

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Febrero, 2007

Tesis Doctoral:

**“Localización de la proteína inhibidora en la estructura cuaternaria de la  
ATP sintasa mitocondrial monomérica y dimérica”**

Alumno: Fernando Minauro Sanmiguel  
Doctorado en Ciencias Biomédicas (IFC-INC)

Tutor. Dr. José de Jesús García Trejo



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| Resumen   | 4  |
| Abstract  | 6  |
| Abreviaturas  | 8  |
| 1. Introducción   | 9  |
| 1.1 La ATP sintasa ( $F_1F_0$ )   | 11 |
| 1.2 La proteína inhibidora ( $IF_1$ )   | 16 |
| 1.3 Los supercomplejos  | 20 |
| 1.4 Organización de los respirosomas  | 22 |
| 1.5 La $F_1F_0$ dimérica  | 23 |
| 1.5.1 El sintasoma  | 23 |
| 1.5.2 La ATP sintasa dimérica   | 24 |
| 2. Objetivos  | 26 |
| 3. Material y Métodos   | 26 |
| 3.1 Localización de $IF_1$  | 26 |
| 3.1.1 Entrecruzamiento con Ditiobis- succinimidil propionato (DSP)                        | 26 |
| 3.1.2 Electroforesis  | 27 |
| 3.1.3 Ensayos de inmunodetección  | 27 |
| 3.1.4 Inmunoprecipitación de la ATP-sintasa   | 28 |
| 3.1.5 Modificación química con 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina (CPM) | 28 |
| 3.2 Oligomerización de $F_1F_0$   | 29 |
| 3.2.1 Extracción mitocondrial con digitonina  | 29 |
| 3.2.2 Purificación de la ATP sintasa dimérica   | 29 |
| 3.3.3 Zimogramas  | 30 |
| 3.3.4 Microscopía electrónica   | 30 |
| 3.3.5 Otras técnicas  | 31 |
| 4. Resultados   | 31 |
| 4.1 Visualización de los productos de entrecruzamiento de $F_1I$ -DSP                     | 32 |
| 4.2 Identificación de los productos de entrecruzamiento                                   | 32 |
| 4.3 Entrecruzamiento de $F_1F_0$ -I con DSP   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 4.4 Entrecruzamientos de $F_1F_0$ con $IF_1$ | 39 |
| 4.5 Los Dímeros de $F_1F_0$                  | 42 |
| 4.6 Extracción de dímeros                    | 42 |
| 4.7 Microscopia Electrónica                  | 44 |
| 5. Discusión.                                | 48 |
| 6. Conclusiones                              | 59 |
| 7. Referencias                               | 60 |
| 8. Apéndice 1. Artículos de primer autor     | 72 |

Cross-linking of the endogenous inhibitor protein with rotor ( $\gamma,\epsilon$ ) and stator ( $\alpha$ ) subunits of mitochondrial ATP synthase. **Minauro-Sanmiguel F., Bravo C., y García J.J.** (2002) J. Bioenerg. Biomembr. 34: 433-443 73

Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel  $F_0$  bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. **Minauro-Sanmiguel F., Wilkens S., y García J.J.** (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:12356-12358 83

|   |    |
|---|----|
| 8.1 Apéndice 2. Artículos de autor secundarios relacionados con esta tesis. | 84 |
|---|----|

Overexpression of the inhibitor protein  $IF(1)$  in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial  $F_1F_0$  ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. **Bravo C., Minauro-Sanmiguel F., Morales-Ríos E., Rodríguez-Zabala J.S. y García, J.J.** (2004) J. Bioenerg. Biomembr. 36:257-264

## Resumen

La ATP sintasa se compone de dos porciones: una soluble ( $F_1$ ), donde tiene lugar la catálisis, y otra membranal ( $F_0$ ) que forma un canal de protones. La síntesis del ATP está acoplada al gradiente de protones a través de un mecanismo rotacional; en este proceso, las subunidades del rotor inducen cambios conformacionales en los sitios catalíticos de la enzima, localizados en la parte  $F_1$  asociada al estator.

La enzima puede también funcionar como ATPasa. En el complejo  $F_1F_0$  mitocondrial existe la proteína inhibidora ( $IF_1$ ), una subunidad reguladora (Pullman & Monroy 1963, J. Biol. Chem. 238:3762-3769) que inhibe la hidrólisis del ATP. En este trabajo buscamos, por medio del entrecruzamiento con Ditiobis- succinimidil propionato (DSP), la localización de esta proteína en la estructura cuaternaria de la enzima. Los experimentos se realizaron con la  $IF_1$  endógena de la porción soluble purificada ( $F_1$ ), y se reprodujeron en partículas submitocondriales para corroborar su existencia en el complejo entero ( $F_1F_0$ ).

Los resultados se obtuvieron por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en dos dimensiones, ensayos de Western Blot, inmunoprecipitación y modificación química con una sonda fluorescente. Se encontró que la  $IF_1$  puede entrecruzar con las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  del rotor, lo que muestra que la proximidad entre estas subunidades es de menos de 12 Å, una distancia menor a las reportadas anteriormente. Con base en estos y otros datos se generó un modelo estructural del posible acomodo del dominio N-terminal inhibitorio de la  $IF_1$  en la ATPasa  $F_1$ , para esto utilizamos las estructuras cristalográficas individuales. El modelo indica que el mecanismo inhibitorio de la  $IF_1$  involucra el bloqueo del giro del rotor en la región del cuello central, formado por las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ . Este modelo plantea un mecanismo novedoso y complementario al propuesto anteriormente.

En la última parte de este trabajo analizamos la estructura cuaternaria de la ATP-sintasa dimérica por microscopía electrónica. La dimerización está involucrada con la biogénesis de las crestas mitocondriales. Aunque hay varios trabajos sobre la estructura dimérica, hasta la aparición de éste no se conocía la estructura del complejo  $F_1F_0$  dimérico. Los complejos diméricos se purificaron en gradientes de glicerol a partir de extractos mitocondriales obtenidos con digitonina. La identidad de los complejos se

determinó por electroforesis nativa en geles azules (BN-PAGE), SDS-PAGE en dos dimensiones y por tinción de la actividad de ATPasa. Los resultados muestran que los monómeros se asocian de forma angular, lo que produce una geometría cónica esencial para la formación de las crestas mitocondriales. Por otra parte, se encontraron dos estructuras puente no descritas en el monómero de la enzima. Una de estas estructuras se encuentra en  $F_0$  del lado del espacio intermembranal, y la otra conecta las porciones de  $F_1$ . Aunque la identidad de las subunidades que forman estas estructuras no está definida, la que se encuentra en  $F_1$  tiene características que la relacionan con la  $IF_1$ .

## Abstract

The ATP synthase is a complex composed by two portions, a soluble subcomplex called  $F_1$ , where catalysis occurs, and a membranous part known as  $F_0$  that forms a proton channel. The ATP synthesis reaction is coupled to the proton gradient through a rotational mechanism. In this process, the rotor subunits induce conformational changes on the catalytic sites of the enzyme, localized in the  $F_1$  part associated to the stator.

This enzyme can also work as an ATPase. The mitochondrial  $F_1F_0$  complex contains the inhibitor protein ( $IF_1$ ), a regulatory subunit that inhibits ATPase activity (Pullman & Monroy 1963, J.Biol. Chem. 238:3762-3769). In this work we looked for the  $IF_1$  location by Di thiobis-succinimidil propionate (DSP) cross-linking on the ATP synthase structure. The experiments were carried out with the endogenous  $IF_1$  of the purified  $F_1$  and also in the whole complex of submitochondrial particles. The results were analyzed by 2D SDS PAGE, Western blot assays, immunoprecipitation and fluorescent labeling. It was found that  $IF_1$  lies at a proximity  $\leq 12 \text{ \AA}$  from the  $\gamma$  and  $\epsilon$  rotor subunits, suggesting a possible role of  $IF_1$  on the control of the rotational mechanism, a mechanism different from the previously suggested.

On the basis of these and other structural data, a model was constructed on the putative location of the N-terminal inhibitory  $IF_1$  domain on the  $F_1$ -ATPase by fitting their individual crystallographic structures. The model shows that the inhibitory mechanism of  $IF_1$  involves the blockade of rotor gyration at the central stalk region formed by  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits. This is a novel mechanism that is complementary to that proposed previously.

In the last part of this work we resolved the quaternary structure of the dimeric ATP synthase by electron microscopy. Dimerization is involved on mitochondrial cristae biogenesis. Although there are some well defined dimer-specific subunits, the overall dimeric structure was unknown until this work was published.  $F_1F_0$  Dimeric complexes were purified from mitochondrial extracts made with digitonin and loaded into glycerol gradients. The dimeric complexes were resolved by BN PAGE, 2D-SDS PAGE, and activity staining. Structural analyses were made by transmission electron microscopy and negatively stained samples. The results show that the monomers are associated in an angular fashion that forms a conic shape, and works as a building block for mitochondrial cristae. We also found two structures that lack the monomeric complex. These structures

are bridge-like proteins and connect both  $F_0$  and  $F_1$  monomeric portions. Although the bridging subunit identities are unknown, the one at the  $F_1$  side has some features that resemble  $IF_1$ .



## **Abreviaturas.**

ATP. Adenosín tri-fosfato.

BCA. Acido bicinconico.

BN-PAGE. Sigla en inglés de electroforesis nativa en geles azules de poli-acrilamida.

CAPS. Acido 3-(ciclohexilamino)-1- propanosulfónico.

CPM. 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina

DCCD. Dicyclohexilcarbodiimida

DSP. Di tiobis- succinimidil propionato.

DTT. Ditiotreitól

HRP. Siglas en inglés de peroxidasa de rábano.

ME. Microscopía Electrónica.

NMR. Siglas en inglés de Resonancia Magnética Nuclear.

PAGE-SDS. Siglas en inglés de Electroforesis en Geles de Poli-Acrilamida con SDS.

PSM. Partículas Submitocondriales.

SDS. Dodecil- Sulfato de Sodio.

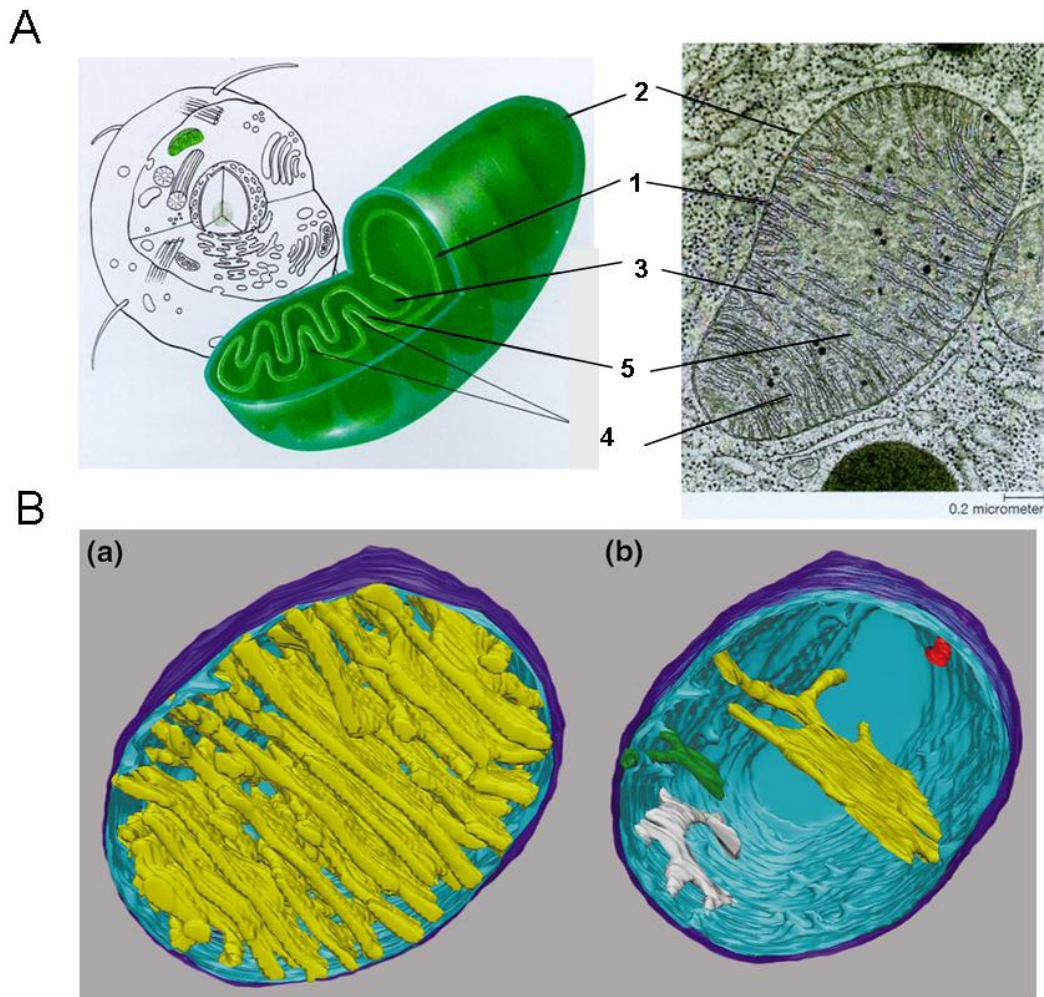
SHEA. Sefarosa hexil amonio.

## 1. Introducción

La célula es la mínima unidad que puede realizar las funciones vitales como la nutrición, la comunicación, la reproducción, etc. Hay células que son organismos en sí y otras que forman parte de un organismo o estructura más grande, en donde se pueden encontrar diferentes tipos celulares. El aporte energético que se requiere para la síntesis de muchos compuestos y/o metabolitos necesarios para la célula proviene principalmente de la hidrólisis del ATP, una molécula de alta energía que alimenta todos estos procesos por lo que a su vez se requiere de su síntesis continua.

En las células eucariontes la producción de ATP se lleva a cabo en las mitocondrias y en los cloroplastos. En este trabajo analizamos a la ATP sintasa que se encuentra en las mitocondrias del corazón de bovino. En general, la mitocondria es un organelo de forma elipsoide y del tamaño de una bacteria (aprox.  $1 \times 2 \mu\text{m}$ ) que funciona como una central energética (Fig.1). Esta estructura está compuesta por un sistema membranoso complejo que presenta dos tipos membranales: una membrana externa que envuelve a otra, la membrana interna, la cual se pliega sobre sí misma y forma las crestas mitocondriales (Hackenbrock, 1966). Este sistema membranal define también dos compartimentos: la matriz mitocondrial, que es limitada por la membrana interna, contiene enzimas del metabolismo intermedio y el genoma mitocondrial; y el espacio intermembranal, el cual es limitado por las membranas externa e interna y tiene una composición similar al citosol. En este espacio intermembranal es donde se acumulan los protones ( $\text{H}^+$ ) que, al pasar hacia la matriz mitocondrial por el canal  $\text{F}_0$ , impulsan la actividad de "ATP sintasa" en la porción  $\text{F}_1$  de esta enzima. La definición de este sistema se complica si se considera que la membrana interna es muy versátil. Las crestas mitocondriales son estructuras especializadas bien caracterizadas (Frey & Manella 2000) que están integradas a la membrana interna y pueden adoptar varias formas que varían con respecto al estado metabólico y/o fisiológico de las mitocondrias (Hackenbrock 1966); a pesar de que el espacio que se crea en estas podría definirse separadamente, se considera parte del espacio intermembranal.

La ATP sintasa ( $\text{F}_1\text{F}_0$ ) (Fig.2) lleva a cabo la síntesis de ATP en las crestas mitocondriales (Gilkerson *et al.*, 2003) durante la última etapa de la fosforilación oxidativa. Para que



**Figura 1. Estructura de la mitocondria.** A) La mitocondria es el organelo donde se lleva a cabo el metabolismo aeróbico; comúnmente se le denomina como la central energética de la célula. Una mitocondria tiene las dimensiones de una bacteria y tiene una estructura compleja, que incluye dos membranas claramente diferenciadas: La membrana interna (1), que esta plegada en crestas mitocondriales (4), es rodeada por una membrana externa lisa (2) que envuelve y delimita a todo el organelo. Este sistema de membranas separa dos espacios: El espacio intermembranar delimitado por las dos membranas (3), y la matriz mitocondrial (5) delimitada únicamente por la membrana interna. La síntesis de ATP ocurre en la cara interna de la membrana interna, hacia la matriz mitocondrial. B) Recientemente se mostró por tomografía electrónica, una técnica para la obtención de imágenes tridimensionales, que la forma y número de crestas mitocondriales varía con respecto al origen y estado fisiológico (a). La visualización de crestas individuales muestra que su estructura puede variar de tubular a otra más compleja y de forma lamelar (B, b) (Tomado de Frey & Manella 2000)

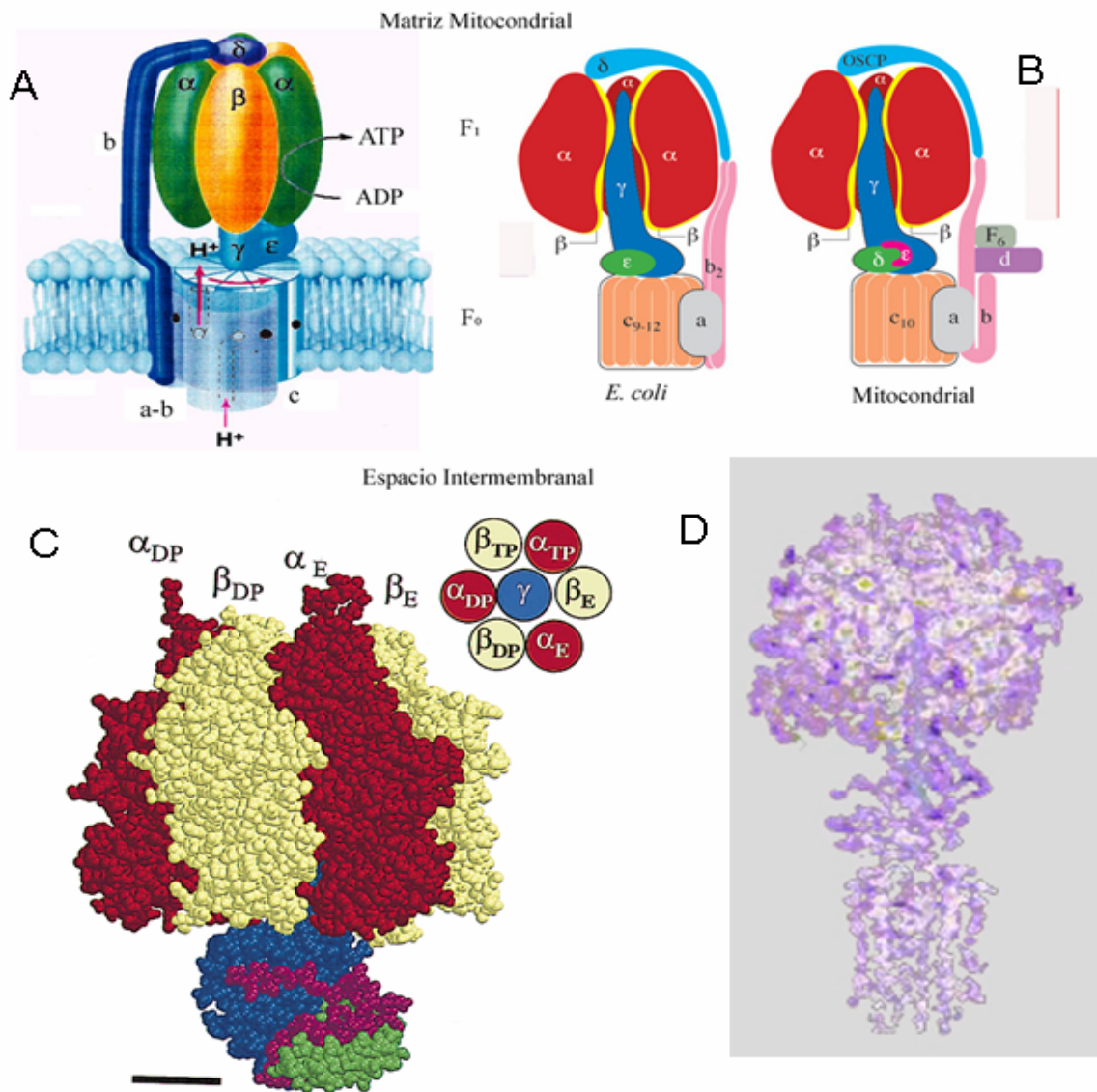
ocurra la síntesis de ATP se requiere del gradiente electroquímico generado durante la transferencia de electrones a través de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En este proceso se oxidan moléculas (provenientes principalmente del ciclo de Krebs) y se liberan iones  $H^+$  al espacio intermembranal, donde se acumulan y forman un gradiente electroquímico positivo con respecto a la matriz mitocondrial. Durante la síntesis de ATP los  $H^+$  se reincorporan a la matriz mitocondrial. Este proceso es optimizado por la cantidad y la forma de las crestas mitocondriales. Además, como se verá más adelante, la formación de las crestas mitocondriales depende en gran medida del estado oligomérico de la  $F_1F_0$  (Paumard *et al.*, 2002).

