). La traducción del ARN mensajero de esta proteína en el citosol disminuye dramáticamente cuando la concentración de hierro es baja o cuando la biogénesis de las proteínas Fe-S se ve afectada, lo que establece una relación estrecha entre la ruta de biosíntesis del grupo hemo y de la biosíntesis de proteínas Fe-S, los dos procesos que más consumen hierro en la célula.

### FLAVÍN NUCLEÓTIDOS

Los cofactores biológicos son empleados generalmente por las enzimas para facilitar una amplia gama de transformaciones bioquímicas necesarias en todos los aspectos de la vida. Algunos de estos cofactores, como la vitamina B12 y la vitamina H o biotina, catalizan un número pequeño pero importante de reacciones. Otros llevan a cabo tareas muy diversas, como la vitamina B2 o riboflavina. La riboflavina funciona como precursor de las coenzimas de flavina (Figura 7): flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD), también es precursor de otras flavinas naturales como la lumazina, deazaflavina y la roseoflavina, que no serán abordadas en esta revisión.

Se ha estimado que entre 1 y 3% de los genes en los genomas bacterianos y eucarióticos codifican para proteínas que unen a la flavina<sup>50</sup>. Las flavoproteínas se pueden definir como enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción utilizando FMN o FAD como coenzima. La entidad química responsable de la diversidad funcional de las flavinas es el anillo de isoaloxazina que existe en 3 estados redox: totalmente oxidado o quinona; reducido con un electrón o semiquinona y totalmente reducido o hidroquinona, las formas completamente reducidas se abrevian FMNH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub>. Sin embargo, el papel de la flavina no se limita a los procesos redox, aproximadamente el 10% de las enzimas dependientes de la flavina no catalizan reacciones redox, sino que están involucradas en una amplia gama de procesos biológicos como la eliminación de catecolaminas, la síntesis de proteínas, la hematopoyesis y el movimiento de cloroplastos<sup>51</sup>. Incluso el cofactor flavina es empleado como una molécula señalizadora y de detección en procesos biológicos como el fototropismo y la fijación del nitrógeno<sup>52</sup>. Está involucrada también en la detección de la luz azul en plantas, esta capacidad se ha explotado para desarrollar proteínas fluorescentes de FMN que pueden fluorescer en presencia o ausencia de oxígeno, a diferencia de la proteína verde fluorescente<sup>53,54</sup>.

### BIOSÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS DE FLAVINA

La riboflavina es sintetizada por todas las plantas y la mayoría de los microorganismos. Los animales, microorganismos procariontes y eucariontes, como *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, algunas bacterias lácticas, micoplasmas, espiroquetas, rickettsiales y protistas no pueden sintetizarla por lo que deben obtenerla de su dieta<sup>55-57</sup>. Este compuesto es manufacturado a gran escala (aproximadamente 300 toneladas al año) para ser usado como suplemento vitamínico para animales y humanos y como aditivo para la industria alimenticia<sup>58</sup>.