### **1.1 La ATP sintasa ( $F_1F_0$ ).**

La  $F_1F_0$  es una enzima que está formada de diferentes subunidades que varían dependiendo de la fuente de extracción. El complejo entero contiene de 8 a 17 subunidades que se encuentran distribuidas en una estructura bipartita (Fig. 2) compuesta de una porción hidrofílica ( $F_1$ ) expuesta a la matriz mitocondrial (o en bacterias al citoplasma) y otra hidrofóbica insertada en la membrana ( $F_0$ ). La síntesis de ATP se lleva a cabo en el sector  $F_1$  (compuesto esencialmente por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ ) que debe estar acoplado a la porción  $F_0$  (subunidades a, b, y c esencialmente) donde se encuentra el canal de protones (Fig. 2), por lo que existe una relación directa entre el bombeo de protones y la síntesis de ATP; de hecho, cuando el gradiente electroquímico se colapsa total o parcialmente, la  $F_1F_0$  puede funcionar como ATPasa.

La estructura molecular de  $F_1F_0$  solo se conoce parcialmente. Hasta ahora sólo se dispone de una estructura completa resuelta por microscopía electrónica (Stock *et al.*, 1999), sin embargo, se han obtenido cristales de varios subcomplejos (Fig.2). Dado que  $F_1$  es soluble, es la porción de la enzima mejor conocida y existe una gran cantidad de formas cristalizadas disponibles. Esta porción está compuesta por una cabeza hexamérica formada por tres subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$  en un arreglo alternado similar al de los gajos de una naranja (Fig.2) que, rodean a un tallo central formado por las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ ; la enzima de bovino presenta además la subunidad  $\delta$ .

Dado que  $F_0$  es una porción de membrana su estructura ha sido más difícil de obtener, hasta ahora solo existe una estructura cristalográfica a 2.4 Å de resolución (Meier *et al.*,

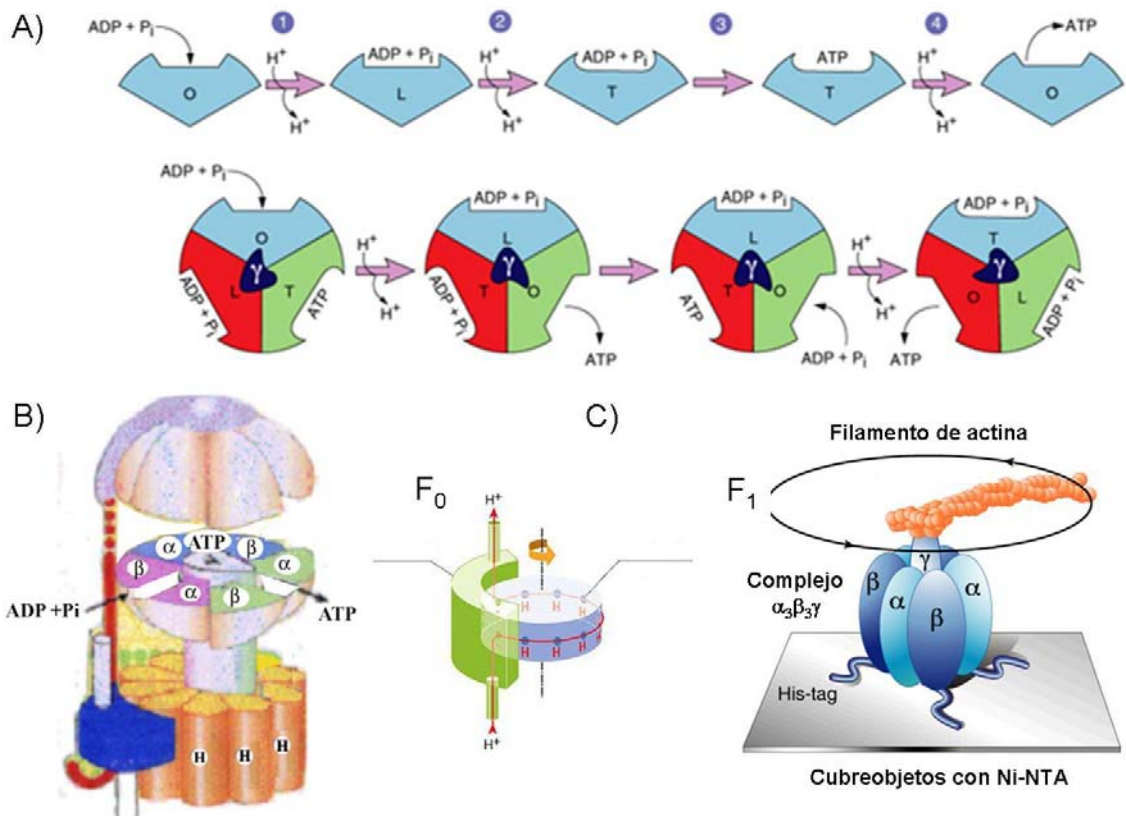


**2. Estructura de la ATP sintasa.** La estructura de esta enzima se conoce parcialmente. Se tiene la resolución cristalográfica de varios subcomplejos y con los resultados de otros experimentos se ha logrado construir un modelo de la estructura completa. La enzima se compone de dos porciones: A) una porción soluble (F<sub>1</sub>, subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) que protruye hacia la matriz mitocondrial, y una membranal (F<sub>0</sub>, subunidades c, a y b) que bombea protones del espacio intermembranal a la matriz; ambas porciones están conectadas por dos tallos, uno periférico (subunidad b principalmente) y otro central (subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ). B) La composición de las subunidades varía con respecto a la fuente de extracción; las subunidades ausentes en el complejo de bacteria se conocen como supernumerarias. C) El modelo cristalográfico de F<sub>1</sub> con el mayor número de subunidades que se ha resuelto contiene las subunidades del tallo central (Gibbons *et al.* 2000) D) La mejor estructura de la enzima completa con ambas porciones sólo se ha obtenido por microscopía electrónica en el complejo de levadura (Rubinstein *et al.* 2003), aquí se muestra la estructura cristalográfica mas completa (Stock *et al.* 1999).

2005) correspondiente al anillo de subunidades *c*. Sin embargo, gracias a los estudios de mutagénesis dirigida, resonancia magnética nuclear y modelado molecular (Fillingame & Dmitriev 2002) se tiene una idea general de la disposición del resto de sus subunidades.  $F_0$  es un cilindro formado por 10-14 subunidades *c* (el número de subunidades puede relacionarse con la cantidad de  $H^+$  bombeados por ATP), que se encuentra unido a la subunidad *a* para formar un canal de protones y con la base de la subunidad *b* del tallo periférico, una estructura que se conecta a  $F_1$ .

Para que se lleve a cabo la síntesis de ATP se requiere que  $F_1$  y  $F_0$  estén acoplados; la estructura de la enzima muestra que esto se logra gracias a la presencia de dos tallos que las conectan (Fig.2): el tallo periférico, que está formado principalmente por las subunidades *b* y  $\delta$  (esta última es homóloga a la OSCP en la enzima mitocondrial), ancla y estabiliza a  $F_1$  con  $F_0$  (Wilkens 1998). El tallo central está formado por las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  principalmente; en el caso del complejo mitocondrial también se encuentra la subunidad  $\delta$ . El tallo central forma parte del “rotor” de la enzima y juega un papel central en el mecanismo de catálisis. La  $F_1F_0$  puede disociarse en sus dos componentes, sin embargo, al hacerlo pierde la capacidad de síntesis. En estas condiciones  $F_1$  mantiene sólo la actividad ATPasa y  $F_0$  transloca protones de manera pasiva.

Otra manera de analizar a  $F_1F_0$  es basándose en su mecanismo de acción (Fig. 3). La enzima posee tres sitios catalíticos en  $F_1$ ; sin embargo, presenta cooperatividad negativa con respecto a la unión del sustrato y positiva con respecto a la actividad enzimática. Este hecho llevó a proponer un modelo de catálisis rotacional en la que los sitios catalíticos se alternan para llevar a cabo la síntesis o hidrólisis de ATP (Boyer 1993). Este modelo rotacional y la estructura de la enzima implican la presencia de un núcleo que permite la rotación de un grupo de subunidades que forman el “rotor”. Al analizar la estructura de la enzima es claro que este papel es muy congruente con la disposición de las subunidades del tallo central. De hecho la evidencia experimental que sustenta este papel se ha obtenido de varios laboratorios (Duncan *et al.*, 1995, Sabbert *et al.*, 1996, Noji *et al.*, 1997, Buligyn *et al.*, 1998). Los experimentos demostraron que la rotación de  $\gamma$  es concomitante con la catálisis de la enzima y la inhibición de ésta (con inhibidores como la azida) conlleva al bloqueo de sus movimientos. Una demostración visual de la



**Figura 3. Mecanismo de acción de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>.** A) La enzima funciona a través de un mecanismo rotacional que implica el giro de un rotor. La interacción de  $\gamma$  en el rotor, provoca diferentes estados conformacionales (L o semiabierto, O o abierto, y T o cerrado) en los sitios catalíticos localizados en el estator de la enzima; estas conformaciones median la síntesis del ATP. B) Se puede considerar que la ATP sintasa es el resultado de dos motores acoplados representados por las porciones individuales F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>, para la síntesis se requiere que ambas porciones estén acopladas. C) La rotación del tallo central se visualizó por primera vez mediante la unión de un filamento de actina a la subunidad  $\gamma$  de una F<sub>1</sub> inmovilizada (Noji *et al.* 1997). F<sub>0</sub> forma un canal que acopla el bombeo de protones a la rotación y la síntesis de ATP.

rotación se obtuvo por microscopía de fluorescencia durante la hidrólisis de ATP (Noji *et al.*, 1997); en estos experimentos se unió un filamento fluorescente de actina a la base de la subunidad  $\gamma$  en una  $F_1$  inmobilizada (Fig. 3C); la adición de ATP a este sistema provocó la rotación de  $\gamma$  y del filamento en el sentido de la hidrólisis de ATP.

En este contexto se puede considerar que la  $F_1F_0$  es un ensamblado de dos motores (Fig. 3), representados por las dos porciones de la enzima, que rotan individualmente en dirección contraria uno con respecto del otro (Oster *et al.*, 2003). El motor en  $F_1$  se mantiene activo por la hidrólisis de ATP y rota en sentido contrario a las manecillas del reloj (Noji *et al.*, 1997). Por otra parte, el que se encuentra en  $F_0$  se activa por la fuerza protonmotriz y gira en el sentido de las manecillas del reloj o en dirección de la síntesis; en este motor los iones fluyen a través de la interfase  $a-c$  y generan el torque suficiente para que el giro de  $\gamma$  libere un ATP durante la síntesis. Cuando ambos motores se encuentran acoplados comparten un eje común representado por el tallo central y el anillo de subunidades  $c$  (Fig. 3). En condiciones fisiológicas el motor de  $F_0$  predomina sobre el de  $F_1$  y se favorece la síntesis.

Para tener una idea más clara de la rotación en  $F_1F_0$  es necesario determinar qué parte del motor corresponde a la sección móvil (rotor) y cuales subunidades a la estática (estator). La definición de estas subunidades se dio principalmente por estudios de entrecruzamiento y mutagénesis (Aggeler *et al.*, 1995, 1996). Mediante estos experimentos se demostró que los entrecruzamientos entre las subunidades  $\epsilon$ - $\beta$ ,  $a$ - $c$ ,  $\gamma$ - $\alpha$  y  $\gamma$ - $\beta$  afectan la rotación y la actividad de la enzima. De esta manera se propuso que las subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $c$  deben girar juntas, pues los entrecruzamientos entre éstas no afectan la actividad de la enzima. Los entrecruzamientos entre alguna de las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  y la subunidad  $\delta$  (en *E. coli*), o entre las subunidades  $a$  y  $b$  (esta última del tallo periférico) tampoco conllevan a la pérdida de actividad y por lo tanto se les considera parte del estator.

El hexámero de subunidades  $\alpha/\beta$  forma parte del estator y rodea al tallo central (parte del rotor). La subunidad  $\gamma$  es la subunidad más grande del rotor; consta de un dominio globular en la base del tallo y otro formado por un par de hélices que se extienden e internan hacia la punta del estator. La interacción de estas hélices con los sitios

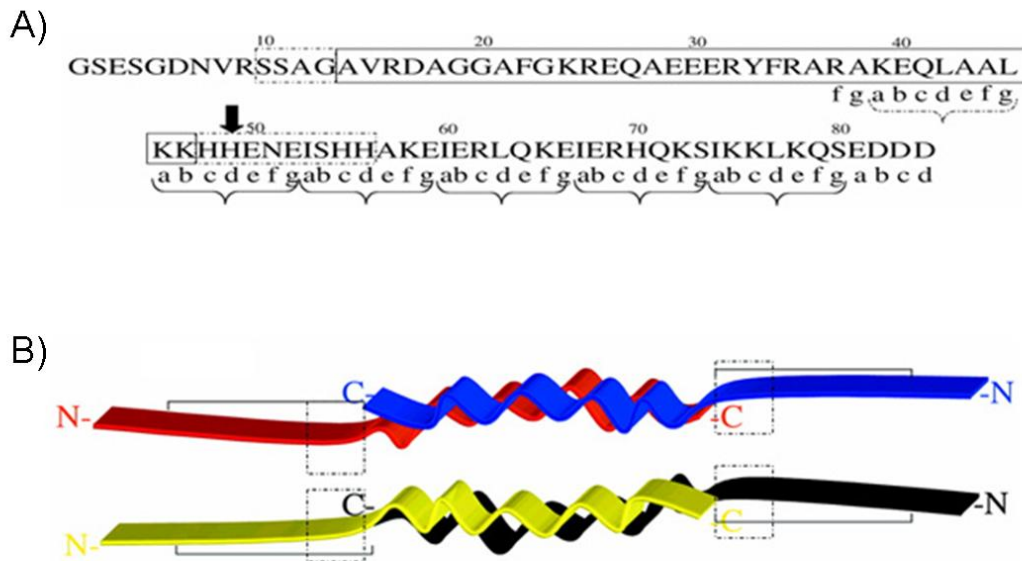


catalíticos induce los cambios conformacionales necesarios para la síntesis de ATP. Durante la rotación, el giro de  $\gamma$  puede inducir estos cambios en los sitios catalíticos de manera desfasada. Se han descrito principalmente tres diferentes conformaciones del sitio catalítico (abierta, cerrada y semi abierta. Fig. 3, O, T y L respectivamente) que presentan diferente afinidad por el sustrato y median la liberación de los productos (Fig. 3 A) (Boyer 1993); la asignación de cada una de estas conformaciones de acuerdo al sustrato y/o productos es todavía objeto de discusión (Bianchet *et al.*, 2000).

A pesar de que el rotor lleva a cabo los principales movimientos, el estator no es una estructura rígida o inmóvil; de hecho, la existencia de dos motores moviéndose y oponiéndose hace evidente la necesidad de otras subunidades que puedan fijar las subunidades catalíticas durante la rotación del tallo central. Parte de esta función la lleva a cabo el tallo periférico que, por su posición, podría limitar las perturbaciones que afectan al acoplamiento y la formación del estado de transición. En experimentos hechos con la subunidad *b* de la enzima de *E. coli*, que es el principal componente del tallo periférico, se ha comprobado que la adición (de hasta 14 residuos de aminoácidos) o delección (de hasta 7 residuos de aminoácidos) de fragmentos de esta subunidad (Sorgen *et al.*, 1998, 1999) no afectan la actividad de la enzima. Sin embargo, cambios mayores conllevan a la disminución de la fosforilación oxidativa. Estos resultados muestran que esta subunidad puede soportar cambios conformacionales importantes y puede participar en la función de la enzima.

## **1.2 La proteína inhibidora (IF<sub>1</sub>)**

Como mencionamos anteriormente, el contenido de subunidades de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> puede variar con respecto a la fuente de extracción. Aquellas subunidades que no se encuentran en el modelo más simple de la enzima, como el de bacterias, se llaman supernumerarias. Varias de estas subunidades se encuentran en la porción de F<sub>0</sub> y cumplen con diferentes funciones. En el caso de las mitocondrias, y en particular las del sistema de corazón de bovino, existe una subunidad supernumeraria en F<sub>1</sub> conocida como la proteína inhibidora (IF<sub>1</sub>). La IF<sub>1</sub> es una proteína de 84 residuos de aminoácidos y cerca de 10 kDa que inhibe la hidrólisis de ATP (Pullman & Monroy 1963) (Fig.4). Se conocen homólogos de esta subunidad en mitocondrias de hígado de rata (Cintron & Pedersen 1979), levadura



**Figura 4. La proteína inhibidora (IF<sub>1</sub>).** La IF<sub>1</sub> es una subunidad supernumeraria que está presente en el complejo mitocondrial, funciona como regulador de la hidrólisis del ATP y se asocia con una estequiometría de 1:1. Su estructura está compuesta principalmente por hélices  $\alpha$  y presenta una alta tendencia a asociarse. A) La estructura de la IF<sub>1</sub> muestra tres regiones bien definidas: una región reguladora con una secuencia de histidinas (línea punteada) que flanquea la región de inhibición (línea sólida). B) La IF<sub>1</sub> presenta también una región de asociación en el extremo C-terminal. El contacto con las subunidades de F<sub>1</sub> ocurre por el extremo N-terminal donde se encuentra la región de inhibición (línea continua). (Tomado de Cabezón et al., 2000).

(Hashimoto *et al.*, 1981) y plantas (Norling *et al.*, 1990). La comparación entre la secuencia de aminoácidos de estas subunidades, indica que la cadena polipéptica está bien conservada (Van Raaij *et al.*, 1996, Papa *et al.*, 1996); la IF<sub>1</sub> de levadura y plantas presentan el menor grado de similitud con las de bovino, sin embargo, en estos sistemas la IF<sub>1</sub> es más pequeña y requiere de subunidades accesorias estabilizadoras (Polgreen *et al.*, 1995, Hashimoto *et al.*, 1981), además su reconstitución en el complejo de bovino no es efectiva.

La IF<sub>1</sub> se asocia a F<sub>1</sub> con una estequiometría de 1:1 (Klein *et al.*, 1980); es un inhibidor no competitivo y reversible de la hidrólisis de ATP (Van Heeke *et al.*, 1993, Horstman *et al.*, 1970) y puede disociarse de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> o de F<sub>1</sub> en condiciones de fuerza iónica alta (150 mM KCl), temperatura alta y pH básico. La IF<sub>1</sub> aislada presenta una alta tendencia a la agregación que afecta su capacidad de inhibición (Panchenko & Vinogradov 1985); esta conducta varía con respecto al pH (Van Raaij *et al.*, 1996, Cabezón *et al.*, 2000): a pH de 6.7 la IF<sub>1</sub> se encuentra en forma dimérica y es un inhibidor efectivo de la hidrólisis, pero cuando el pH se torna alcalino (pH 8.0) se asocia en tetrámeros y pierde su capacidad de inhibición.