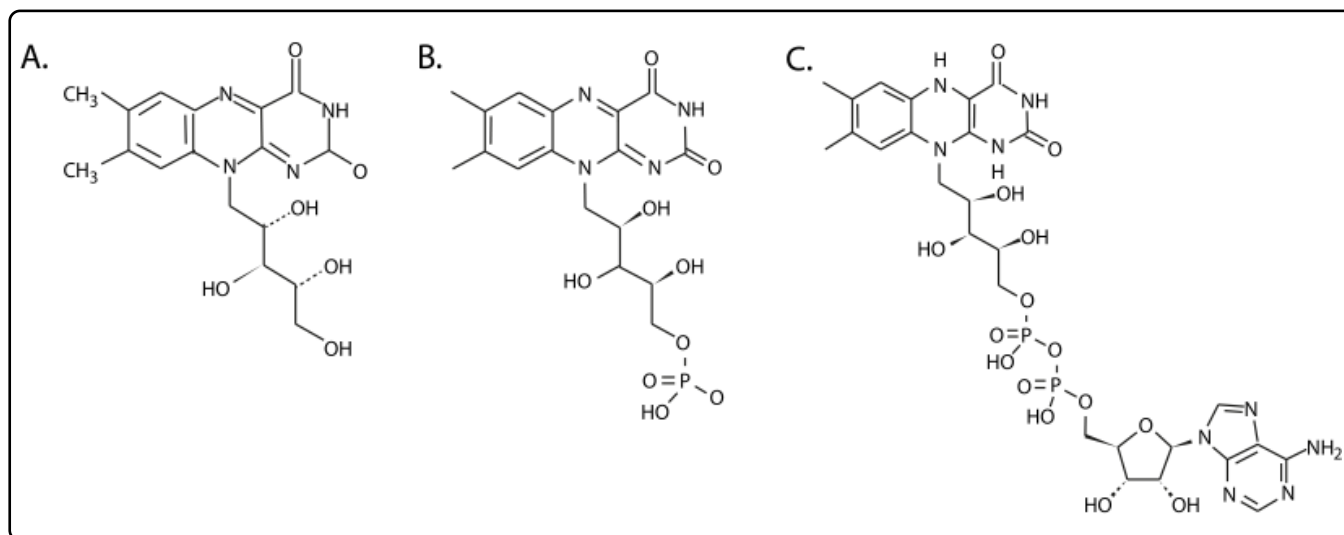


Figura 7. A. Estructura química de la riboflavina, B. FMN y C. FAD.

Las reacciones bioquímicas que dan como resultado la síntesis de las coenzimas FAD y FMN se establecieron hace muchos años a partir del trabajo de grupos de investigación en Estados Unidos, Japón, Ucrania, Rusia y Alemania<sup>59-62</sup>.

La vía de biosíntesis de riboflavina es similar pero no idéntica en bacterias, hongos y plantas; en eubacterias y plantas la vía es idéntica pero diferente a la de hongos y arqueas<sup>63-66</sup>. En microorganismos y plantas comienza con una molécula de GTP y 2 de ribulosa-5-fosfato y presenta intermediarios de pirimidina y pteridina. Los nucleótidos de flavina se sintetizan a través de 2 reacciones consecutivas a partir de riboflavina en procariontes y eucariontes (ver Figura 8).

En la Figura 8 se muestra la ruta de biosíntesis de riboflavina. En la primera reacción, la GTP ciclohidrolasa II cataliza la liberación del formato del anillo de imidazol y la liberación de pirofosfato de la cadena lateral del precursor del nucleótido lo que da como producto 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidinediona 5'-fosfato (A). La GTP ciclohidrolasa II de *Escherichia coli* es homodimérica y tiene un ión zinc en cada subunidad que participa en la apertura del anillo de imidazol del GTP. Esta enzima se relaciona con la GTP ciclohidrolasa I, que es la primera enzima de la ruta de biosíntesis del tetrahidrofolato y la tetrahidropterina<sup>67-69</sup>.

En las siguientes 2 reacciones se desamina el grupo amino en la posición 2 y se reduce la cadena lateral de ribosil a ribitol. La desaminación da como producto 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona 5'-fosfato (B) que posteriormente es reducido a 5-amino-6-ribitolamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona 5'-fosfato (C) y es catalizada por la enzima reductasa de 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidinediona 5' fosfato, que utiliza NADPH. La secuencia de estas reacciones difiere entre hongos y arqueas por una parte y plantas y bacterias por la otra<sup>63</sup>.

El producto 2,5-diamino-6-ribitolamino-4(3H)-pirimidinediona 5'-fosfato (D) se obtiene por reducción del sustrato A. Posteriormente, la diamino hidroxil fosforibosil aminopirimidín desaminasa cataliza la desaminación hidrolítica del sustrato D, lo que conlleva a la formación del producto C. En eubacterias, como *E. coli* y *B. subtilis* esta enzima es bifuncional, con un dominio de reductasa (N-terminal) y uno de desaminasa (C-terminal)<sup>70</sup>. Toda la información disponible indica que el producto principal de la vía (C) es producido a partir de (B), en eubacterias y plantas, y en hongos y arqueas a partir de (D).

La siguiente reacción que sucede es la desfosforilación de C para dar lugar al 5-amino-6-ribitolamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (E), cabe señalar que esta molécula es el precursor que se utiliza para la síntesis de lumazinas (proteínas fluorescentes de los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*). Se desconoce el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta reacción pero es poco

factible que se trate de una fosfatasa inespecífica dado que no sería capaz de discriminar entre los productos A, B y D que están fosforilados. Se cree que se trata de una fosfatasa de gran actividad que está simultáneamente involucrada en la síntesis de riboflavina y de otro compuesto desconocido<sup>71</sup>.

El precursor de pirimidina (E) es convertido a un compuesto de pteridina: 6,7-dimetil-8-ribitol lumazina (G). La conversión de un anillo de pirimidina a un compuesto de 2 anillos condensados de pteridina requiere la unión de un compuesto de 4 carbonos. Durante mucho tiempo se discutió el origen de este compuesto, hipotetizando que el donador pudiera ser diacetilo, acetoína o intermediarios de la vía de las pentosas.

Mediante experimentos utilizando a la levadura flavinogénica *Pichia guilliermondii*<sup>72</sup> se demostró que el donador es 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (F) que se produce en un paso enzimático a partir de ribulosa-5-fosfato. La enzima encargada de esta reacción es la sintasa de 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato, que se ha aislado de varios organismos y se sabe que en eubacterias y plantas está fusionada a la primera enzima de la vía, es decir a la GTP ciclohidrolasa II. En el caso de los hongos ambas funciones se encuentran en proteínas independientes<sup>64-73</sup>. La ruta de biosíntesis en arqueas es similar a la de los hongos pero tiene características únicas, como la utilización de la ciclohidrolasa III y una hidrolasa específica para llevar a cabo la primera reacción<sup>74</sup>.

El paso final de la biosíntesis de riboflavina es catalizado por la sintasa de riboflavina, que involucra la dismutación de 2 moléculas de 6,7-dimetil-8-ribitol lumazina (G) con un intercambio de 4 carbonos, por lo que se obtiene una molécula de riboflavina (H) y una de 5-amino-6-ribitolamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (E). Se han caracterizado riboflavina sintasas de varios organismos y se sabe que la enzima funciona como un homotrímero en eubacterias y plantas a diferencia de las arqueas en las que funciona como un homopentámero<sup>75,76</sup>.

El FMN se produce por la fosforilación específica de la riboflavina en la posición 5' de la cadena de ribitol en una reacción irreversible que es catalizada por la riboflavín cinasa. Se han reconocido 2 grupos de riboflavín cinasa: el que posee una enzima monofuncional y está presente en hongos, plantas, animales, arqueas y en algunas eubacterias<sup>77</sup> y el que presenta una enzima bifuncional Riboflavina cinasa/FAD sintetasa y al que pertenecen la mayoría de las eubacterias<sup>78-79</sup>.

El FAD es a su vez sintetizado por la FAD sintetasa que cataliza la transferencia del grupo adenilil del ATP al FMN. En organismos eucariontes se han encontrado sólo FAD sintetasa monofuncionales, en comparación con las bacterias en las que la enzima es parte de una proteína bifuncional (RF cinasa/FAD sintetasa)<sup>80-81</sup>. Existen 2 superfamilias de FAD sintetasa en bacterias y eucariontes, con base en los residuos implicados en