La IF<sub>1</sub> posee una estructura helicoidal (Van Heeke *et al.*, 1993, Lebowitz & Pedersen 1993) y se han determinado varias regiones de su estructura que llevan a cabo diferentes funciones (Fig.4). La secuencia de aminoácidos contiene cinco histidinas bien conservadas en las posiciones 48, 49, 55, 56 y 70 (numeración de bovino) que cumplen con una función reguladora. Las His 48, 49 y 55 están involucradas en la pérdida de actividad inhibitoria dependiente de pH (Panchenko & Vinogradov 1985, Papa *et al.*, 1996, Schnizer *et al.*, 1996, Lebowitz & Pedersen 1996); la protonación de estos residuos puede modificar la estructura secundaria (contenido de hélices  $\alpha$ ) y afectar la interacción con los sitios de inhibición en F<sub>1</sub>. Aunque el mecanismo que controla este proceso es desconocido, se ha sugerido que la IF<sub>1</sub> existe en dos conformaciones, una inactiva, con estructura altamente helicoidal a pH básico y otra menos helicoidal e inhibitoria a pH ligeramente ácido.

Otra región bien definida es la del C-terminal (residuos 39-84). En esta porción la cadena polipéptica posee características estructurales que permiten la asociación. Esta región puede formar un trenzado helicoidal antiparalelo que lleva a la formación de dímeros y

otros oligómeros (Van Raaij *et al.*, 1996). Estos datos se han corroborado por las estructuras obtenidas por NMR (Chiara *et al.*, 2002) y cristalografía (Cabezón *et al.*, 2003), en las que es posible encontrar varios oligómeros. Finalmente, la región entre los residuos 9-22 se ha definido como la porción de inhibición. En experimentos de síntesis y reconstitución de péptidos de la IF<sub>1</sub>, se determinó que este fragmento es el más pequeño que funciona como un inhibidor efectivo, pero irreversible de la hidrólisis de ATP (Dianoux *et al.*, 1981, Dianoux *et al.*, 1982, Dianoux *et al.*, 1982, Van Raaij *et al.*, 1996, Papa *et al.*, 1996).

A pesar de lo mencionado anteriormente, los esfuerzos que se han hecho por determinar el mecanismo de inhibición y la ubicación de la IF<sub>1</sub> en la estructura cuaternaria del complejo ATP-sintasa no han sido concluyentes. Por otra parte, la mayoría de la información se ha obtenido con la subunidad reconstituida, la cual se comporta de manera diferente al complejo endógeno. La IF<sub>1</sub> es un inhibidor más efectivo de la enzima completa (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) que de la F<sub>1</sub> soluble (Vaan Heke *et al.*, 1993, Van Raaij *et al.*, 1996), lo que indica que F<sub>0</sub> juega un papel importante en su función. En experimentos de entrecruzamiento y solubilización con detergentes, se pudo determinar una posible relación de IF<sub>1</sub> con una subunidad de 6 kDa (López-Mediavilla *et al.*, 1993) perteneciente a F<sub>0</sub>; sin embargo, no se pudo reconocer su identidad. De esta manera, uno de los principales objetivos de este trabajo fue definir la ubicación de la IF<sub>1</sub> endógena en el complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> de corazón de bovino.

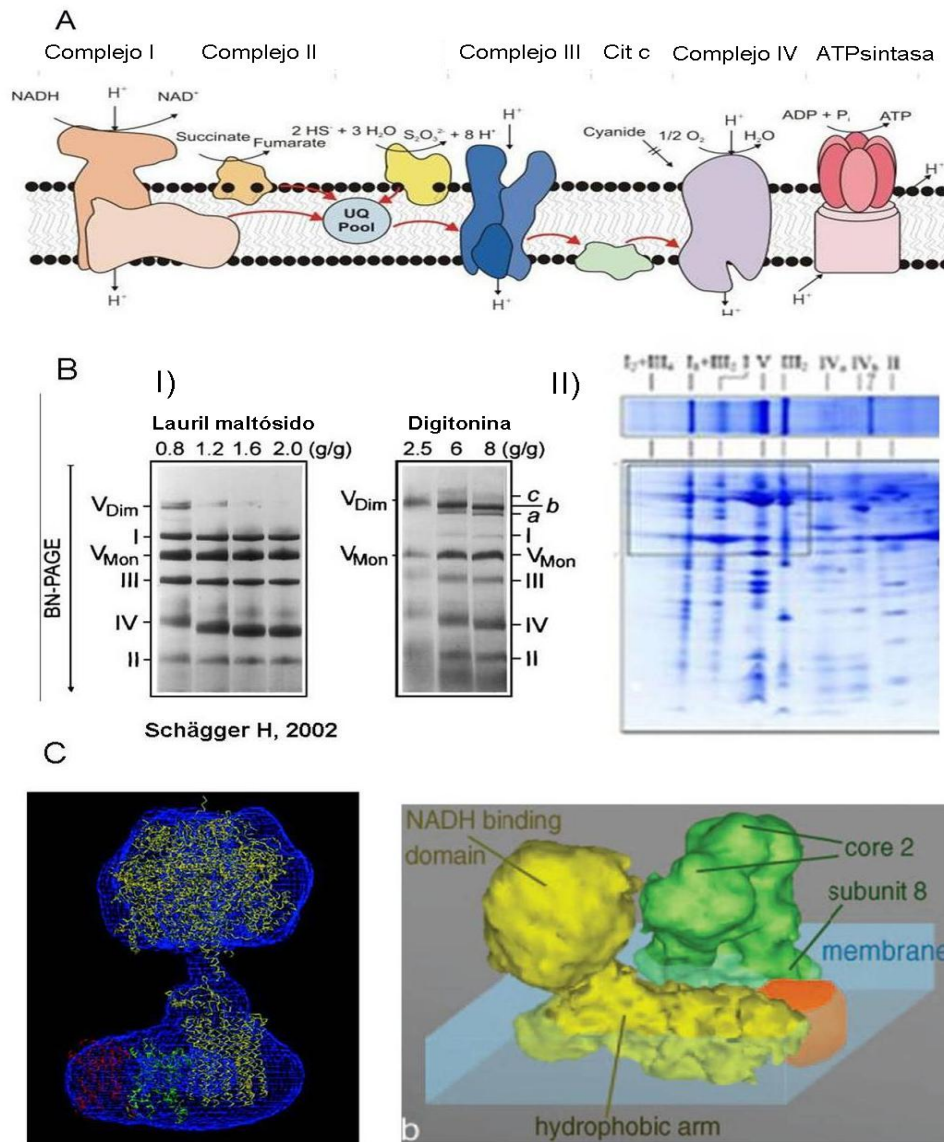
Como se mencionó, lo que se conoce hasta el momento no es suficiente para deducir completamente cuál es el mecanismo de inhibición de IF<sub>1</sub>. La interacción con F<sub>1</sub> puede inhibir también la síntesis de ATP (Gómez Puyou *et al.*, 1979), por lo que se ha propuesto que IF<sub>1</sub> puede presentar dos conformaciones, una inhibitoria que puede interactuar con el sitio de inhibición y otra que no accede a este sitio pero que puede reacomodarse en F<sub>1</sub>. Otras propuestas indican que la IF<sub>1</sub> se libera al medio y se encuentra asociada sólo durante la inhibición de la hidrólisis (Husain *et al.*, 1985); sin embargo, en condiciones solubles sólo se le ha descrito en forma dimerica y queda por determinar si al asociarse lo hace en forma monomérica (respetando la estequiometría 1:1) o dimerica.

### 1.3 Los supercomplejos

Como se mencionó anteriormente, la  $F_1F_0$  está estrechamente relacionada con los complejos de la fosforilación oxidativa. Uno de los aspectos que más ha llamado la atención acerca de estos complejos es el de su organización, una de las maneras en que se ha explicado implica que los complejos respiratorios se comportan como entidades independientes que difunden libremente por la membrana; sin embargo, recientemente se ha encontrado evidencia que muestra que también pueden funcionar como grandes ensamblajes moleculares que forman supercomplejos.

La asociación en supercomplejos, conocidos también como “metabolones” (Robinson & Srere 1985), es un hecho que ocurre comúnmente en la célula; estos ensamblajes pueden ocurrir entre enzimas de una secuencia metabólica dada para formar complejos funcionales. Es decir, ocurre entre enzimas que se encuentran funcionalmente comprometidas y, por lo mismo, tienen una alta probabilidad de estar co-localizadas. De esta manera las enzimas involucradas en un proceso dado pueden estar asociadas en uno o varios metabolones para formar una hiperestructura inducida para el manejo de sus sustratos. Estas hiperestructuras pueden variar y disgregarse cuando uno de los sustratos ya no está disponible; lo que podría reflejar un metabolismo más versátil y eficiente (Trinei *et al.*, 2004).

En el caso de la cadena respiratoria (Fig. 5) existe mucha controversia pues, como se mencionó anteriormente, hay evidencia que respalda su organización como entidades individuales y también se ha comprobado la existencia de supercomplejos, denominados respirosomas, en diferentes sistemas mitocondriales. En mitocondrias de levadura se determinó que la cadena respiratoria se comporta como una sola unidad estructural (Boumans *et al.*, 1998), mientras que, por el análisis del control de flujo, en los complejos mitocondriales de corazón de bovino (Bianchi *et al.*, 2004) fue posible determinar diferentes asociaciones entre los complejos respiratorios. Una evidencia definitiva que demuestra la presencia de los respirosomas se obtuvo por la electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida (BN-PAGE) (Schägger 2002), una técnica diseñada para analizar complejos membranales. En el caso de la cadena respiratoria se pueden visualizar los complejos respiratorios a partir de extractos mitocondriales solubilizados con diferentes detergentes. Además de las bandas correspondientes a los complejos



**Figura 5. La cadena respiratoria y los respirosomas.** A) La cadena respiratoria presenta 4 complejos que pueden formar diferentes asociaciones o respirosomas. La ATPsintasa aprovecha el gradiente electroquímico formado por estos complejos para llevar a cabo la síntesis de ATP. B) Los complejos respiratorios, la ATP sintasa y otros respirosomas pueden ser separados y visualizados por la BN-PAGE (I). Una de las técnicas más usadas para identificar la composición de los supercomplejos es la SDS-PAGE en 2 dimensiones (II). C) Algunos de los respirosomas se han analizado por microscopía electrónica (Dudkina *et al.* 2005) y asociaciones con otras proteínas como en el sintasoma, un complejo formado por la ATP sintasa y los acarreadores de Pi y de nucleótidos de adenina (Chen, *et al.* 2004)

respiratorios individuales (Fig. 5), es posible separar fragmentos de unidades estructurales y funcionales más grandes (Schägger 2000, Schagger & Pfeiffer 2000). Incluso se ha podido identificar la composición de estos complejos por medio de la electroforesis en dos dimensiones. Estos datos demuestran la presencia de asociaciones preferentes entre complejos y son más congruentes con el ensamblaje de complejos enzimáticos en bloques ordenados que como unidades aisladas.

#### **1.4 Organización de los Respirosomas.**

El contenido de los respirosomas puede variar dependiendo de la fuente de extracción, las condiciones de crecimiento y/o la disponibilidad de sustratos (Schägger & Pfeiffer 2001, Schägger 2002). A pesar de esto es posible identificar asociaciones estables entre diferentes complejos respiratorios. Un ejemplo claro es ilustrado por el caso del citocromo c (cit c), ya que, su comportamiento varía de acuerdo con el sistema que se analiza. En mamíferos y levaduras su movilidad es mayor que en bacterias, pues en éstas la transferencia de electrones entre los complejos respiratorios III y IV involucra el movimiento del cit c fuertemente unido, y es posible encontrar respirosomas que involucran a ambos complejos. En levaduras y mamíferos esta asociación es menos frecuente; el cit c se comporta de manera más fluida pues, en el caso de mamíferos se encuentra libre en la poza de cit c, por lo que la formación de estos complejos no ocurre. Así, la distribución de una molécula como el cit c, puede reflejar la diferencia en la organización de la cadena respiratoria de estos sistemas y su capacidad de respuesta a los cambios de la fuente de carbono disponible (Schägger *et al.*, 2004).

Es interesante destacar que, además de manifestar la relevancia de los respirosomas (Schagger *et al.*, 2004), la determinación de este tipo de interacciones entre complejos respiratorios ha sido útil en la caracterización de algunas patologías mitocondriales humanas. Por ejemplo, en mitocondrias de humano se ha determinado con el análisis de defectos de ensamblaje, que los complejos I y IV no afectan la estabilidad del respirosoma, sin embargo, cuando este tipo de defectos ocurre en el complejo III hay dificultades con el ensamblaje del complejo I, (la principal entrada de sustrato para la cadena respiratoria). De lo anterior se concluye que el complejo III juega un papel importante en la estabilidad y ensamblaje de otros complejos; particularmente del complejo I (Schägger *et al.*, 2004)

pues, las alteraciones genéticas que provocan la carencia del complejo III pueden evitar la formación del respirosoma.

Para poder conciliar la evidencia que apoya la formación de los respirosomas y aquellos datos que apoyan la función de los complejos individuales, se requiere de una evaluación crítica de los modelos que interpretan la organización de la cadena respiratoria. La nueva hipótesis podría tomar en cuenta ambos modelos, postulando que los supercomplejos existen en equilibrio con complejos aislados, dependiendo de las condiciones metabólicas de la célula.

### **1.5 La $F_1F_0$ dimérica**

Como se mencionó anteriormente, la  $F_1F_0$  utiliza el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria durante la fosforilación oxidativa para llevar a cabo la síntesis de ATP. En este contexto, la enzima también se conoce como el “complejo V” y se ha demostrado que puede formar distintos supercomplejos. Los dos mejor caracterizados son el sintasoma y los dímeros de la enzima.

#### **1.5.1 El sintasoma**

Los respirosomas no sólo implican la formación de ensamblados entre complejos respiratorios, sino que pueden existir asociaciones con otras proteínas relacionadas (Fig. 5). Durante la fosforilación oxidativa se requiere de la coordinación de varios eventos que ocurren de manera simultánea. Por ejemplo, la síntesis de ATP requiere que la enzima disponga de suficiente  $P_i$  y ADP, sustratos que pueden ser aportados por los acarreadores de fosfatos y de nucleótidos de adenina, por lo que la síntesis de ATP podría implicar la presencia de estas tres enzimas. De hecho, ya se ha mostrado un complejo que involucra a las tres enzimas en extractos mitocondriales solubilizados con detergentes (Fig. 5). Este complejo presenta una estequiometría de 1:1:1 y se le ha dado el nombre de sintasoma (Chen *et al.*, 2004). Su presencia muestra que la entrada de los sustratos (ADP y  $P_i$ ) a la mitocondria, así como la síntesis y liberación del ATP, son eventos muy localizados y coordinados.

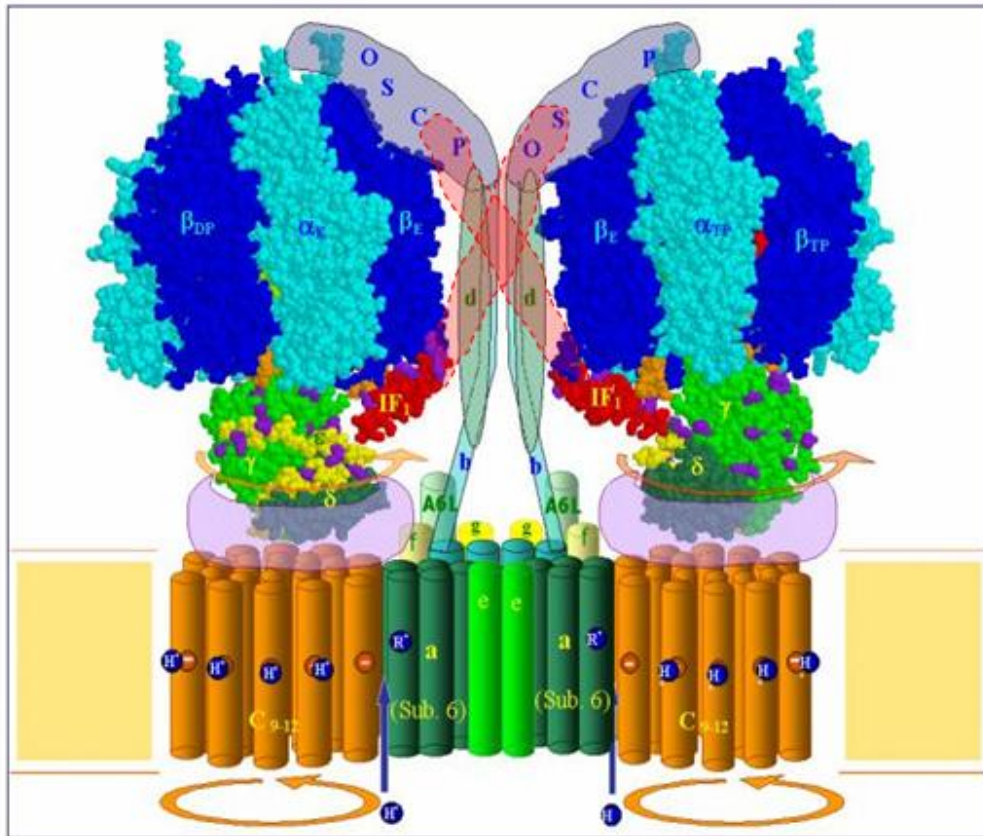


### 1.5.2 La ATP sintasa dimérica

La asociación de la ATP sintasa en dímeros se ha visto por medio de la BN-PAGE (Schagger 2002). Esta asociación es una de las más estables y parece ser exclusiva de mitocondrias y cloroplastos. Aunque no es completamente claro, tienen un papel fisiológico relevante, ya que la dimerización de la  $F_1F_0$  está involucrada con la biogénesis de las crestas mitocondriales (Allen 1995, Paumard *et al.*, 2002).

Tradicionalmente se ha considerado que las crestas mitocondriales son invaginaciones de la membrana interna que permiten su empaquetamiento. Recientemente se ha demostrado que son dominios membranales con una estructura bien definida y diferente del resto de la membrana interna, representada por las porciones entre cresta y cresta (Frey & Manella 2000). Las crestas mitocondriales presentan una alta actividad fisiológica; por medio del inmunomarcado y la microscopía electrónica (ME) se ha visto que la mayor parte de los complejos III y V están localizados ahí, lo que implica que la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP ocurren en estas estructuras (Gilkerson *et al.*, 2003).

La participación de los dímeros de la  $F_1F_0$  (Fig. 6) en la biogénesis de las crestas mitocondriales es un fenómeno que ha despertado el interés de muchos investigadores. Los trabajos encaminados a definir la dimerización muestran que las subunidades supernumerarias *g*, *e* y *k* (principalmente las dos primeras, ya que, *k* sólo se ha descrito en levadura) están involucradas en la generación y morfología de las crestas mitocondriales (Allen 1995, Paumard *et al.*, 2002). Estas subunidades no son componentes esenciales de la enzima pero se requieren para la oligomerización (Giraud *et al.*, 2002). En las mitocondrias donde se evita la expresión de estas subunidades, el arreglo de la membrana interna sufre alteraciones importantes que se manifiestan en la desaparición de las crestas mitocondriales y la formación de digitaciones y/o estructuras atípicas en forma de “aros de cebolla”, causadas por una biogénesis o plegamiento descontrolado de la membrana interna. Además, las mitocondrias con estas características muestran defectos en la respiración y en el manejo del DNA mitocondrial (Arselin *et al.*, 2004, Bornhovd *et al.*, 2006). Estos hallazgos muestran que hay una estrecha relación entre la dimerización de la ATP sintasa y la biogénesis de las crestas mitocondriales. La presencia de una alta



**Figura 6. Modelo teórico de los dímeros de la ATP sintasa.** Uno de los supercomplejos mas estudiados es el de los dímeros de la ATPsintasa. Estos complejos tienen un papel relevante en la biogénesis de las crestas mitocondriales. A pesar de que su estructura no es del todo conocida, se reconocen algunas subunidades dimerizantes (e, g y b) que se encuentran en F<sub>0</sub>, por lo que en este modelo teórico co-localizan en la interfase de dimerización. La IF<sub>1</sub> podría participar en esta asociación como un factor estabilizador importante. Por lo que se le coloca también en la interfase de dimerización en F<sub>1</sub> (Tomado de García, J.J., 2004 y 2006).

densidad de complejos y proteínas en las crestas mitocondriales y las restricciones estructurales que esto supone para la cadena respiratoria, sería un argumento más a favor de la existencia de respirosomas y su probable dependencia del estado energético de la mitocondria, pues la morfología y estructura interna de las crestas mitocondriales puede variar por la respiración (Gilkerson *et al.*, 2000).