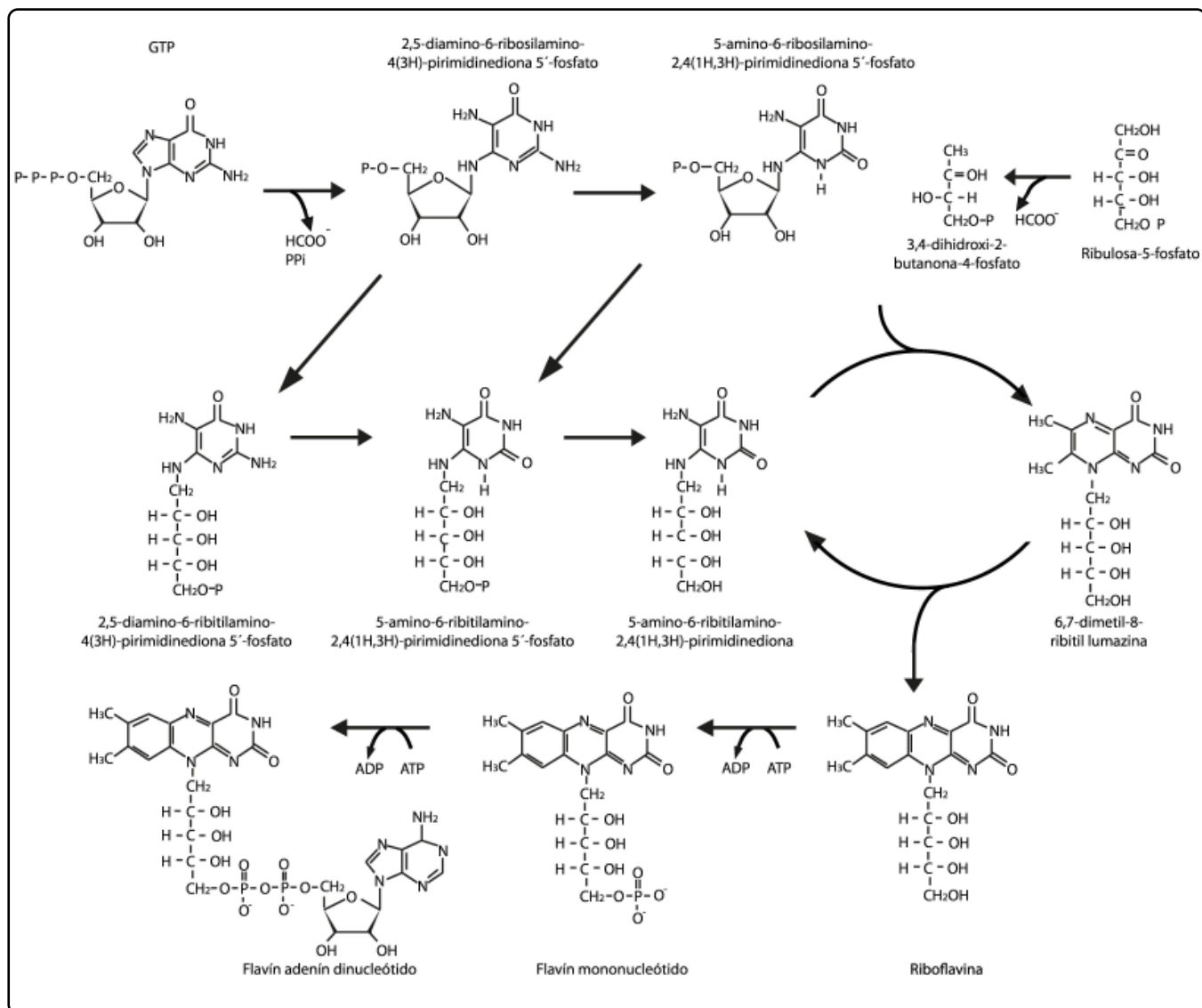


Figura 8. Ruta de biosíntesis de riboflavina, flavín mononucleótido y flavín adenín dinucleótido a partir de GTP. Modificada de Fisher & Bacher (2005)<sup>63</sup>.

la reacción. En levaduras existe sólo una enzima, que se localiza tanto en el citoplasma como en la mitocondria, mientras que en humanos y plantas se han localizado 2 isoformas. En humanos una es de localización mitocondrial y otra citoplásmica, mientras que en plantas sólo se ha encontrado en el citoplasma<sup>82</sup>.

#### TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA

La riboflavina debe penetrar en las células de los organismos que presentan auxotrofia a esta vitamina. Aunque se han aislado y caracterizado los transportadores involucrados en el transporte de riboflavina de varios organismos es importante recalcar que los mecanismos implicados en el flujo de riboflavina no han sido elucidados.

En los organismos eucariontes posiblemente existe un sistema específico para el transporte de la riboflavina y/o sus derivados a los organelos. Se ha estudiado más a fondo este fenómeno en bacterias, hongos y animales pero en arqueas y plantas no hay información disponible.

Recientemente se han clasificado muchas proteínas transportadoras de riboflavina en bacterias, todas pertenecen a una clase novedosa de transportadores modulares conocidos como ECF (Energy-Coupling Factor) que involucra principalmente a transportadores de vitaminas<sup>83</sup>. De acuerdo con la estructura modular propuesta, estos transportadores consisten de proteínas integrales de membrana que reconocen

al sustrato de manera específica y lo translocan con ayuda de otros módulos que acoplan el proceso al consumo de energía: el módulo A contiene una ATPasa (similar a la que está presente en los transportadores de la superfamilia ABC); el módulo T es una proteína transmembranal cuya función no ha sido elucidada y el módulo S, que es específico del sustrato. Los módulos A y T pueden ser compartidos entre diferentes sistemas de transporte y es el módulo S el que brinda la especificidad al sistema ECF<sup>84</sup>.