## **2. Objetivos**

El desarrollo de este trabajo se realizó en dos partes con objetivos diferentes. El primero de ellos fue la localización de la proteína inhibidora endógena en la estructura cuaternaria de la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino.

El segundo objetivo fue obtener la estructura del complejo dimérico de la ATP sintasa mitocondrial (corazón de bovino) por microscopía electrónica.

### **3. Materiales y Métodos**

Los experimentos se realizaron utilizando mitocondrias y partículas submitocondriales (PSM) de corazón de bovino aisladas con un método reportado anteriormente (García *et al.*, 1995). En algunos experimentos se purificó a la F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I a partir de PSM mediante una cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa hexil-amonio (SHEA, Amersham Pharmacia Biotech.) (Tuena de Gómez-Puyou & Gómez-Puyou 1977).

#### **3.1 Localización de la IF<sub>1</sub>**

En la primera parte de este proyecto se buscaron las interacciones y/o proximidad de la IF<sub>1</sub> con otras subunidades de la ATP-sintasa. Los experimentos realizados se basaron principalmente en el entrecruzamiento reversible con ditiobis (succinimidil) propionato (DSP).

##### **3.1.1 Entrecruzamiento con Ditiobis-succinimidil propionato (DSP)**

El DSP es un entrecruzador homo-bifuncional reversible que reacciona con residuos de lisina que se encuentren a una distancia máxima de 12Å. Dado que el DSP contiene un enlace disulfuro, los productos de entrecruzamiento obtenidos pueden ser separados en condiciones reductoras e identificados. El entrecruzamiento se llevo a cabo en PSM o en la F<sub>1</sub>I (1 y 4 mg/mL respectivamente) en un amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7. En el caso de PSM se uso el mismo amortiguador pero con sacarosa 250 mM. Para la reacción de entrecruzamiento, las muestras de enzima se incubaron con el DSP (30 µg/mL o 1 mg/ml para F<sub>1</sub>I) durante 30 min a temperatura ambiente; para detener la reacción se añadió una alícuota de L-lisina (20 mM final).

##### **3.1.2 Electroforesis**

La identificación de los productos de entrecruzamiento se hizo por medio de la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Para ello las muestras tratadas con DSP se cargaron en geles de poliacrilamida en gradiente (10-22%). Dado que el entrecruzamiento generado con DSP es reversible por DTT, esta electroforesis se realizó sin DTT (1ª dimensión no reductora). Una vez que las muestras se separaron, los carriles con las subunidades de la enzima fueron cortados individualmente, incubados en una

solución reductora (20 mM de DTT y 0.1% de SDS) durante 1 hr a temperatura ambiente, lavados con agua destilada y analizados por SDS-PAGE en presencia de DTT (2ª dimensión reductora). En la 2ª dimensión el carril cortado se colocó horizontalmente en la parte superior del gel separador y se le polimerizó alrededor un gel empacador. Las bandas se compararon con estándares de peso molecular y/o con una muestra pura de  $F_1I$  o  $F_1F_0$ . Las bandas de algunos de los geles se analizaron por densitometría a partir de las imágenes correspondientes; este análisis se llevo a cabo con el programa ALPHADIGDOC (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Ca USA) para el análisis de imágenes digitales.

### **3.1.3 Ensayos de inmunodetección**

Otra manera de identificar los productos de entrecruzamiento fue a través de la inmunodetección tipo “Western Blot” (WB). Para estos ensayos se usaron SDS-PAGE en condiciones reductoras (+DTT) o no reductoras (-DTT). Los geles obtenidos fueron transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en un amortiguador de ácido 3-(ciclohexilamino)-1- propanosulfónico (CAPS) 100 mM, pH 11.0, y metanol 10 % v:v. La transferencia se llevó a cabo durante 2 hrs. a 4° C y 100 mA. Sólo se hicieron ensayos de inmunodetección para las subunidades  $IF_1$ ,  $\gamma$  y  $\alpha$ . Para  $\alpha$  y la  $IF_1$  se usaron anticuerpos monoclonales (García *et al.*, 2000); para la subunidad  $\gamma$  se utilizó un anticuerpo policlonal donado generosamente por la Dra. Marieta Tuena Sangri (IFC, UNAM). La detección de las bandas inmunoreactivas se hizo con anticuerpos secundarios anti-cabra o anti-conejo acoplados a una peroxidasa (HRP) y al sistema de revelado por quimioluminiscencia ECL-Plus (Amersham-Pharmacia Biotech.).

### **3.1.4 Inmunoprecipitación de la ATP-sintasa**

Para reconocer específicamente a los productos de entrecruzamiento entre la  $IF_1$  y otras subunidades de la  $F_1F_0$ , el complejo ATP sintasa se inmunoprecipitó con un anticuerpo monoclonal capaz de inmunoprecipitar todo el complejo ATP sintasa nativo y funcional (Aggeler *et al.*, 2002). La inmunoprecipitación se hizo a partir de PSM (1.5 mg/mL) solubilizadas con lauril maltósido (LM, 2.25 mg/mL) durante 45 min a 4°C. El amortiguador usado fue Mes-Tris 20 mM, pH 6.8, sacarosa 150 mM y ADP 1 mM. Las muestras solubilizadas se centrifugaron a 186 000 x g durante 45 min a 4°C; el

sobrenadante se recuperó e incubó con una resina de proteína G acoplada a anticuerpos no específicos, o a un antisuero preinmune de ratón durante 1 hr. a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó e incubó con otra resina de proteína G acoplada al anticuerpo anti-ATP sintasa durante 2 hr, después de lo cual se lavó varias veces con Mes-Tris 20 mM, pH 6.8, sacarosa 150 mM, ADP 1 mM y 0.05% de LM. La elución del complejo inmunoprecipitado se hizo con glicina 100 mM, pH 2.5. Finalmente el pH se reajustó a 7.5 con un amortiguador de fosfatos (1M, pH 8.0).

### **3.1.5 Modificación química con 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina (CPM)**

Para la detección de productos de entrecruzamiento entre las subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ , también se utilizó el marcado con la sonda fluorescente CPM (Molecular Probes, Invitrogen Co.). El CPM reacciona y modifica a residuos de cisteína accesibles, y sólo estas subunidades ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) poseen este residuo. El marcado se hizo a temperatura ambiente durante 2 min., con una relación de  $F_1I/CPM$  de  $5 \text{ mg mL}^{-1}/100 \text{ }\mu\text{M}$ , y en un amortiguador de fosfatos 25 mM, pH 7.0. Para detener la reacción filtramos las muestras marcadas por columnas de Penefsky (Penefsky 1979) para descartar el CPM no unido. La  $F_1I$  marcada y/o entrecruzada se analizó por medio de SDS-PAGE en 1ª o 2ª dimensión, como se describió anteriormente. La visualización de las bandas marcadas se hizo por la excitación del CPM con luz UV. Estos geles se fotografiaron y analizaron con el programa ALPHADIGIDOC.

## **3.2 Oligomerización de $F_1F_0$**

La segunda parte de este proyecto se enfocó al estudio de la estructura dimérica de la  $F_1F_0$ . Los resultados se obtuvieron a través de la BN-PAGE y por microscopía electrónica (ME). Como anteriormente, el complejo analizado fue el que se encuentra en mitocondrias de corazón de bovino.

### **3.2.1 Extracción mitocondrial con digitonina**

Los dímeros de  $F_1F_0$  se extrajeron junto con los complejos respiratorios y otros supercomplejos mitocondriales por medio de la solubilización con digitonina (Sigma). Para esto usamos un amortiguador de Bis Tris 50 mM, pH 7 y ácido 6-aminohexanoico 750

mM. La digitonina se añadió a partir de una solución madre disuelta en dimetil sulfóxido, en alícuotas y lentamente, hasta alcanzar una relación digitonina/proteína de 2.5 mg/mg. La concentración de proteína mitocondrial fue de 10-15 mg/mL. La solubilización se llevó a cabo durante 1 hr a 4°C, después de lo cual las muestras solubilizadas fueron ultracentrifugadas a 186 000 x g durante 45 min a 4°C. El sobrenadante o extracto se recuperó y analizó por BN-PAGE (Schägger *et al.*, 1994). Estas muestras también se analizaron por SDS-PAGE en 2ª dimensión, como se describió anteriormete, para identificar la composición de los supercomplejos separados.

### **3.2.2 Purificación de la ATP sintasa dimérica**

Para la separación de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> dimérica, los extractos mitocondriales se aplicaron a un gradiente discontinuo de glicerol (20-40% v:v). El amortiguador usado fue Mes 20 mM, pH 7.0, EDTA 2 mM, ADP 2 mM y digitonina 5 mM. La centrifugación se hizo a 54 000 x g por 16 hrs a 4°C. Después, el gradiente se fraccionó en alícuotas de 500 µL, comenzando por la parte de arriba. Las fracciones con ATP sintasa monomérica y dimérica se identificaron por BN-PAGE y SDS-PAGE.

### 3.3.3 Zimogramas

Las bandas correspondientes a los monómeros y dímeros de la enzima también se identificaron por actividad ATPasa en los geles de BN-PAGE para verificar su integridad. Para estos ensayos, los geles corridos se incubaron a temperatura ambiente durante toda una noche con una solución de Hepes/KOH 50 mM, pH 8, ATP 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 30 mM para localizar la actividad ATPasa. Las bandas con esta actividad se reconocen por la aparición de un precipitado blanco debido a la formación de fosfato de calcio proveniente del ATP hidrolizado.

### 3.3.4 Microscopía electrónica

Esta parte experimental se realizó en colaboración con el Dr. Stephan Wilkens en la Universidad de California en Riverside USA. Para estos estudios se prepararon por tinción negativa muestras provenientes de los dímeros aislados por el gradiente de glicerol. Las muestras con F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> dimérica se diluyeron a 25 µg/mL y se aplicaron a rejillas de cobre cubiertas con carbono, las cuales se lavaron una vez con H<sub>2</sub>O y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% p:v.

Estas rejillas se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 12 (FEI company, Eindhoven, Neth.) con un modo de dosis bajo a 100kV. Las imágenes se registraron con una cámara con el foco colocado a -500 nm y una magnificación de 30 000. Las imágenes se analizaron con el paquete de programas IMAGIC-5 en una estación con procesador dual Octane (Silicon Graphics, Mountain view, Ca).

Para el análisis de las imágenes de moléculas individuales se eligieron imágenes de moléculas en áreas de 140 x 140 pixeles, mismas que se filtraron para eliminar las frecuencias espaciales no deseadas (<0.008 y >0.13 Å<sup>-1</sup>). Las imágenes obtenidas se procesaron con los programas IMAGIC-5, para esto se hizo el alineamiento directo por clasificación, y el análisis se afinó por medio del alineamiento multi-referencia (Wilkens *et al.*, 2000).



### **3.3.5 Otras técnicas**

Para la activación (disociación de la  $IF_1$ ) de la  $F_1I$ , se incubó este complejo en un medio de Tris 50 mM, EDTA 2 mM, KCl 100 mM, y ATP 10 mM, pH 8.0 a 40°C durante 90 min., después de lo cual se midió la actividad de ATPasa como se describe en García *et al.*, 1995. La determinación de proteína se hizo de acuerdo con el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) o del BCA (Smith *et al.*, 1985).

#### 4. Resultados

Los resultados del entrecruzamiento de la IF<sub>1</sub> con la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ya fueron publicados (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002, Apéndice). Uno de los aspectos más importantes de estos experimentos es que se obtuvieron con la IF<sub>1</sub> endógena, tal como se encuentra en condiciones fisiológicas. En el artículo se reportó una nueva interacción de la IF<sub>1</sub> no conocida anteriormente y se sugiere que el mecanismo de inhibición de esta proteína puede estar involucrado con el sistema de rotación (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002).

La integridad de las muestras utilizadas para estos experimentos se probó con ensayos de actividad de ATPasa. En el caso de F<sub>1</sub>I el ensayo se hizo antes y después de la activación (disociación de la IF<sub>1</sub>, ver Materiales y Métodos). Los valores base de la actividad de ATPasa (con IF<sub>1</sub> unida) fueron de 2-3  $\mu$ moles/min/mg. Tras la activación, se alcanza un valor 25 a 35 veces mayor (50-70  $\mu$ moles/min/mg), comparable con la actividad de F<sub>1</sub> (sin IF<sub>1</sub>). Para encontrar las condiciones de entrecruzamiento se hicieron pruebas de activación para determinar la permanencia de IF<sub>1</sub> en la enzima; los resultados se reforzaron con SDS-PAGE y ensayos de inmunodetección con un anticuerpo monoclonal contra la IF<sub>1</sub>. Estas pruebas se hicieron con las muestras entrecruzadas con DSP y, entrecruzadas y reducidas con DTT para determinar también las condiciones óptimas de su reversibilidad. Las condiciones de entrecruzamiento para F<sub>1</sub>I se fijaron en 1mg/mL de DSP y se utilizaron en todos los experimentos. En la primera etapa de este proyecto encontramos los siguientes resultados:

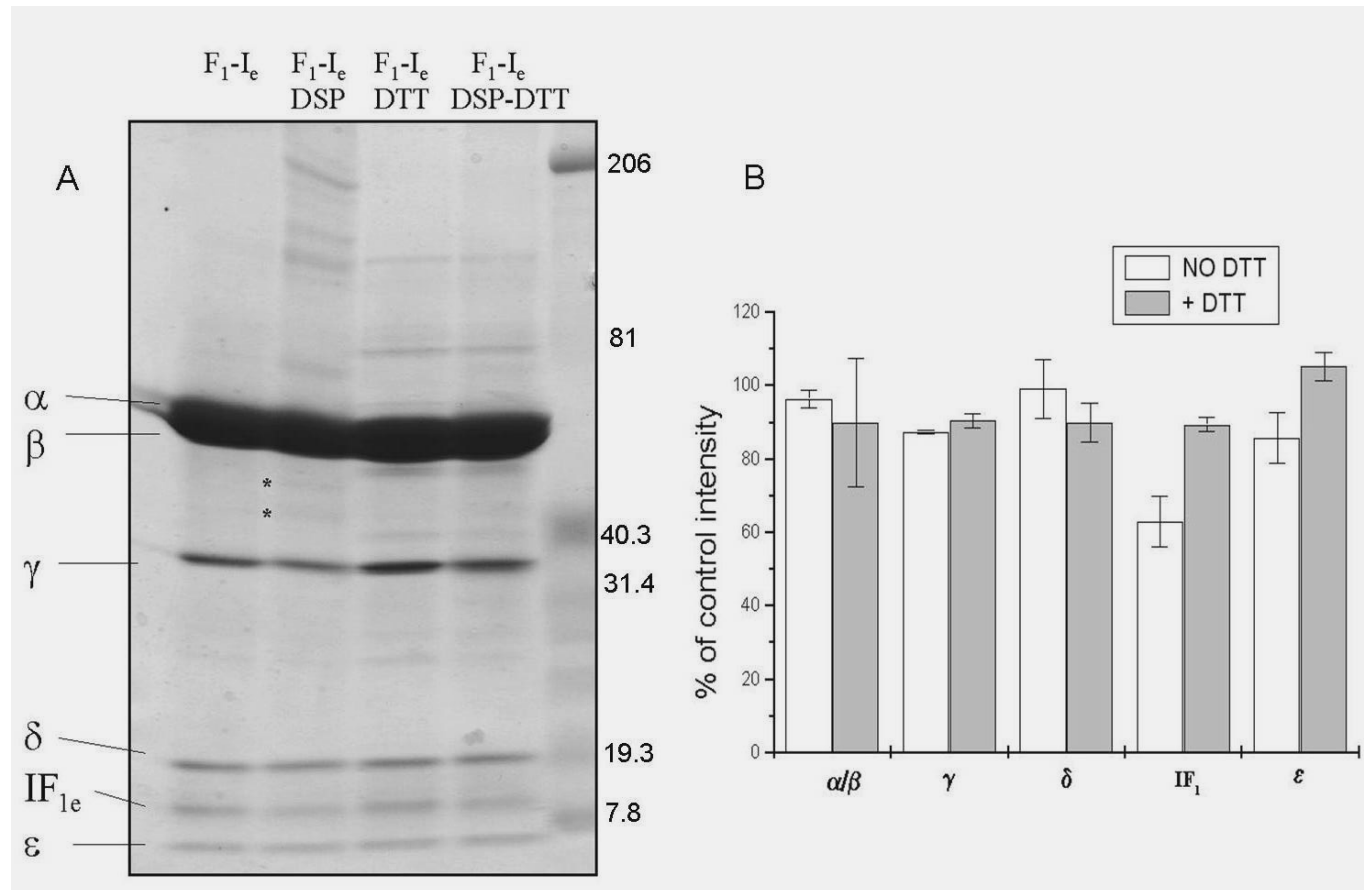
#### **4.1 Visualización de los productos de entrecruzamiento de F<sub>1</sub>I-DSP**

La separación de los productos entrecruzados se hizo por SDS-PAGE. Después del entrecruzamiento con DSP, las muestras y sus respectivos controles (no entrecruzados y tratados en las mismas condiciones) se analizaron por SDS-PAGE; los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie para la visualización de las bandas de la enzima y sus productos de entrecruzamiento. El DSP provoca la aparición de varios productos de entrecruzamiento. El análisis estadístico de estos geles mostró que la intensidad de las bandas de las subunidades IF<sub>1</sub>,  $\gamma$  y  $\epsilon$  disminuye significativamente con respecto a la intensidad de las bandas en la muestra control (-DSP) (Fig. 7), lo cual refleja que el mayor número de entrecruzamientos ocurre entre estas subunidades. Cuando los geles se corren en condiciones reductoras (DTT 20 mM), estos entrecruzamientos desaparecen y ocurre la aparición o intensificación de otras bandas. Sin embargo, el perfil de bandas es muy similar al de un control de la F<sub>1</sub>I sin entrecruzar y con DTT. Existen además algunas bandas que no son sensibles a la reducción.

#### **4.2 Identificación de los productos de entrecruzamiento**

De los entrecruzamientos encontrados, se identificaron dos que son completamente reversibles y migran como complejos de 36 y 43 kDa respectivamente (Fig. 7). El peso molecular de estos productos podría dar información acerca de su identidad, sobre todo si se considera que los productos de entrecruzamiento entre la IF<sub>1</sub> (10 kDa) con las subunidades  $\gamma$  (30 kDa) y  $\epsilon$  (6 kDa) dan un tamaño similar, además de que estas subunidades son las que más modifican su intensidad con DSP y la recuperan tras la reducción con DTT.

Como se mencionó anteriormente, la identificación de los entrecruzamientos se hizo a través de la SDS-PAGE en dos dimensiones. La primera dimensión de estos geles (no reductora, - DTT) se hizo con 300  $\mu$ g de proteína por carril con el fin de separar los productos entrecruzados y contar con suficiente muestra para la 2<sup>a</sup> dimensión. Una vez que estos productos se separaron, se cortó la porción que va de 25 a 70 kDa y, para la 2<sup>a</sup> dimensión, se trató como se indica en Materiales y Métodos. Un perfil típico de estos geles es el de bandas no entrecruzadas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc.) que forman una diagonal y, abajo de esta diagonal las bandas de las proteínas que participaron en el entrecruzamiento. La

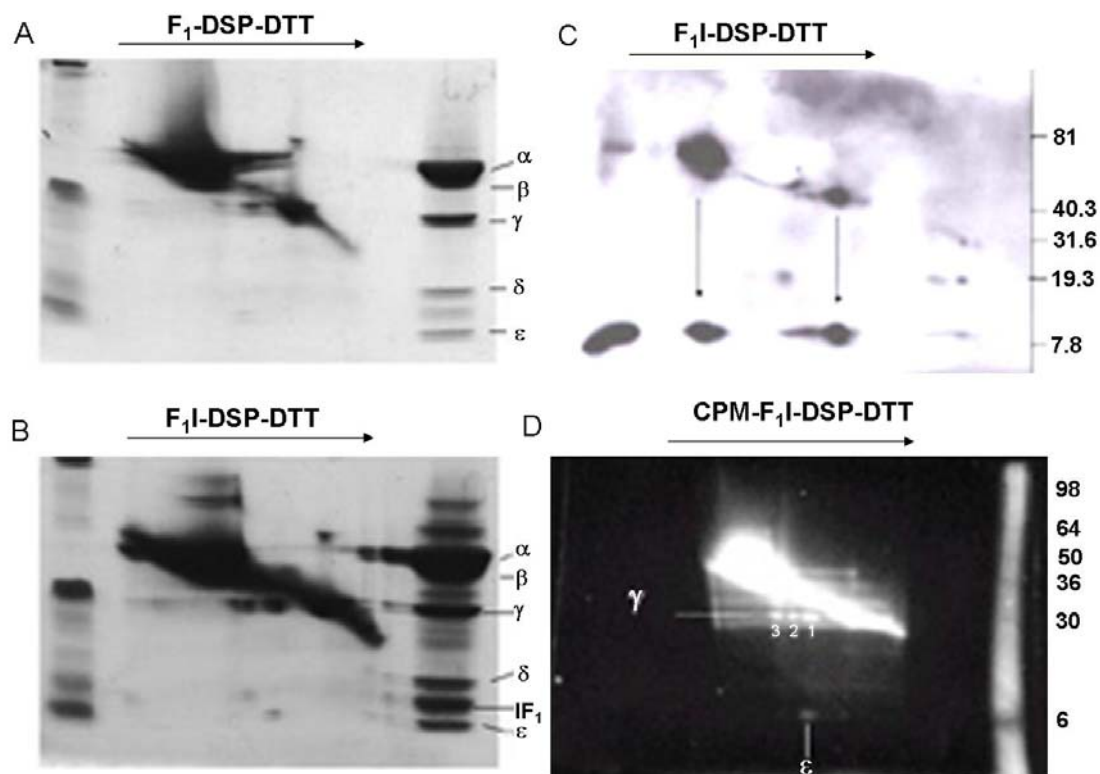


**Figura 7. Entrecruzamiento de F<sub>1</sub>I con DSP.** A) El entrecruzamiento con DSP induce la aparición de productos de entrecruzamiento. Algunas de las bandas que aparecen con el DSP (\*) desaparecen completamente tras la reducción con DTT. También ocurre la intensificación de bandas con DTT, sin embargo, lo mismo puede verse en la enzima sin entrecruzar (F<sub>1</sub>Ie DTT). B) El análisis estadístico (por el método no paramétrico de Meann Withney) de los valores densitométricos de tres experimentos diferentes muestra diferencias significativas ( $U \leq 0.05$ ) entre la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades IF<sub>1</sub>,  $\gamma$  y  $\epsilon$  tras el entrecruzamiento y, entrecruzamiento y reducción con DTT.

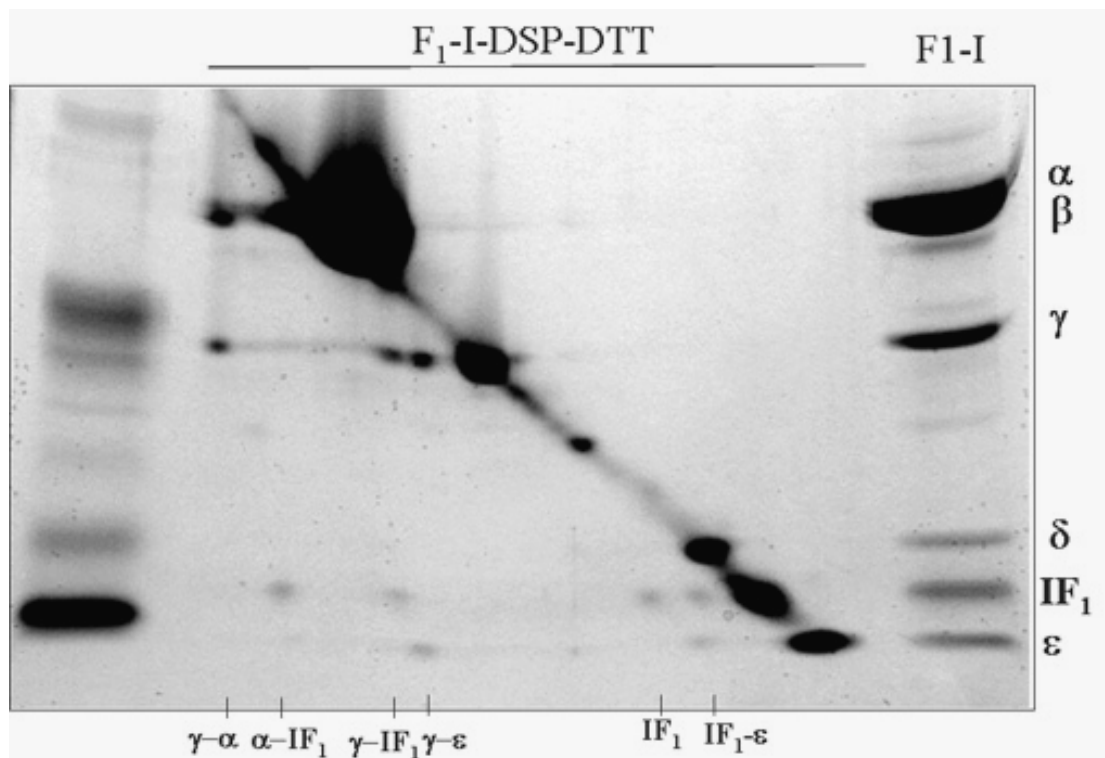
alineación de bandas y su comparación con el patrón descrito, permiten identificar a las subunidades que participan en un entrecruzamiento (Fig. 8).

En los experimentos se identificaron los productos de entrecruzamiento formados entre las subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$  y la  $IF_1$ . El control utilizado en estos experimentos fue  $F_1$  (complejo sin  $IF_1$ ); en la 2ª dimensión de estas muestras (+ DTT) es posible ver que, tras el entrecruzamiento, sólo tres bandas migran por debajo de la diagonal, dos de ellas a la altura de  $\gamma$  y, la tercera migra como  $\varepsilon$  (Fig. 8A). La otra banda de  $\gamma$  se alinea con  $\delta$ , aunque la tinción con Coomassie en esta última es muy débil. En el caso de la  $F_1$ I-DSP, además de los entrecruzamientos descritos, es posible encontrar uno adicional (Figs. 8A y 9); esto deriva en la aparición de un par de bandas, que migran y se alinean como  $\gamma$  y la  $IF_1$ . Este entrecruzamiento corresponde a uno de los productos visualizados en la 1ª dimensión (43 kDa). Aunado a lo anterior existen otros productos de entrecruzamiento con la  $IF_1$ , uno de ellos establece una relación clara con la subunidad  $\alpha$  (Fig. 9). Cuando en vez de utilizar una porción del carril entrecruzado se visualizan todos los entrecruzamientos, es posible identificar también a los de la  $IF_1$  consigo misma y con  $\varepsilon$ .

Otra manera de identificar a las subunidades fue a través de la modificación química con CPM, una molécula fluorescente que reacciona con residuos de cisteína accesibles. En el caso de la  $F_1$ I sólo las subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$ , y  $\varepsilon$  tienen este residuo (2, 1, 1, cisteínas respectivamente), lo que permitió identificar los entrecruzamientos entre estas subunidades. En estos experimentos se marcó a la  $F_1$ I con el CPM y posteriormente se entrecruzó con el DSP. El análisis de las muestras se hizo con la PAGE-SDS en 1ª y 2ª dimensión (ver Materiales y Métodos) y la visualización de las bandas marcadas se hizo con la excitación del CPM con luz UV (Fig. 8D). Como puede verse en la figura las bandas con fluorescencia forman una diagonal con las bandas marcadas de  $\alpha$ ,  $\gamma$  y sus productos de entrecruzamiento ( $\varepsilon$  no es visible, ya que en la 2ª dimensión sólo se corre la porción del carril que va de 20-100 kDa); bajo esta diagonal es posible ver tres puntos luminosos a la altura de  $\gamma$  y bajo uno de ellos, el primero de derecha a izquierda, otro punto que migra con la movilidad de  $\varepsilon$ . Las otras bandas corresponden a entrecruzamientos con la  $IF_1$  y la subunidad  $\beta$  identificados anteriormente.



**Figura 8. Identificación de los productos de entrecruzamiento.** Para la identificación de los productos de entrecruzamiento se usó SDS-PAGE en dos dimensiones. La F<sub>1</sub>I entrecruzada se corrió en una 1<sup>a</sup> dimensión no reductora para separar los productos entrecruzados; una vez separados se cortaron los carriles correspondientes y se les practicó una 2<sup>a</sup> dimensión reductora en presencia de DTT. A) Como control de estos experimentos se utilizó a la F<sub>1</sub> (sin IF<sub>1</sub>) entrecruzada; las dobles dimensiones mostraron dos bandas que migran a la altura de  $\gamma$ , una de ellas alinea con  $\epsilon$ . B) En F<sub>1</sub>I, además de estas dos bandas, hay una adicional que se alinea con la IF<sub>1</sub>. C) La identificación de IF<sub>1</sub> se comprobó por la inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti IF<sub>1</sub> donde es posible encontrar los entrecruzamientos con esta subunidad (flechas). D) El CPM es una sonda fluorescente que sólo modifica a las subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ , por lo que es posible observar los entrecruzamientos entre  $\gamma/\epsilon$  (1),  $\gamma/\alpha$  (3) y a la subunidad  $\gamma$  en el de  $\gamma/IF_1$  (2). Publicado en Minauro-Sanmiguel et al. 2002 (ver Apéndice).



**Figura 9. Identificación de los productos de entrecruzamiento en F<sub>1</sub>I.** La 2<sup>a</sup> dimensión reductora (+DTT) de F<sub>1</sub>I entrecruzada con DSP muestra que las subunidades no entrecruzadas migran en un diagonal. Las bandas debajo de ésta provienen de un producto de entrecruzamiento y se identifican por su movilidad con respecto a un estándar de enzima no entrecruzado (carril de F<sub>1</sub>I). Se identificaron al menos 6 productos: γ/α, α-IF<sub>1</sub>, γ/IF<sub>1</sub>, γ/ε, IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>, e IF<sub>1</sub>-ε. Publicado en Minauro-Sanmiguel et al., 2002 (ver Apéndice).

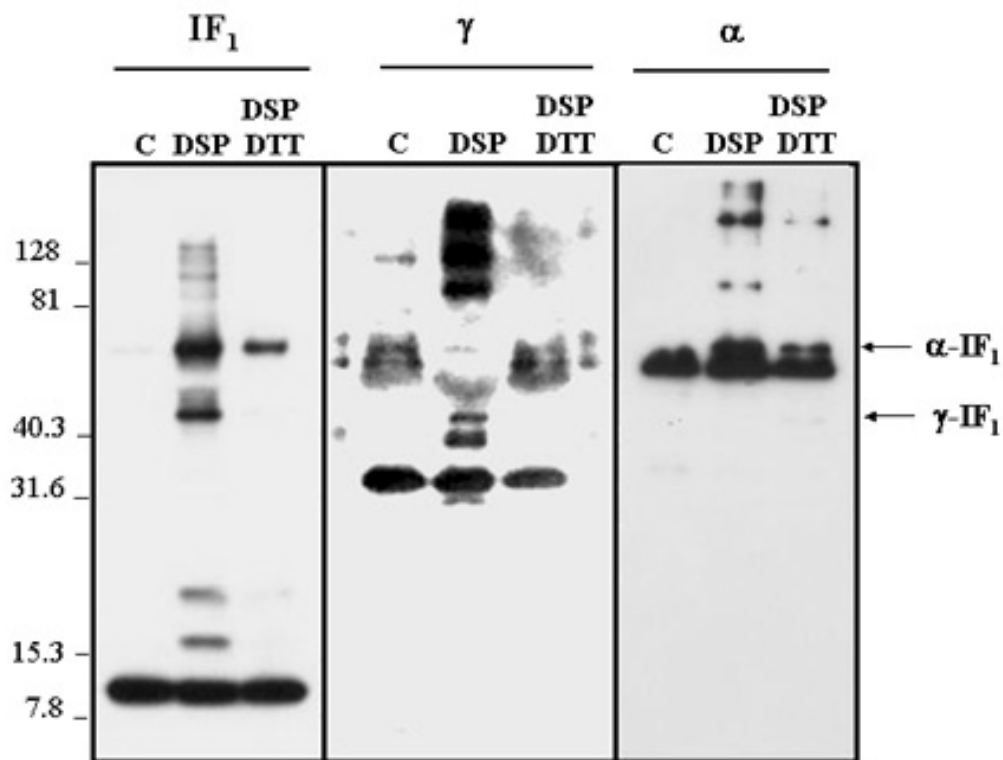
Para determinar la identidad de IF<sub>1</sub> en estos entrecruzamientos utilizamos un anticuerpo monoclonal contra IF<sub>1</sub> en ensayos de Western Blot. En estos experimentos los geles de 1<sup>a</sup> y/o de 2<sup>a</sup> dimensión se transfirieron a membranas de PVDF donde se hicieron los ensayos de inmunodetección. Con esta técnica fue posible determinar que los entrecruzamientos de 66 y 43 kDa ocurren entre la IF<sub>1</sub> y las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  (Figs. 8 y 9). El perfil de bandas inmunodetectadas en la 1<sup>a</sup> dimensión evidencia la presencia de otros entrecruzamientos con la IF<sub>1</sub>, de 16 y 20 kDa; uno de estos (20 kDa) corresponde a la forma dimérica de esta proteína (Cabezón *et al.*, 2000) y el primero con  $\epsilon$ .

En la figura 10 se muestran las inmunodetecciones adicionales con el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$  y el policlonal anti  $\gamma$ . En estos ensayos se corroboró la identidad de los entrecruzamientos de 43 y 66 kDa con  $\gamma$  y  $\alpha$  respectivamente; en estos experimentos se cargaron tres muestras en un gel para PAGE-SDS: una control (F<sub>1</sub>I), una entrecruzada (F<sub>1</sub>I-DSP) y la última entrecruzada y reducida con DTT (DSP-DTT). Esta disposición se hizo por triplicado en un mismo gel (gradiente 10-22 %), de tal forma que se pudo probar cada uno de los anticuerpos en un mismo experimento pero con ensayos de Western Blot específicos, ya que cada reacción se hizo por separado. Como puede verse en las muestras control (Fig. 10) los anticuerpos tienen reacciones positivas contra las subunidades respectivas, además de otras reacciones inespecíficas. Los perfiles de cada ensayo tienen bandas en común, principalmente en las muestras con DSP. En estos carriles aparece una banda de 43 kDa en los ensayos con IF<sub>1</sub> y  $\gamma$  (ver flechas en Fig. 10); por otro lado, el entrecruzamiento de 66 kDa sólo aparece en los ensayos con IF<sub>1</sub> y  $\alpha$ , y además muestra una reversibilidad parcial tras la reducción con DTT. Como en otros experimentos, con esta técnica es posible ver otros entrecruzamientos, algunos de los cuales se identificaron; por ejemplo, en el Western Blot con anti- $\gamma$  aparece otro entrecruzamiento de 36 kDa que, por el marcado con CPM (Fig.8), se pudo definir como una interacción con  $\epsilon$ .

#### **4.3 Entrecruzamiento de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-I con DSP**

El principal objetivo de este proyecto fue el de localizar a la IF<sub>1</sub> en la estructura cuaternaria de la enzima completa (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>), por lo que se buscaron los entrecruzamientos de F<sub>1</sub>-I en este complejo. La enzima completa se aisló de PSM e incluye a la IF<sub>1</sub>



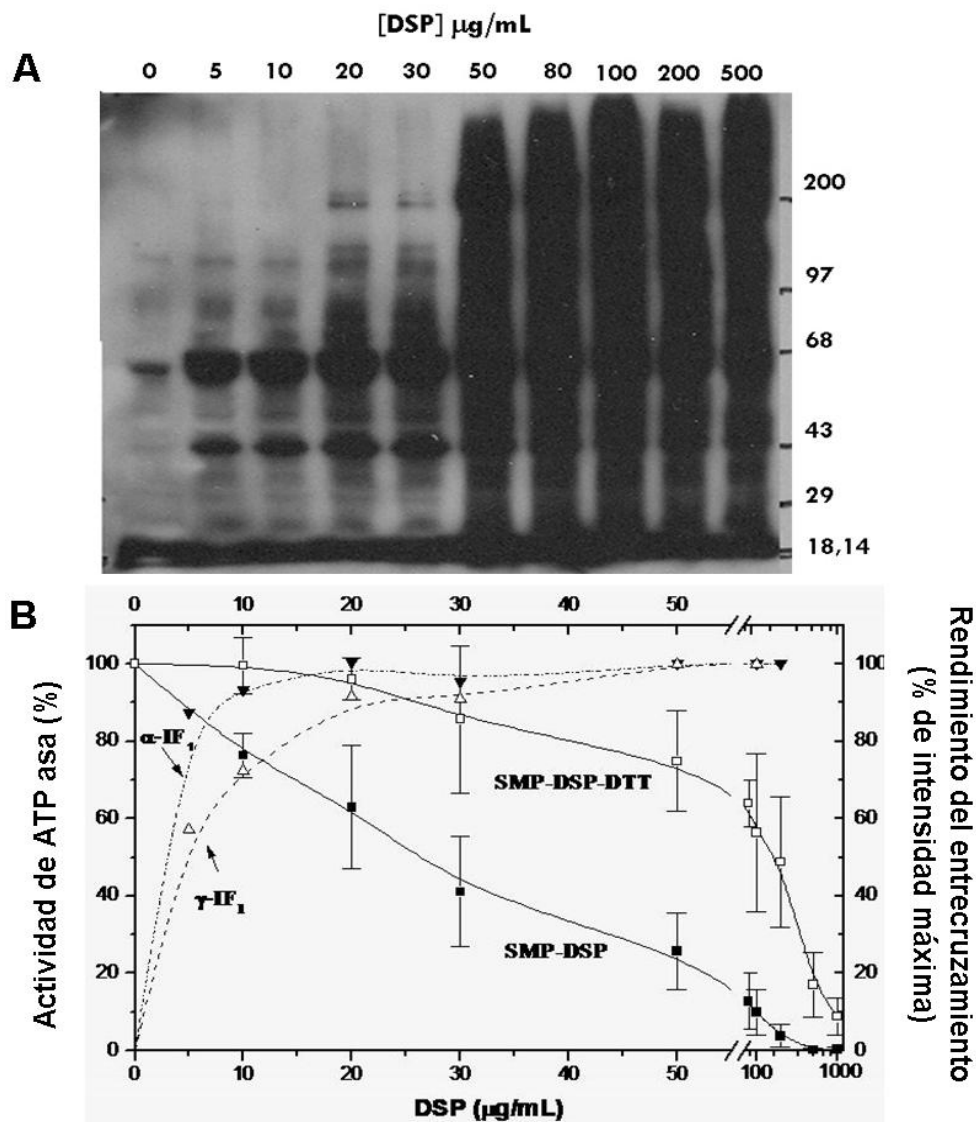


**Figura 10. Inmunodetección de subunidades en muestras de F<sub>1</sub>I entrecruzada.** Los entrecruzamientos de IF<sub>1</sub> con α y γ fueron corroborados por la inmunodetección con anticuerpos dirigidos a estas subunidades. Las bandas de reacción muestran la presencia de entrecruzamientos con las subunidades correspondientes (IF<sub>1</sub>, γ y α). El perfil de migración de los productos de entrecruzamiento entre estas subunidades es el mismo (α-IF<sub>1</sub>, γ-IF<sub>1</sub>) en la 1D SDS-PAGE. Publicado en Minauro-Sanmiguel et al., 2002 (ver Apéndice).