En bacterias el transporte se ha estudiado en *B. subtilis* y *Lactococcus lactis* ya que *E. coli* no transporta riboflavina exógena ni posee los genes homólogos del sistema de transporte de otras bacterias. En el caso de *B. subtilis* el transportador pertenece al sistema ECF y se ha observado que la interrupción del gen *ecfT*, que codifica para la proteína del módulo T, abate completamente el transporte de riboflavina en este microorganismo.

Se han identificado varios genes implicados en el transporte de riboflavina, éstos pertenecen a familias independientes: la superfamilia de transportadores BART (bilis/arsenito/riboflavina) que también es modular. Dentro de este tipo de transportadores existen 3 clases: la que es homóloga a ribU de *B. Subtilis*, la homóloga a ribM de *L. lactis* y la homóloga a *impX* de *Fusobacterium nucleatum*.

El transporte de riboflavina en animales ha sido estudiado en varios tejidos, así como en vesículas de membranas, especialmente de intestino delgado y colon. Los datos bioquímicos que se tienen sugieren la existencia de 2 mecanismos membranales de transporte, uno dependiente de energía y el otro de difusión facilitada cuando las concentraciones de riboflavina son muy altas. También se ha sugerido la endocitosis mediada por un receptor y se han encontrado proteínas solubles que unen riboflavina cuya función es la de almacenar riboflavina y posteriormente, liberan su contenido a la célula por endocitosis. Particularmente en el caso de la secreción de riboflavina a la leche materna, se ha identificado al transportador multidrogas denominado BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), éste se sobreexpresa durante el embarazo y la lactancia y pertenece a la superfamilia de transportadores ABC. Se ha sugerido que la secreción de riboflavina podría usarse como marcador de resistencia a múltiples drogas en cánceres malignos.

#### ENFERMEDADES ASOCIADAS CON DEFICIENCIAS EN NUCLEÓTIDOS DE FLAVINA

La fuente principal de riboflavina son los productos lácteos y la carne, también los cereales y los pescados grasos, así como algunas frutas y los vegetales de color verde oscuro. La deficiencia en esta vitamina es endémica en poblaciones que carecen de productos lácteos y cárnicos. Esta deficiencia puede contribuir a un incremento en la concentración de homocisteína en la sangre, lo que se ha asociado a un aumento en el riesgo de

enfermedades cardiovasculares, fallas metabólicas y ceguera nocturna.

En los animales la deficiencia trae como consecuencia retrasos en el crecimiento, fallas en el desarrollo y finalmente la muerte. En humanos cuya dieta es baja en riboflavina se presenta dermatitis, pérdida del cabello, opacidad de la córnea, cataratas, hemorragia de las glándulas adrenales y degeneración del riñón y el hígado. Este problema es poco común en países desarrollados pero existen grupos de riesgo como las mujeres embarazadas y lactando, niños, atletas y en pacientes que toman ciertos medicamentos<sup>85</sup>.

#### COMENTARIOS FINALES

A pesar del gran avance que se ha hecho en la determinación de las rutas de biosíntesis de los centros Fe-S, los grupos hemo y los nucleótidos de flavina (FMN y FAD), la investigación a futuro permitirá descifrar detalles estructurales, bioquímicos y biológicos de estas rutas. Estos detalles darán paso al uso del conocimiento básico generado a partir de la investigación fisiológica y en medicina molecular, así como a la aplicación biotecnológica.

Para el caso particular de la biosíntesis de centros Fe-S se podría establecer una correlación entre defectos en esta vía y fenotipos deletéreos o enfermedades no caracterizadas previamente. La resolución de estructuras tridimensionales de las proteínas de los sistemas ISC y CIA, en particular de las formas holo de los andamios Fe-S facilitará elucidar los mecanismos moleculares para el ensamble *de novo* de centros Fe-S en células *in vivo*. La combinatoria de enfoques *in vivo* e *in vitro* permitirá evaluar la relevancia fisiológica de los resultados obtenidos con proteínas aisladas, así como esclarecer la especificidad y requerimientos particulares de cada tipo de andamio. Es posible que conforme avance la investigación en este campo se encuentren proteínas moonlighting, esto es, proteínas con una función dual, no sólo dentro de la ruta de biosíntesis sino en procesos celulares independientes a ella. Por lo que es claro que un conocimiento profundo de los mecanismos moleculares de este proceso es indispensable para el desarrollo futuro de terapias para el tratamiento de enfermedades asociadas a los centros Fe-S.