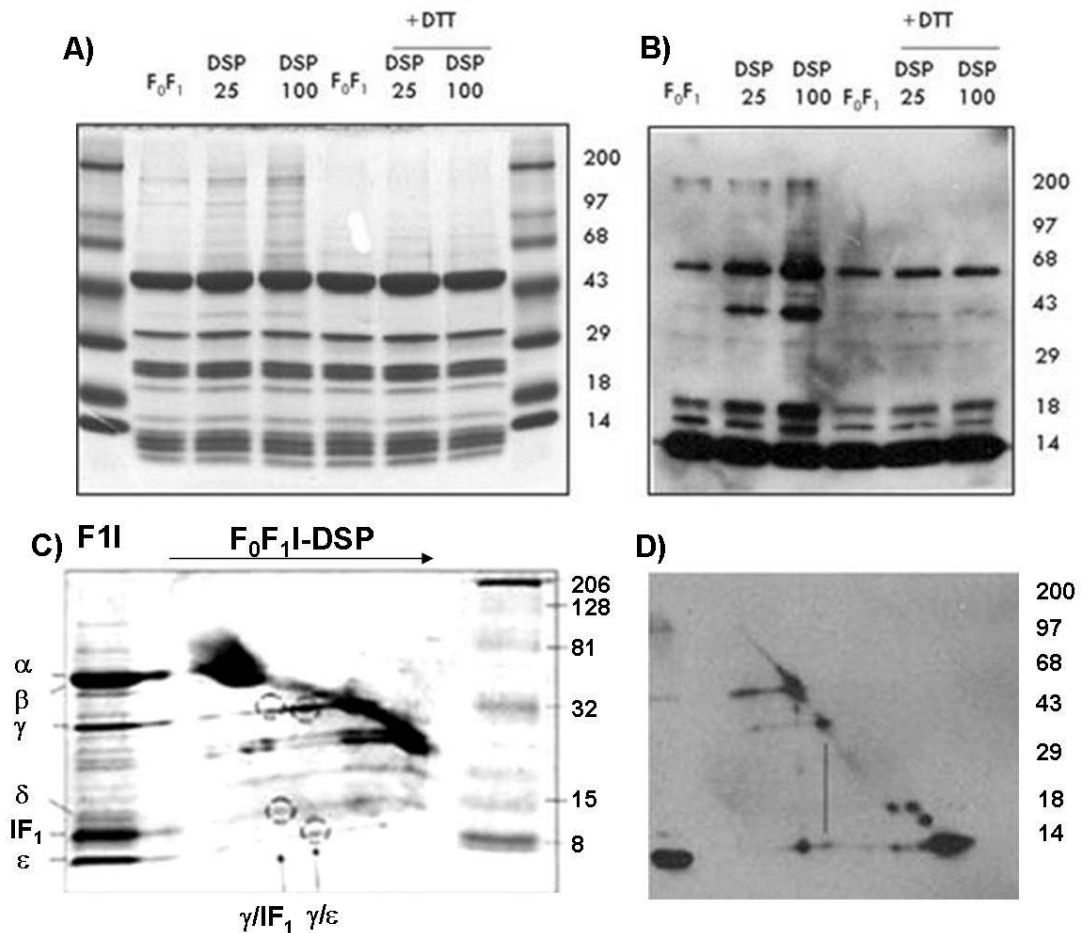
endógena en la posición que se encuentra en condiciones fisiológicas. Dado que el complejo entero incluye a las subunidades de  $F_0$ , lo primero que se hizo fue buscar las condiciones de entrecruzamiento con DSP en este sistema (Fig.11). Con esta idea se probó en un intervalo de 5-500  $\mu\text{g/mL}$  de DSP y las muestras entrecruzadas se analizaron por SDS-PAGE (-/+DTT) y por Western Blot con el anticuerpo anti- $\text{IF}_1$ . En estos experimentos se encontró que a bajas concentraciones de DSP (5-30  $\mu\text{g/mL}$ ) los productos de entrecruzamiento con  $\text{IF}_1$  se definen claramente y son reversibles con DTT (datos no mostrados); sin embargo, a concentraciones mayores de 50  $\mu\text{g/mL}$  la reversibilidad del DSP no es total y los entrecruzamientos con la  $\text{IF}_1$  se tornan altamente inespecíficos. Los entrecruzamientos que mejor se definen en este intervalo son los hechos con  $\alpha$  (66 kDa) y  $\gamma$  (43kDa), a pesar de esto es posible detectar también diferentes entrecruzamientos (bandas de menor intensidad) que reaccionan en el Western Blot. La inhibición de la activación de la enzima con el DSP se podría relacionar con entrecruzamientos inter o intra moleculares (Kandpal & Boyer 1987, Joshi & Burrows 1990) diferentes de los vistos con  $\text{IF}_1$ ; sin embargo, es importante notar que el rendimiento de los entrecruzamientos con  $\alpha$  y  $\gamma$  se incrementa progresivamente, en paralelo con la inhibición de la activación. Esto indica que los entrecruzamientos ocurren en condiciones en las que la enzima es funcional (Fig. 11). En altas concentraciones de DSP la activación se inhibe principalmente por entrecruzamientos inespecíficos que muy probablemente no ocurren con la  $\text{IF}_1$ , sino entre otras de las subunidades funcionalmente importantes como se ha observado anteriormente (Kandpal & Boyer 1987, Joshi & Burrows 1990).

#### **4.4 Entrecruzamientos de $F_1F_0$ con $\text{IF}_1$**

Para detectar específicamente los entrecruzamientos de  $\text{IF}_1$  endógeno con  $F_1F_0$ , se inmunoprecipitó el complejo entero y nativo de la enzima (Aggeler *et al.*, 2002) con un anticuerpo monoclonal que reconoce a la enzima completa. En estos experimentos se entrecruzó al complejo  $F_1F_0$  asociado a la membrana interna mitocondrial de PSM y una vez detenido el entrecruzamiento con lisina, las PSM se solubilizaron con LM como se explicó en Materiales y Métodos. El análisis de las muestras se hizo a través de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. El perfil de bandas (Fig.12) con la



**Figura 11.** Entrecruzamiento de  $F_0F_1$ . Para verificar si los entrecruzamientos de  $F_1I$  ocurren en la enzima completa, se repitieron estos experimentos en PSM. Las condiciones ensayadas fueron en el intervalo de 5-30  $\mu\text{g/mL}$  de DSP, donde su efecto es revertido por la reducción con DTT. A) Las muestras entrecruzadas con DSP fueron inmunodetectadas con un anticuerpo anti  $IF_1$  encontrándose dos bandas (43 y 65 KDa) similares a las halladas en  $F_1I$ , que reaccionan con el anticuerpo. B) La liberación de  $IF_1$  en un ensayo de activación es inhibida por el DSP ( $\square$ ), la reducción del DSP tras la adición de DTT ( $\square$ ) revierte este efecto en un 80 %. La densitometría de las bandas correspondientes a 43 y 65 KDa ( $\gamma$  y  $\alpha$ , respectivamente) muestra que en este intervalo se lleva a cabo la completa formación de estos entrecruzamientos. En el intervalo de 5-30  $\mu\text{g/mL}$  los complejos entrecruzados pueden ser separados e identificados. (Minauro-Sanmiguel et al., 2002, ver Apéndice).



**Figura 12.** Identificación de entrecruzamientos en  $F_0F_1$ . Los entrecruzamientos de la IF<sub>1</sub> en  $F_0F_1$  muestran un perfil similar al obtenido con la IF<sub>1</sub> soluble. A) La inmunoprecipitación de  $F_0F_1$  entrecruzada con DSP muestra la aparición de bandas correspondientes a subunidades entrecruzadas como puede verse por SDS-PAGE. La reducción con DTT provoca la desaparición de estas y otras bandas. B) La inmunodetección con anti IF<sub>1</sub> muestra que los entrecruzamientos de IF<sub>1</sub> con  $\gamma$  y  $\epsilon$  se reproducen en  $F_1F_0$  y son reversibles con DTT. C) La identidad de las proteínas involucradas en estos entrecruzamientos se corroboró por la 2<sup>a</sup>D SDS-PAGE en condiciones reductoras (+ DTT) de las muestras entrecruzadas, las bandas identificadas en F<sub>1</sub> también se encuentran en la enzima completa (círculos en C) y D) su inmunodetección con el anticuerpo anti IF<sub>1</sub>. Publicado en Minauro-Sanmiguel et al., 2002 (ver Apéndice).

tinción Coomassie muestra varios productos que, como en el caso de la F<sub>1</sub>I son de alto peso molecular y reversibles con DTT. En el Western Blot, usando el anticuerpo monoclonal anti IF<sub>1</sub>, se destaca una banda que aparece con el DSP y es casi completamente reversible con el DTT, esta banda contiene a la IF<sub>1</sub> enlazada con la subunidad  $\gamma$ . La identidad de los entrecruzamientos se confirmó con la PAGE-SDS en 2<sup>a</sup> dimensión. El ensayo de Western Blot con los geles resultantes pone de manifiesto la existencia de los entrecruzamientos de IF<sub>1</sub> con  $\alpha$  (66 kDa),  $\gamma$  (43 kDa) y  $\varepsilon$  (36 kDa) en el complejo inmunoprecipitado. Este experimento confirmó que los entrecruzamientos hallados en F<sub>1</sub>I no son exclusivos de este complejo y pueden hallarse en la enzima completa y nativa.

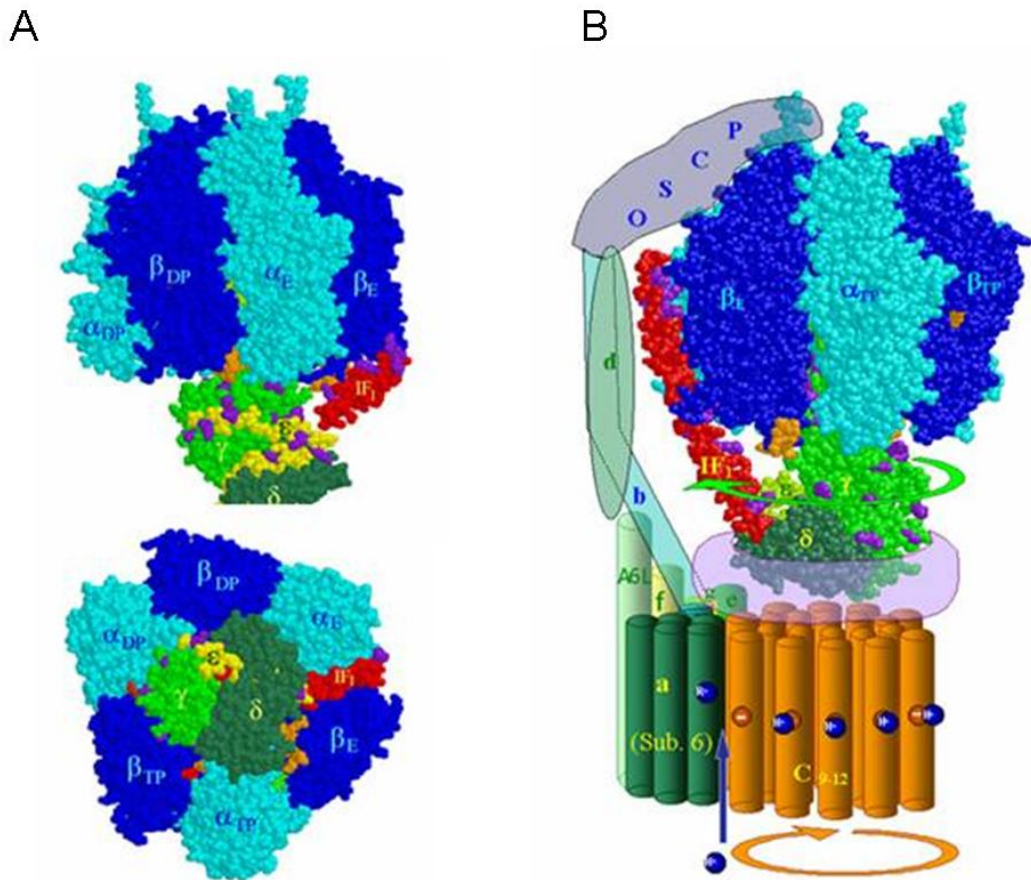
Con base en los resultados obtenidos y de acuerdo a otros trabajos de entrecruzamiento (Papa *et al.* 2000), en este trabajo se propone una localización aproximada del dominio N-terminal inhibitorio de la IF<sub>1</sub> con una interfase  $\alpha/\beta$ - $\gamma/\varepsilon$  de acuerdo con las estructuras cristalográficas de la IF<sub>1</sub> y de la F<sub>1</sub> ATPasa de bovino individuales. La parte central del modelo implica que el dominio N-terminal inhibitorio de la IF<sub>1</sub> interfiere directamente con el giro de  $\gamma$  y  $\varepsilon$  del rotor, con lo cual se propuso un mecanismo nuevo de acción de la IF<sub>1</sub> (Fig. 13). Los detalles estructurales del modelo se discutirán mas adelante.

#### **4.5 Los dímeros de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>**

En fechas recientes se describió la existencia de dímeros y otros oligómeros de la enzima (Schägger 2002). En la segunda etapa de este trabajo se analizó la estructura cuaternaria de los dímeros de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>, con miras a definir el papel de la IF<sub>1</sub> en la estructura y función de la enzima. En estos experimentos se utilizaron mitocondrias de corazón de bovino donde la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> que se analizó contiene unida a la IF<sub>1</sub> endógena.

#### **4.6 Extracción de dímeros**

La extracción de los complejos respiratorios se hizo con digitonina. La relación de digitonina/proteína usada fue de 2.5 mg/mg y se determinó a partir de curvas de solubilización de los complejos respiratorios y los dímeros de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>. Los extractos mitocondriales se analizaron por BN-PAGE (Fig.14). El perfil de bandas que se obtiene separa a los diferentes complejos respiratorios y supercomplejos; entre estos es posible



**Figura 13.** Modelo de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> con la IF<sub>1</sub> endógena. Con base en los resultados obtenidos, se elaboró un modelo estructural de la ATP sintasa con la IF<sub>1</sub> unida. Tomando en cuenta otros resultados y el mecanismo de los tres estados durante la rotación, colocamos a la IF<sub>1</sub> (rojo) en la interfase  $\alpha/\beta$  de la conformación abierta. En este modelo, la región de inhibición está próxima a la secuencia DELSEED (naranja, ver Discusión). A) En F<sub>1</sub> mostramos únicamente la región de inhibición de la IF<sub>1</sub> (rojo), los residuos de lisina (violeta) de esta región se encuentran cercanos a los propios de  $\gamma$  y  $\epsilon$  del rotor o tallo central de la enzima; como puede verse de la vista inferior, la IF<sub>1</sub> puede entrecruzar con las lisinas de  $\gamma$  o de  $\epsilon$  correctamente alineadas. Publicado en Minauro-Sanmiguel et al. 2002 (ver apéndice 1). B) En el complejo entero F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> usamos la estructura completa de IF<sub>1</sub>, esta subunidad puede tener relación con otras no identificadas de F<sub>0</sub> (López-Mediavilla et al. 1993) y por el extremo C-terminal interactúa con OSCP (Papa *et al.* 2000). Tomado de García et al., 2002.

encontrar las bandas con el monómero y oligómeros de la enzima, tal como se ha descrito anteriormente (Schägger 2002). La identificación de las bandas con  $F_1F_0$  se hizo por SDS-PAGE en 2ª dimensión (Fig. 14) donde fue posible ver que hay más de una banda con oligómeros de la enzima.

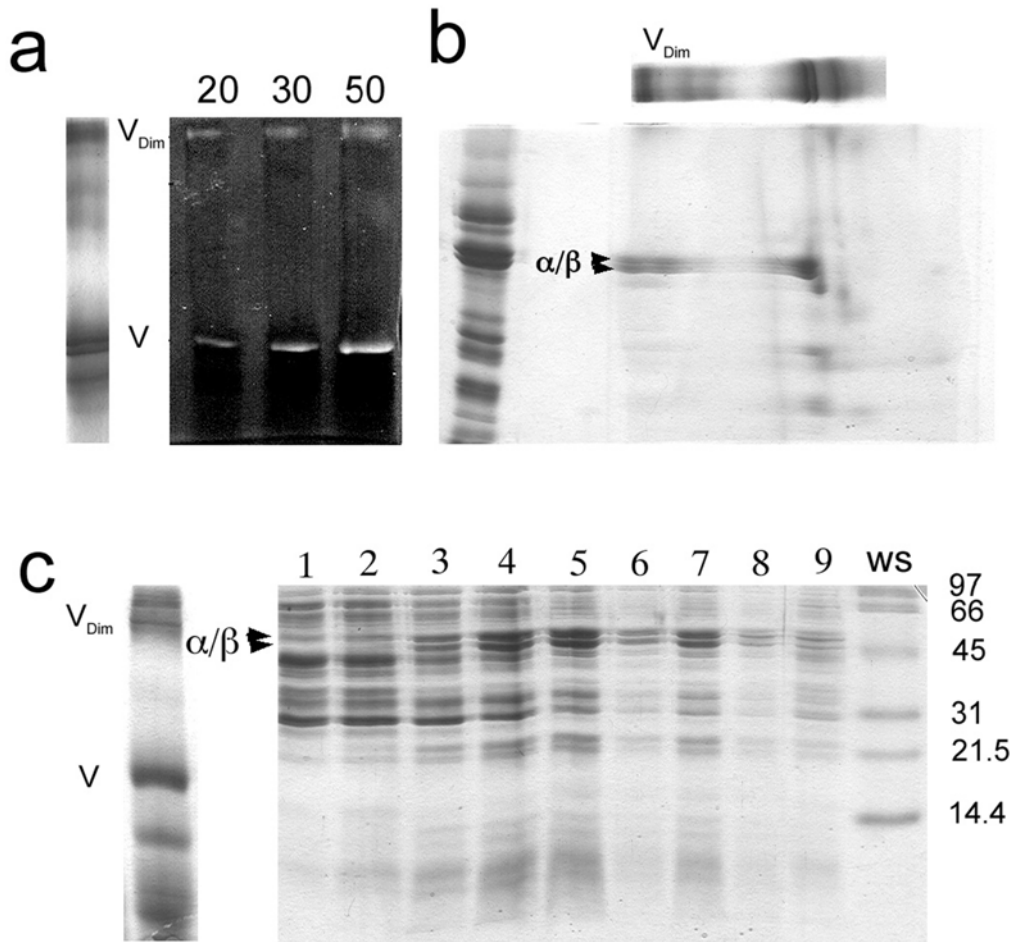
Otra forma en que identificamos a la  $F_1F_0$  en los geles nativos fué por la tinción de actividad de ATPasa como se describió en Materiales y Métodos. Las bandas con actividad coinciden con aquellas que contienen a la enzima (Fig. 14, 2ª dimensión).

Los dímeros se purificaron parcialmente por medio de centrifugación en gradiente de glicerol. Una vez que el extracto fue separado y fraccionado, se analizó por SDS-PAGE (Fig. 14). Las fracciones con  $F_1F_0$  se encuentran en la región media y hacia el fondo donde se encuentran los complejos más pesados, sin embargo, fue posible diferenciar dos fracciones con  $F_1F_0$  (fracc. 5 y 7, Fig. 14) que se analizaron por microscopía electrónica.

#### **4.7 Microscopia Electrónica**

Las fracciones que contienen a la enzima se analizaron al microscopio electrónico, para lo cual, las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo. De estas fracciones, la 7 fue la que mostró las mejores imágenes para analizar la estructura dimérica.

Para determinar la estructura de la  $F_1F_0$  dimérica se colectaron 1 130 imágenes que se analizaron por el alineamiento y clasificación de partículas asistido por computadora. En la Figura 15 se muestra el promedio obtenido de todas las imágenes colectadas después de la última alineación. En esta etapa se pueden obtener diferentes clases correspondientes a complejos con características similares. En estas imágenes se ve que los dímeros se orientan mostrando una proyección de “perfil”, perpendicular al eje longitudinal del complejo. En ninguna de las muestras analizadas se encontraron imágenes especulares, lo que sugiere que los monómeros se asocian con un eje de simetría doble que pasa a través de la interfase y es paralelo al eje mayor de la enzima.

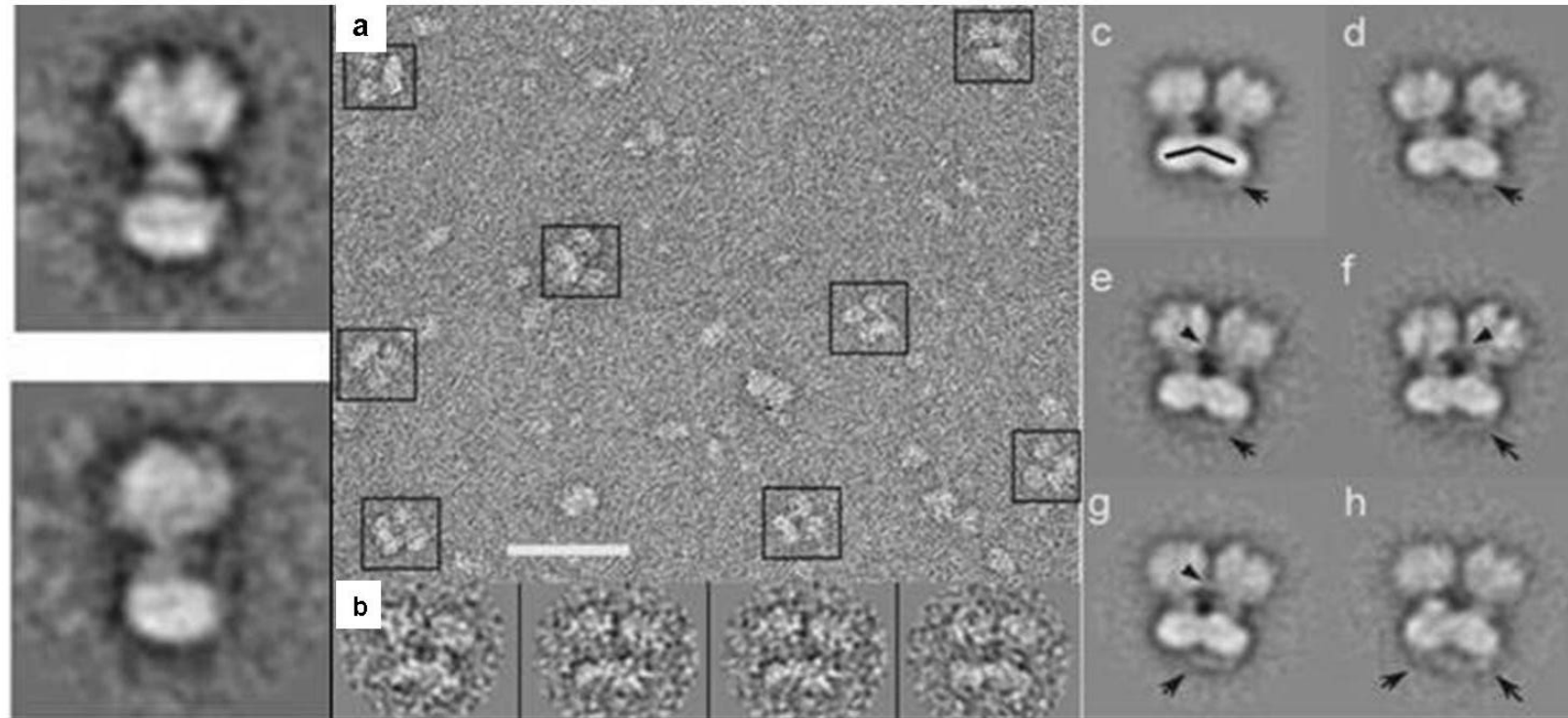


**Figura 14.** Identificación y purificación de ATP sintasa dimérica. Los extractos con digitonina fueron analizados por BN-PAGE. A) Los dímeros se identificaron por la tinción de actividad de ATP-asa en los geles obtenidos de la BN-PAGE para identificar los complejos con  $F_1F_0$ . B) Los dímeros de  $F_1F_0$  fueron también identificados por 2ª D SDS-PAGE, donde la 1ª D fue la BN-PAGE. C) La purificación de los complejos diméricos se llevó a cabo en un gradiente de glicerol. En estos gradientes se obtuvieron fracciones (fracc. 7) enriquecidas de complejos diméricos que se prepararon para su análisis en el microscopio electrónico. Publicado en Minauro-Sanmiguel y cols., 2005. (Ver apéndice).



La asociación de los monómeros involucra interacciones entre  $F_0$  y  $F_1$ . El arreglo con el que se asocian los monómeros forma un ángulo de aproximadamente  $40^\circ$ . Como puede verse en la Figura 15,  $F_0$  es la porción que más contribuye en la asociación de los monómeros y se encuentra estrechamente asociada a la  $F_0$  del otro monómero; en  $F_1$  las interacciones son más distantes, pero se encuentra claramente en contacto una con otra a través de una estructura puente que, por sus características, podría tratarse de la  $IF_1$ .

Una característica que tampoco se había visto anteriormente, es una estructura asociada por el lado de  $F_0$  que conecta a ambos monómeros por el lado del espacio intermembranal. En este momento la identidad de las subunidades que forman esta estructura se desconoce, aunque es posible que participen otras proteínas (Chen *et al.*, 2004), ya que esta estructura no se ha encontrado en el monómero de la enzima (Fig. 15).



**Figura 15. Análisis por microscopía electrónica de los dímeros de ATP sintasa.** Los dímeros purificados fueron teñidos negativamente y fotografiados en un microscopio electrónico (a). Los dímeros de la enzima fueron seleccionados (cuadros) de las micrografías, alineados y clasificados (b) por el análisis estadístico de imágenes. La estructura promedio (c) muestra algunos detalles estructurales no descritos anteriormente. El análisis estadístico de las imágenes seleccionadas muestra también diferentes proyecciones (d-h) que revelan estructuras puente en  $F_0$  (flechas) y en  $F_1$  (cabeza de flecha) que no se encuentran en el complejo monomérico (extremo izquierdo)

## 5. Discusión

La  $F_1F_0$  es un complejo multimérico con diferentes subunidades que varían de acuerdo con la fuente de extracción; dentro de estas subunidades variables se encuentra la  $IF_1$ , una subunidad que regula la hidrólisis del ATP favoreciendo su síntesis, y que se encuentra en el complejo mitocondrial de eucariontes superiores. A pesar de todo lo que se conoce de la enzima y de la  $IF_1$ , no se conoce con claridad la relación estructural de la  $IF_1$  con el resto de las subunidades, por lo que existen algunas dudas acerca de su mecanismo de función. En este trabajo se encontró que la  $IF_1$  se puede relacionar con el movimiento rotacional y tiene una posible contribución en la asociación de la  $F_1F_0$ . Un aspecto que se debe destacar es que los experimentos fueron hechos con la  $IF_1$  endógena, tal como se encuentra en el complejo nativo, mientras que la mayor parte de la información que se conoce se ha obtenido con la  $IF_1$  reconstituida, la cual puede variar la forma en que se asocia y su estequiometría (Dreyfus & Valdés 1987).

Una de las implicaciones más importantes de este estudio tiene que ver con el mecanismo de inhibición de la  $IF_1$ . Durante mucho tiempo se ha considerado que la  $IF_1$  funciona “atrapando” a los nucleótidos en los sitios catalíticos de la  $F_1$  al bloquear los cambios conformacionales de la subunidad  $\beta$ . Una de las ideas más aceptadas es que durante la respiración, el pH en el espacio intermembranal es ácido con respecto al de la matriz, donde se encuentra la  $IF_1$  y donde ocurre la síntesis de ATP. Durante la ausencia de  $O_2$ , en presencia de un desacoplante o por un decremento del  $\Delta\mu_{H^+}$ ; se favorece la hidrólisis del ATP, la disipación de protones al exterior (Rouslin 1983) y se promueve la inhibición de la actividad de ATPasa por  $IF_1$  para preservar el ATP.

La unión de  $IF_1$  depende de la presencia de Mg-ATP (el principal sustrato durante la hidrólisis). La fuerza protonmotriz o su restablecimiento favorece la síntesis de ATP; en estas condiciones ocurre el desplazamiento de la  $IF_1$  del sitio de inhibición para liberar el ATP formado, por lo que el mecanismo de acción de la  $IF_1$  podría ser impedir la liberación del producto (Pedersen *et al.*, 1981, Penin *et al.*, 1988). De acuerdo con esto, la  $IF_1$  podría unirse primero a la enzima de una forma no productiva y una vez que ocurre la hidrólisis de Mg-ATP, cambia a una orientación inhibitoria (Schwerzman & Pedersen 1986). Ahora bien, si se considera el mecanismo de tres estados, se supone que la  $IF_1$  se une a la

conformación abierta del sitio catalítico, bloquea los cambios conformacionales de la enzima y la catálisis no es posible.

En este trabajo se encontró que la IF<sub>1</sub> se asocia con F<sub>1</sub> a través de la subunidad  $\alpha$ . Esta interacción concuerda con otras descritas anteriormente (Beltrán *et al.*, 1988, Jackson & Harris 1988, Mimura *et al.* 1993) donde se determinó que la IF<sub>1</sub> está asociada en una interfase  $\alpha/\beta$ . También se sabe que en la subunidad  $\beta$  esta interacción ocurre en el extremo C-terminal (residuos 394–459) (Jackson & Harris 1988), donde se encuentra localizada la secuencia ‘DELSEED’, una región relacionada con la acción de otros inhibidores (Bullough *et al.*, 1989, Zhuo *et al.*, 1993) y que podría ser más accesible en la conformación abierta de la subunidad  $\beta$ . De acuerdo con el modelo de la catálisis rotacional sólo uno de los sitios puede estar en dicha conformación y unirse a IF<sub>1</sub>; lo cual es consistente con su estequiometría (1:1).

Además de la interacción  $\alpha/\beta$ , se han reportado otras que ocurren por el extremo carboxilo de IF<sub>1</sub>. Se ha descrito por ejemplo, un entrecruzamiento con la subunidad OSCP (Papa *et al.*, 2000) en la parte apical de la enzima completa. Dado que la mayoría de las interacciones descritas ocurren con el estator de la enzima, (Beltrán *et al.*, 1988, Jackson & Harris 1988, Mimura *et al.*, 1993) se apoya la idea de que el mecanismo de acción de la IF<sub>1</sub> se basa en el bloqueo de los cambios conformacionales.

Sin embargo, en este trabajo se encontraron productos de entrecruzamientos que no se habían descrito anteriormente y que indican que la IF<sub>1</sub> también puede interactuar con las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  en el rotor de la enzima. Esto sugiere la posibilidad de que el mecanismo de inhibición involucre también el mecanismo de rotación (Lai-Zhang *et al.*, 1999, Tsunoda *et al.*, 2001). De acuerdo con la evidencia encontrada, la IF<sub>1</sub> podría estar lo suficientemente cerca para bloquear el movimiento rotacional del tallo central; por lo que la interacción con el estator de la enzima, además de bloquear los cambios conformacionales, podría estabilizar su asociación y resistir el arrastre producido por el giro del rotor durante la hidrólisis de ATP.

De acuerdo con esto, hay evidencia obtenida con diferentes técnicas, que relaciona a la IF<sub>1</sub> con el rotor de la enzima. En estudios del decaimiento de fosforescencia (Solaini *et al.*, 1997) y transferencia de energía (FRET) (Baracca *et al.*, 2002) se demostró que la región N-terminal, donde está la región de inhibición de la IF<sub>1</sub>, está cerca de la “secuencia de

regulación” DELSEED en la subunidad  $\beta$  (Abrahams *et al.*, 1994, Baracca *et al.*, 2002). En estos experimentos se utilizaron péptidos de diferente tamaño marcados con una sonda fluorescente que se reconstituyeron a la enzima y se determinó que entre la IF<sub>1</sub> y  $\gamma$  hay una distancia de 50-60 Å. En este trabajo utilizamos al DSP, cuya distancia máxima de entrecruzamiento, cuando se encuentra totalmente extendido, es de 12 Å; por lo que la distancia a la que la IF<sub>1</sub> se encuentra de  $\gamma$  podría ser aun más corta para permitir la interacción de ambas subunidades.

Otro resultado que apoya esta idea es que la IF<sub>1</sub> también forma productos de entrecruzamiento con  $\epsilon$ , una subunidad estrechamente asociada al dominio globular de  $\gamma$  (Gibbons *et al.*, 2000) en la base del tallo central. Parte del bajo rendimiento de nuestros entrecruzamientos se puede explicar con base en este hecho, pues el DSP sólo entrecruza entre los residuos de lisina correctamente alineados con una  $\gamma$  o una  $\epsilon$ .

De esta manera, el modelo que se propone requiere que la IF<sub>1</sub> se maneje como una matraca molecular, de modo similar a la de la subunidad  $\epsilon$  en bacterias (Tsunoda *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2003, Rondelez *et al.*, 2005). La subunidad  $\epsilon$  de *E. coli* ( $\delta$  en mitocondrias de corazón de bovino) posee un dominio de hélices  $\alpha$  en su extremo carboxilo que puede encontrarse en dos conformaciones. Cuando se encuentra plegado sobre sí mismo se puede llevar a cabo la hidrólisis del ATP. Sin embargo, este extremo puede extenderse a lo largo de  $\gamma$  y alcanzar a F<sub>1</sub> por la secuencia DELSEED de la subunidad  $\beta$  e inhibirla. La subunidad  $\epsilon$  es homóloga estructural de la subunidad  $\delta$  en mitocondrias de corazón de bovino; en este complejo la extensión de las hélices está impedida por la asociación de la subunidad  $\epsilon$  (una subunidad supernumeraria del complejo mitocondrial). Dado que la estructura secundaria de IF<sub>1</sub> es helicoidal (Van Heeke *et al.*, 1993), podría emular el papel de las hélices de  $\epsilon$  extendidas para formar un complejo inhibitorio con las subunidades  $\epsilon$  (del complejo mitocondrial) y  $\beta$  (interacción con la secuencia DELSEED). Esto ocurre de manera dependiente del gradiente de protones, tal como se ha descrito para la  $\epsilon$  de *E. coli* (Turina *et al.*, 2006), por lo que la relación entre el gradiente y la inhibición por IF<sub>1</sub> o  $\epsilon$  es directa.

Hay evidencia que respalda este modelo, en estudios de fosforescencia se encontró que la IF<sub>1</sub> interactúa con la subunidad  $\epsilon$  de F<sub>1</sub> (Solaini *et al.*, 1997), cuya función no se conoce pero se le atribuye un papel en el acoplamiento de F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub>. Por otra parte, por

experimentos de entrecruzamiento se ha encontrado una interacción de IF<sub>1</sub> con subunidades de F<sub>0</sub> (López-Mediavilla *et al.*, 1993). Estos resultados muestran que la IF<sub>1</sub> podría usar diferentes conformaciones para unirse a F<sub>0</sub> o F<sub>1</sub> y ejercer su efecto inhibitorio.

Después de conocer y publicar los resultados encontrados (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002), se publicó una estructura del complejo F<sub>1</sub>I (Cabezón *et al.*, 2003) con una resolución cristalográfica de 2.8 Å. En el modelo cristalográfico la disposición de IF<sub>1</sub> con respecto a las demás subunidades indica una interacción extensa de la IF<sub>1</sub> con una interfase catalítica ( $\alpha/\beta$ ). Sin embargo, se demostró que existe un contacto directo entre algunos residuos del extremo N-terminal de la IF<sub>1</sub> con residuos de la subunidad  $\gamma$  en el corazón de la F<sub>1</sub>-ATPasa (Cabezón *et al.*, 2003). Esto implica que, además de interferir con los cambios conformacionales de las interfases catalíticas, la IF<sub>1</sub> interfiere con la rotación del cuello central de la enzima. Por otro lado, a diferencia de otras estructuras cristalográficas en las que se pueden distinguir las subunidades que forman parte del tallo central (Gibbons *et al.*, 2000), la que contiene a IF<sub>1</sub> no está completamente resuelta.

La estructura en estos cristales corresponde a dímeros de F<sub>1</sub>I, una propiedad presente solo en los complejos con IF<sub>1</sub> (Cabezón *et al.*, 2000 y Domínguez-Ramírez *et al.*, 2002); esta estructura carece de muchos detalles estructurales, sólo resuelve una porción de  $\square$  y la estructura de IF<sub>1</sub> fue resuelta parcialmente en cada monómero, la secuencia 4-40 en uno y la 4-47 en el otro (Cabezón *et al.*, 2003). La porción resuelta de IF<sub>1</sub> es la que está estrechamente asociada a F<sub>1</sub> y se encuentra en una cavidad formada por una de las interfases  $\alpha/\beta$  y la subunidad  $\gamma$  (Fig.13). Por otra parte, en el extremo C-terminal que no fue resuelto se encuentra el dominio de dimerización con otra IF<sub>1</sub>; ésta es una región muy flexible que puede efectuar cambios conformacionales importantes (Chiara *et al.*, 2002). A pesar de que las interacciones que planteamos no se corroboraron en esta estructura tampoco se excluyen. Es importante mencionar que la IF<sub>1</sub> en estos experimentos es reconstituida y podrían existir algunas diferencias con respecto a la IF<sub>1</sub> endógena y a la presencia de subunidades de F<sub>0</sub> (Dreyfus & Valdés 1987, López-Mediavilla *et al.*, 1993).

Una de las discrepancias con el modelo que proponemos es que la IF<sub>1</sub> se encuentra unida a una subunidad  $\beta$  diferente de la que se postula, el resultado es controversial pues anteriormente se determinó que la IF<sub>1</sub> endógena se une a una subunidad  $\beta$  que no une dicitohexilcarbodiimida (DCCD) (Beltrán *et al.*, 1988), mientras que en la estructura

cristalográfica reportada la IF<sub>1</sub> reconstituida se unió a la misma subunidad  $\beta$  que una DCCD. Esto abre la posibilidad de que la IF<sub>1</sub> reconstituida en F<sub>1</sub> soluble se pueda unir a distintas subunidades  $\beta$ .

En el modelo que proponemos la IF<sub>1</sub> está orientada con su extremo amino, que incluye la región de inhibición, apuntando hacia el rotor de la enzima (Fig. 13). Por otra parte en experimentos de entrecruzamiento (Papa *et al.*, 2000) se determinó que el C-terminal puede entrecruzar con la subunidad OSCP en la parte apical de la enzima, por lo que el extremo C-terminal corre en la cara externa de una interfase  $\alpha/\beta$ . La disposición de IF<sub>1</sub> en nuestro modelo se basó también en la posición de los residuos de lisina (los que reaccionan con el DSP) en las subunidades involucradas. Centrándonos particularmente en las lisinas de la secuencia de inhibición (residuos 14-47) de IF<sub>1</sub>, la lisina 24 (de IF<sub>1</sub>) es el residuo que más se ajusta con el perfil de la interacción, ya que, entre otros aspectos, es el residuo que se vuelve menos accesible tras la reconstitución a F<sub>1</sub> (Jackson & Harris 1986).

Para hacer nuestro modelo usamos el fragmento 19-47 de la estructura cristalina de IF<sub>1</sub> y la estructura más completa de F<sub>1</sub> (Gibbons *et al.*, 2001) con las subunidades del tallo central y los modelamos en el programa Ras Mol (2.6). El fragmento inhibidor se colocó en la interfase  $\alpha/\beta$  correspondiente al sitio catalítico vacío; en esta posición el fragmento se ajusta bien con esta interfase y la lisina 24 queda a distancia de entrecruzamiento (12 Å) con respecto a  $\gamma$  y  $\epsilon$ . Aunque el arreglo de la IF<sub>1</sub> pueda variar ligeramente, como ocurre en la estructura del complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> (Cabezón *et al.*, 2003), y la interfase de interacción puede ser otra, es en la conformación catalítica abierta o vacía que la secuencia DELSEED queda más expuesta, por lo que es más probable que la región de inhibición de la IF<sub>1</sub> pueda interactuar en estas condiciones e interferir así con la rotación y con la intercomunicación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . En esta posición, o en otra similar, la IF<sub>1</sub> tiene la posibilidad de realizar los cambios en su contenido de hélices  $\alpha$  necesarios para su función de inhibición. Incluso se encuentra en posibilidad de dimerizar e inducir la dimerización de F<sub>1</sub> (Cabezón *et al.*, 2003). A este respecto, la estructura cristalográfica del complejo F<sub>1</sub>I reconstituido indica que la IF<sub>1</sub> se une inicialmente a la interfase catalítica abierta, como se propone en esta tesis (Fig. 13) (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002), y posteriormente al cabo de un giro parcial del rotor, la IF<sub>1</sub> termina acomodándose en otra interfase catalítica ( $\alpha$ DP/ $\beta$ DP) (Cabezón *et al.*, 2003).