En la biosíntesis del grupo hemo, si bien se ha establecido puntualmente cómo se lleva a cabo este proceso, hay algunas piezas faltantes, particularmente en el metabolismo del hierro; es crucial identificar la molécula mediadora entre la mitocondria y el citosol; determinar si esta molécula está asociada con un producto como el hemo o a la maquinaria ISC y cuál es el papel preciso que lleva a cabo la frataxina en la regulación. Si bien se requiere más investigación en este campo, es innegable que todo apunta a que la mitocondria es un sitio de intensa actividad metabólica del hierro y que los requerimientos de hierro en este organelo podrían dictar la dinámica de éste en toda la célula.

Existen también preguntas sin resolver en el campo de la investigación de la síntesis de flavinas y sus derivados; por ejemplo, se desconoce la razón por la que una parte de la riboflavina es secretada al medio. Se ha hipotetizado que pudiera ser el resultado de una regulación imprecisa; sin embargo, no puede excluirse que tenga un papel como en la inmovilización del hierro o en la defensa contra el estrés oxidativo. En estudios aplicados de flavinogénesis, la búsqueda se ha centrado en encontrar inhibidores potentes de la síntesis de riboflavina para emplearlos contra patógenos infecciosos.

El conocimiento básico y extenso de las rutas de biosíntesis de estos cofactores ha sentado las bases para entender la relación que hay entre las deficiencias en estas rutas y algunas enfermedades, así como emplear el conocimiento básico para el desarrollo de estrategias terapéuticas o de aplicaciones biotecnológicas.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los doctores: Oscar Flores Herrera (Facultad de Medicina, UNAM), Javier Plascencia de la Parra (Facultad de Química, UNAM), Marina Gavilanes Ruiz (Facultad de Química, UNAM) y Diego González Halphen (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) la lectura crítica al manuscrito y las correcciones al mismo; al Dr. Francisco Figueroa Martínez (Universidad de New Brunswick, Fredericton) por el apoyo técnico para la realización de las figuras; así como el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (donativo 128110), por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM IN203311-3) y la beca 229468 que otorgó el CONACyT para la realización de su proyecto doctoral.

### REFERENCIAS

- Sassa, S. & Nagai, T. The role of heme in gene expression. *Int. J. Hematol.* **63**, 167-178 (1996).
- Tang, X.D., Xu, R., Reynolds, M.F., Garcia, M.L., Heinemann, S.H. & Hoshi, T. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* **425**, 531-535 (2003).
- Imaizumi, S., Kay, A. & Schroeder, J.I. Circadian rhythms. Daily watch on metabolism. *Science* **318**, 1730-1731 (2007).
- Chernova, T., Smith, A.G. & Lloyd Raven, E. The regulatory role of heme in neurons. *Metallomics* **3**(10), 955-962 (2011).
- Hardison, R.C. A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacterial. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 5675-5679 (1996).
- Franken, A.C. *et al.* Heme biosynthesis and its regulation: towards understanding and improvement of heme biosynthesis in filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**(3), 447-460 (2011).
- Hoffman, M., Góra, M. & Rytka, J. Identification of rate-limiting steps in yeast heme biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**(4), 1247-1253 (2003).
- Zagorec, M. *et al.* Isolation, sequence, and regulation by oxygen of the yeast HEM13 gene coding for coproporphyrinogen oxidase. *J. Biol. Chem.* **263**(20), 9718-9724 (1998).
- Dailey, T.A. & Dailey, H.A. Identification of [2Fe-2S] clusters in microbial ferrochelatases. *J. Bacteriol.* **184**(9), 2460-2464 (2002).
- Bermúdez Moretti, M., Correa García, S & Batlle, A. Porphyrin biosynthesis intermediates are not regulating  $\delta$ -aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**(3), 946-950 (2000).
- Morgan, E.H. Transferrin biochemistry, physiology and clinical significance. *Mol. Aspects. Med.* **4**, 1-23 (1981).
- Goya, N., Miyazalo, S., Kodate, S. & Ushino, E. A family of congenital atransferrinemia. *Blood* **40**, 239-245 (1972).
- Hamza, I. Intracellular trafficking of porphyrins. *ACS Chem. Biol.* **1**(10), 627-629 (2006).
- Tsuchida, M., Emi, Y., Kida, Y. & Sakaguchi, M. Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**(2), 369-375 (2008).
- Krishnamurthy, P.C. *et al.* Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* **443**, 586-589 (2006).
- Keng, T. & Guarente, L. Constitutive expression of the yeast HEM1 gene is actually a composite of activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(24), 9113-9117 (1987).
- Leustek, T. *et al.* Siroheme biosynthesis in higher plants. Analysis of an S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **272**(5), 2744-2752 (1997).
- Kasting, J.F. & Howard, M.T. Atmospheric composition and climate on the early Earth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**, 1733-1741 (2006).
- Beinert, H., Holm, R.H. & Münck, E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-659 (1997).
- Meyer, J. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 157-170 (2008).
- Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K. & Johnson, M.K. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1112-1119 (2008).
- Fontecave, M. & Ollagnier-de-Choudens, S. Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 226-237 (2008).
- Lill, R. & Mühlenhoff, U. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 457-486 (2006).
- Lill, R. & Mühlenhoff, U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 669-700 (2008).
- Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**(7257), 831-838 (2009).
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. & Dean, D.R. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fox gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **273**, 13264-13272 (1998).
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H. & Craig, E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10206-10211 (1999).
- Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K. & Dean, D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 599-604 (2000).
- Kaiser, J.T. *et al.* Crystal structure of a NifS-like protein from



- Thermotoga maritima*: implications for iron-sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **297**, 451-464 (2000).
30. Cupp-Vickery, J.R., Urbina, H. & Vickery, L.E. Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **330**, 1049-1059 (2003).
  31. Gerber, J., Mühlhoff, U. & Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906-911 (2003).
  32. Bencze, K.Z. *et al.* The structure and function of frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 269-291 (2006).
  33. Mühlhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. & Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **22**, 4815-4825 (2003).
  34. Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R. & Mühlhoff, U. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1851-1861 (2008).
  35. Loiseau, L. *et al.* ErpA, an iron sulfur (Fe S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13626-13631 (2007).
  36. Takahashi, Y. & Tokumoto, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277**, 28380-28383 (2002).
  37. Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the isc and suf operons in *Escherichia coli* with the nifSU-like operon from *Helicobacter pylori*. *J. Biochem.* **136**, 199-209 (2004).
  38. Ayala-Castro, C., Saini, A. & Outten, F. W. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 110-125 (2008).
  39. Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M. & Storz, G. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45713-45719 (2003).
  40. Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. & Barras, F. Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.* **278**, 38352-38359 (2003).
  41. Xu, X.M. & Moller, S.G. Iron-sulfur cluster biogenesis systems and their crosstalk. *Chem. Bio. Chem.* **9**, 2355-2362 (2008).
  42. Rouault, T.A. & Tong, W.H. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 345-351 (2005).
  43. Rouault, T.A. & Tong, W.H. Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet.* **24**, 398-407 (2008).
  44. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are required for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981-3989 (1999).
  45. Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. & Walden, W.E. A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J.* **22**, 4826-4835 (2003).
  46. Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W.J., Stark, M.J. & White, M.F. The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol. Cell.* **23**, 801-808 (2006).
  47. Kispal, G. *et al.* Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J.* **24**, 589-598 (2005).
  48. Tovar, J. *et al.* Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**, 172-176 (2003).
  49. Goldberg, A.V. *et al.* Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* **452**, 624-628 (2008).
  50. De Colibus, L. & Mattevi, A. New frontiers in structural flavoenzymology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 722-728 (2006).
  51. Haupt, W. Chloroplast movement: from phenomenology to molecular biology. *Prog. Bot.* **60**, 3-35 (1999).
  52. Briggs, W.R. & Christie, J.M. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **7**, 204-210 (2002).
  53. Drepper, T. *et al.* Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat. Biotechnol.* **25**, 443-445 (2007).
  54. Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K.E., Ernst, J.F. Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **8**, 913-915 (2009).
  55. Fraga, A.A. & Reddy, C.A. Nutritional requirements of *Corynebacterium pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 334-340 (1982).
  56. Siddiqi, R. & Khan, M.A. Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* **253**, 225-235 (1982).
  57. Terrade, N. & Mira de Orduña, R. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. Food Microbiol.* **133**, 8-13 (2009).
  58. Stahmann, K.P., Revuelta, J.L. & Seulberger, H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**(5), 509-516 (2000).
  59. Katagiri, H., Yamada, H. & Imai, K. Biosynthesis of flavin coenzymes by microorganisms. II. Enzymatic synthesis of flavin adenine dinucleotide in *Escherichia coli*. *J. Vitaminol.* **5**, 307-311 (1959).
  60. Kearney, E.B. & England, S. The enzymatic phosphorylation of riboflavin. *J. Biol. Chem.* **193**, 821-834 (1951).
  61. Kobayashi, T. & Suzue, T. Flavin adenine dinucleotide-synthesizing enzyme in *Eremothecium ashbyii*. *J. Vitaminol.* **7**, 42-47 (1961).
  62. Schrecker, A.W. & Kornberg, A. Reversible enzymatic synthesis of flavin-adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* **182**, 795-803 (1950).
  63. Fischer, M. & Bacher, A. Biosynthesis of flavocoenzymes. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 324-350 (2005).
  64. Fischer, M. & Bacher, A. Biosynthesis of vitamin B2 in plants. *Physiol. Plant.* **126**, 304-318 (2006).
  65. Fischer, M. & Bacher, A. Biosynthesis of vitamin B2: structure and mechanism of riboflavin synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 252-265 (2008).
  66. Fischer, M. & Bacher, A. Riboflavin biosynthesis, p. 3-36. In Mander, L. & Liu, H.W. (eds.). *Comprehensive natural products. II. Chemistry and biology*, vol. 7. Cofactors (Elsevier, Philadelphia, PA. 2010).
  67. Bracher, A., Eberhardt, D., Fischer, M., Kis, K. & Richter, G. Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 153-167 (2000).
  68. Bracher, A., Schramek, N. & Bacher, A. Biosynthesis of pteridines. Stopped-flow kinetic analysis of GTP cyclohydrolase I. *Biochemistry* **40**(26), 7896-7902 (2001).
  69. Schramek, N.A. *et al.* Reaction mechanism of GTP cyclohydrolase

- I: single turnover experiments using a kinetically competent reaction intermediate. *Mol. Biol.* **316**(3), 829-837 (2002).
70. Richter, G. *et al.* Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 2022-2028 (1997).
71. Perkins, J. B. *et al.* Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 8-18 (1999).
72. Logvinenko, E.M., Shavlovskii, G.M., Zakalskii, A.E. & Zakhodylo, I.V. Biosynthesis of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine in the extracts of the yeast *Pichia guilliermondii*. *Biokhimiia* **47**, 931-936 (1982).
73. Herz, S., Eberhardt, S. & Bacher, A. Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* **53**, 723-731 (2000).
74. Graupner, M., Xu, H. & White, R.H. The pyrimidine nucleotide reductase step in riboflavin and F420 biosynthesis in Archaea proceeds by the eukaryotic route to riboflavin. *J. Bacteriol.* **184**, 1952-1957 (2002).
75. Fischer, M. *et al.* Evolution of vitamin B2 biosynthesis. A novel class of riboflavin synthase in Archaea. *J. Mol. Biol.* **343** (1), 267-278 (2004).
76. Ramsperger, A. *et al.* Crystal structure of an archaeal pentameric riboflavin synthase in complex with a substrate analog inhibitor: stereochemical implications. *J. Biol. Chem.* **281**, 1224-1232 (2006).
77. Mack, M., van Loon, A.P. & Hohmann, H.P. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC. *J. Bacteriol.* **180**(4), 950-955 (1998).
78. Manstein, D.J. & Pai, E.F. Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Biol. Chem.* **261**, 16169-16173 (1986).
79. Nakagawa, S. *et al.* Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 694-702 (1995).
80. Frago, S., Martínez-Júlvez, M., Serrano, A. & Medina, M. Structural analysis of FAD synthetase from *Corynebacterium ammoniagenes*. *BMC Microbiol.* **8**, 160-176 (2008).
81. Frago, S., Velázquez-Campoy, A. & Medina, M. The puzzle of ligand binding to *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase. *J. Biol. Chem.* **284**, 6610-6619 (2009).
82. Huerta, C., Borek, D., Machius, M., Grishin, N.V. & Zhang, H. Structure and mechanism of a eukaryotic FMN adenylyltransferase. *J. Mol. Biol.* **389**, 388-400 (2009).
83. Rodionov, D.A. *et al.* A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J. Bacteriol.* **191**, 42-51 (2009).
84. Henderson, G.B., Zevely, E.M. & Huenekens, G. M. Coupling of energy to folate transport in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **139**, 552-559 (1979).
85. Foraker, A.B., Khantwal, C.M. & Swaan, P.W. Current perspectives in cellular uptake and trafficking of riboflavin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1467-1483 (2003).