Un aspecto que no debe olvidarse y que puede ser la fuente de algunas de las discrepancias con la estructura cristalina es el papel de la fuerza protón motriz, ya que, regula la función de  $IF_1$ , puede prevenir la asociación efectiva con la ATP sintasa y favorecer la síntesis de  $F_1$  (Gómez-Puyou *et al.*, 1979, Harris *et al.*, 1979, Schwersmann & Pedersen 1981, Van De Stadt *et al.*, 1973). Por otra parte, en  $F_1F_0$  la  $IF_1$  podría interactuar con otras subunidades de  $F_0$  (López-Mediavilla *et al.*, 1993) y/o del estator, lo que otorgaría aun más resistencia al arrastre de la rotación y favorecería su asociación efectiva.

Un aspecto que es interesante destacar es la presencia de dímeros de  $IF_1$  entrecruzados (Figs. 9 y 12). La estequiometría determinada (Klein *et al.*, 1980) de  $F_1F_0$ - $IF_1$  es de 1:1, sin embargo, es posible encontrar dímeros de  $IF_1$  en todas nuestras preparaciones lo que muestra que pueden existir en el complejo nativo. La dimerización podría ser causada por varios factores, por ejemplo por la sobreexpresión con respecto a  $F_1F_0$  y/o como indicio de la dimerización de  $F_1F_0$ . Por ello en la segunda parte de este trabajo buscamos por ME la ubicación de la  $IF_1$  en los monómeros y la estructura de la  $F_1F_0$  dimérica.

La  $F_1F_0$  es una enzima que presenta un alto grado de empaquetamiento (Fernández Morán 1962) en la membrana interna mitocondrial de eucariontes, membranas de los tilacoides y la membrana plasmática de bacterias. Recientemente se ha demostrado que la  $F_1F_0$  de corazón y de levadura puede formar dímeros (Arnold *et al.*, 1998, Schägger & Pfaffner, 2000). Los dímeros de  $F_1F_0$  se han aislado de extractos solubilizados provenientes de mitocondrias (Pfaffner *et al.*, 2003, Schägger & Pfaffner 2000), algas (van Lis *et al.*, 2003), plantas superiores (Eubel *et al.*, 2004) y cloroplastos (Rexroth *et al.*, 2004). En este trabajo también se analizó por microscopía electrónica la estructura dimérica de la  $F_1F_0$  mitocondrial.

Las imágenes obtenidas muestran estructuras que no habían sido descritas anteriormente y que sólo se ven en el complejo dimérico (Fig. 15). Sin embargo, otras estructuras como la del segundo cuello de  $F_1F_0$ , que se ha descrito anteriormente con la misma técnica (Wilkens & Capaldi 1998), no se encontraron en nuestras imágenes. Esto podría deberse a dos razones: puede ser que esta estructura se encuentra oculta en la interfase de asociación de los monómeros o, que en el complejo mitocondrial la subunidad b es monómerica y no dimérica como en el complejo donde se describió el segundo cuello (Wilkens & Capaldi 1998).



En la estructura dimérica es claro que en la asociación de los monómeros hay contribuciones de  $F_0$  y  $F_1$ . De estas interacciones, las más estrechas ocurren entre las  $F_0$  asociadas. A pesar de esto, en  $F_1$  es posible observar una estructura de baja densidad (flechas en la Fig. 15) que funciona como puente y comunica a ambos monómeros. En esta estructura deben estar involucrados diferentes elementos de  $F_1$ . Sin embargo, las imágenes muestran lo que podrían ser dos estructuras alargadas en la interfase que cruzan de un lado a otro de los monómeros. Aunque esta densidad podría reflejar varias cosas y estar formada de varias subunidades, sólo la  $IF_1$  tiene características que correlacionan con este fenómeno; a pesar de que la  $IF_1$  no es una subunidad esencial para la dimerización (Tomasetig *et al.*, 2002, Dienhart *et al.*, 2002) los dímeros de  $IF_1$  forman una estructura alargada que induce la dimerización y conecta dos monómeros de la  $F_1$  soluble (Cabezón *et al.*, 2003, Domínguez-Ramírez *et al.*, 2001). Por otra parte, en un trabajo colateral, hemos demostrado que la sobreexpresión o reconstitución de la  $IF_1$  puede incrementar el contenido de dímeros de  $F_1F_0$  y modificar así la relación monómero/dímero en extractos mitocondriales de hígado de rata (Bravo *et al.*, 2004, ver apéndice 2) y de corazón de bovino (García *et al.* 2006). En experimentos de desnaturalización por presión la  $IF_1$  confiere estabilidad a la enzima completa (Fornells *et al.*, 1998). De esta manera, si bien la  $IF_1$  no es indispensable en la oligomerización de la enzima, funciona como un factor de estabilización que la favorece la dimerización del complejo  $F_1F_0$  en la membrana interna mitocondrial.

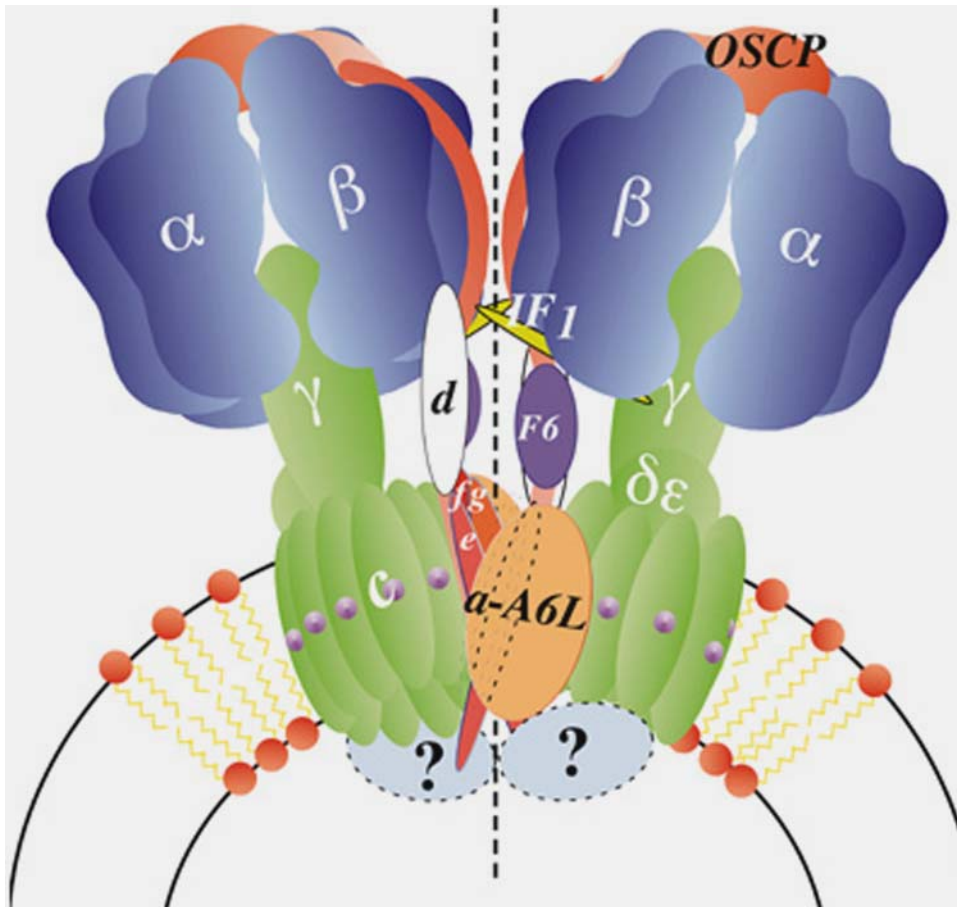
Como se propuso anteriormente, las interacciones más estrechas e importantes ocurren a nivel de  $F_0$ . En esta interfase deben estar involucradas varias subunidades. Con base en la literatura existente hasta el momento, se puede señalar que la principal aportación está dada por las subunidades e y g, lo que supone un papel relevante en la formación y estabilización de los complejos diméricos. En ausencia de estas subunidades, principalmente de la subunidad e, no es posible la dimerización. En mitocondrias de levadura que carecen únicamente de la subunidad g (Brunner *et al.*, 2002, Paumard *et al.*, 2002) es posible recuperar solamente una pequeña cantidad de dímeros. En las imágenes analizadas se encontró una característica nueva que nunca se había descrito en el monómero de  $F_1F_0$ ; en el complejo dimérico, la porción de  $F_0$ , además de la interfase de interacción con otro

monómero, cuenta con una estructura que se proyecta por el espacio intermembranal y conecta a las dos  $F_0$  que participan en la dimerización.

La identidad de la(s) subunidad(es) que forma(n) esta conexión se desconoce hasta este momento. Lo más probable es que se trate de alguna de las subunidades dímero específicas, como la subunidad e y/o la g. La subunidad e tiene por el extremo N-terminal la secuencia GXXXG, que se asocia con el empaquetamiento y homodimerización de hélices transmembranales (Russ & Engelman 2000). El extremo C-terminal, que es soluble, tiene otra secuencia que puede formar un trenzado de hélices  $\alpha$  y puede asociarse con diferentes subunidades o consigo misma (Everard-Gigot *et al.*, 2005). El extremo C-terminal se encuentra en el espacio intermembranal, por lo que puede contribuir a la densidad óptica de la estructura puente que se visualiza en las imágenes (Fig.15). Este puente puede ser en realidad la contribución de más subunidades que forman un complejo. Otra subunidad que podría estar asociada por el lado del espacio intermembranal es la subunidad k, sin embargo, esta subunidad sólo se ha descrito en levadura y no se conoce si ésta u otra exista en mitocondrias de bovino.

Tampoco se puede descartar la participación de otras proteínas, como el acarreador de adenil nucleótidos (ANT) que se puede encontrar asociado a la enzima (Aggeler *et al.*, 2002). De hecho la  $F_1F_0$  puede estar asociada en un complejo con un acarreador de Pi y uno de ANT para formar el sintasoma (Chen *et al.*, 2004), por lo que ambas proteínas podrían contribuir a la formación de este complejo-puente en  $F_0$ . A pesar de que en ausencia de la subunidad e desaparecen los complejos diméricos y la forma de las crestas mitocondriales (Arselin *et al.*, 2002), es interesante notar que *in vivo* pueden existir otras asociaciones estructurales (Gavin *et al.*, 2005), lo que es congruente con la observación de que hay  $F_1F_0$  mitocondrial dimérica tras la generación de puentes disulfuro entre subunidades b (Spannagel *et al.*, 1998).

A partir de nuestras observaciones y la información que se conoce hasta el momento se construyó un modelo del complejo dimérico (Fig. 16). En este modelo se colocaron los monómeros en la disposición con que se encontraron en las imágenes analizadas. La distribución de subunidades se hizo con base en la información existente hasta el



**Figura 16. Estructura y modelo del complejo dimérico de la ATP sintasa mitocondrial.** La asociación de los monómeros en el complejo dimérico es angular ( $40^\circ$  con respecto al eje longitudinal). A) Se colectaron 1130 imágenes individuales que se orientaron, alinearón y promediaron en varias familias para generar esta estructura promedio. Se muestra la forma cónica del complejo y los dos novedosos puentes proteicos  $F_1$ - $F_1$  y  $F_0$ - $F_0$  que se observaron en esta estructura. B) Con base en otros datos, se colocó a las subunidades dímero específicas e y g en la interfase de asociación. La disposición de las demás subunidades se hizo de acuerdo a la literatura existente. En nuestro modelo podemos observar una estructura puente (?) en la base del complejo ( $F_0$ ) de identidad desconocida, y otra por  $F_1$ , que podría tratarse de la  $IF_1$  (de la cual solo se representa el fragmento de inhibición). (Minauro-Sanmiguel et al., 2005, ver Apéndice).

momento (Belogradov *et al.*, 1996). De esta manera, las subunidades dímero-específicas e y g se encuentran en la interfase del complejo (la subunidad e puede formar dímeros consigo misma), cerca de las subunidades a y b en la base del tallo periférico. En la base del complejo dimérico se encuentra una estructura puente cuya identidad se desconoce y que puede estar formada de más proteínas. Este puente puede reforzar la interfase de  $F_0$  y contribuir a la estabilidad del complejo dimérico.

Una de las características más importantes del complejo dimérico es la forma cónica en que se asocian los monómeros; este hecho es consistente con los modelos de biogénesis de las crestas mitocondriales que se han propuesto anteriormente (Allen 1995, Paumard *et al.*, 2004, Arselin *et al.*, 2003). La importancia de la forma del complejo es muy relevante, ya que en experimentos de fusión a proteínas fluorescentes (Gavin *et al.*, 2004), en los que se favorece un arreglo tetramérico de la ATP sintasa, las crestas mitocondriales se deforman como consecuencia de la ruptura del arreglo dimérico. En nuestro modelo los dímeros se asocian formando un ángulo de aprox.  $40^\circ$ , lo cual es congruente con el arreglo de crestas mitocondriales tubulares (Allen 1995). En este caso la forma cónica es importante, pues puede provocar brotes de la membrana interna que posteriormente y tras la adición de más complejos y/o otras proteínas, forma este tipo de crestas. En el complejo de levadura, la interrupción de genes de las subunidades e, g y k ha llevado a modelos semejantes (Paumard *et al.*, 2004, Arselin *et al.*, 2003). Sin embargo, en este caso se plantea la existencia de dos interfases diferentes, una que ocurre entre las subunidades e y g, y la restante involucra a la subunidad b, lo que permite más posibilidades de polimerización. Con todo esto se puede decir que la dimerización de la  $F_1F_0$ , además de su papel transductor, tiene un papel estructural en la morfología de las crestas mitocondriales, pues estas dependen de la formación de dímeros y otras especies oligoméricas para formarse y plegarse correctamente.

Es importante mencionar que la solubilización con digitonina extrae también varios oligómeros de  $F_1F_0$  (Fig. 14) y varios de ellos muestran actividad de ATP-asa. Esto sugiere que la oligomerización es un elemento constitutivo y biológicamente funcional en la organización estructural de la membrana interna (Krause *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que el estado oligomérico puede mantener al potencial de membrana mediante

la formación de microdominios, lo que además asegura un manejo bioenergético de la mitocondria más eficiente (Bornhövd *et al.*, 2006).

Por último, en la interfase soluble de nuestro modelo colocamos a la IF<sub>1</sub> y otras subunidades supernumerarias. La IF<sub>1</sub> puede cruzar de un lado a otro en el complejo dimérico y poner en contacto las porciones F<sub>1</sub>; su extremo N-terminal está orientado hacia el rotor de la enzima y el C-terminal hacia la otra F<sub>1</sub>. Es interesante notar que el C-terminal puede entrecruzar con la subunidad OSCP, lo que puede indicar que están en contacto (Papa *et al.*, 2000). Esto supone un papel adicional en la optimización de la regulación a través de la IF<sub>1</sub> (o la Inh1p en el caso del complejo de levadura), considerando que esta proteína puede unirse a dos sectores de F<sub>1</sub> para prevenir la hidrólisis de ATP (Cabezón *et al.*, 2000, Dienhart *et al.*, 2002). Aunque la relevancia fisiológica de la dimerización no es completamente clara, se puede considerar que, en general, confiere estabilidad a la enzima y optimiza su función, ya que, se sugiere que puede existir una reducción del arrastre impuesto por el giro del rotor en el complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> completo (Rexroth *et al.*, 2004).

Después de la publicación de estos datos (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005) han aparecido otras dos estructuras diméricas obtenidas por microscopía electrónica. Ambas muestran varias diferencias que ponen de manifiesto las diferencias estructurales de estos complejos. Los dímeros de *Pollytomella* (Dudkina *et al.*, 2005) muestran diferencias notables con nuestro modelo, pero cabe mencionar que este complejo es atípico pues posee subunidades supernumerarias (como la MASAP) que se asocian al tallo periférico, lo que provoca una mayor curvatura del complejo y la visualización del segundo cuello. En el caso de los complejos obtenidos de levadura (Dudkina *et al.*, 2006), las extracciones se hicieron con altas concentraciones de digitonina, lo cual resta confiabilidad a las estructuras obtenidas. En ese trabajo, a pesar de que una de las estructuras diméricas es muy similar a la de bovino, carece de las estructuras puente que nosotros encontramos. Además es conveniente señalar que la IF<sub>1</sub> de levadura es distinta a la de bovino. La estructura que nosotros resolvimos es la que se obtiene en condiciones más suaves y representa la base estructural de las crestas mitocondriales. Por último, cabe señalar que a diferencia de los dímeros aislados por los otros grupos, el dímero de la ATP sintasa bovina en el trabajo referido en esta tesis muestra una actividad de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa acoplada, sensible a oligomicina y a la remoción de la IF<sub>1</sub> endógena. Esto implica que esta preparación, que muestra una

geometría cónica de  $40^\circ$ , tiene un funcionamiento acorde con su papel biológico, en la optimización del funcionamiento rotacional de la ATPsintasa y en la formación de las crestas mitocondriales.

## 6. Conclusiones

Los datos de entrecruzamiento encontrados y el modelo estructural derivado de estos y otros datos, apoyan la propuesta de que la IF<sub>1</sub> puede interferir en la rotación como parte del mecanismo de inhibición. Esta función podría apoyarse en el bloqueo de los cambios conformacionales y/o en emular una función como la de la subunidad  $\epsilon$  en *E. coli* para actuar como una “matraca” molecular. Es importante determinar el efecto de IF<sub>1</sub> en la rotación y en los cambios conformacionales que puede sufrir la enzima completa, para inhibir la hidrólisis y favorecer la síntesis de ATP.

Las imágenes de microscopía electrónica de la enzima muestran el arreglo geométrico de dos monómeros en el complejo dimérico. Los datos indican que ambos monómeros están vinculados por dos estructuras puente en cada una de las porciones de la enzima. La unión en la porción F<sub>1</sub> podría estar dada por la IF<sub>1</sub> que tiene características dimerizantes y podría conferir más estabilidad al complejo dimérico. La asociación de los monómeros ocurre de manera angular, lo que confiere una geometría cónica al complejo dimérico, esta forma y la curvatura que produce podría cumplir un papel central en la formación de las crestas mitocondriales, las cuales son estructuras diseñadas para empaquetar e incrementar la superficie disponible para la fosforilación oxidativa. Se requiere de estudios adicionales para definir la identidad de las estructuras puente y para confirmar el papel de los dimeros en la biogénesis de las crestas mitocondriales.

## 7. Referencias

- Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R., y Walker J.D.** (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-628.
- Aggeler R., Haughton M.A., y Capaldi R.** (1995) Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the beta subunits and the gamma and epsilon subunits of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. Structural implications and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 270:9185-9191.
- Aggeler R., y Capaldi R.A.** (1996) Nucleotide-dependent movement of the epsilon subunit between alpha and beta subunits in the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type ATPase. *J. Biol. Chem.* 271:13888-13891.
- Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S.W., Gosh, S. S., García, J.J., Capaldi, R., y Marusich, M** (2002) A functionally active human F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies. *J. Biol. Chem.* 277: 33906-33912.
- Allen R. D.** (1995) Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma* 189: 1-8.
- Arnold I., Pfeiffer K., Neupert W., Stuart R.A., y Schagger 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 M.F., Dautant A., Brethes D., y 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.
- Baracca A., Barogi S., Paolini S., Lenaz G., y Solaini G.** (2002) Fluorescence resonance energy transfer between coumarin-derived mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase gamma subunit and pyrenylmaleimide-labelled fragments of IF<sub>1</sub> and c subunit. *Biochem. J.* 362:165-71.
- Beltran C., Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Puyou M.** (1988) Binding of dicyclohexylcarbodiimide to a native F<sub>1</sub>-ATPase-inhibitor protein complex isolated from bovine heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152: 867-873.



**Belogradov G.I., Tomich J.M., y Hatefi Y.** (1996) Membrane topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g. *J. Biol. Chem.* 271:20340-5.

**Bianchet M. A., Pedersen P.L., y Amzel M.** (2000) Notes on the mechanism of ATP synthesis. *J. Bioener. Biomembr.* 32: 517-521.

**Bianchi C., Genova M.L., Parenti Castelli G. y Lenaz G.** (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* 279:36562-36569.

**Boumans H., Grivell L.A., y Berden J.A.** (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J. Biol. Chem.* 273:4872-4877.

**Bornhövd C., Vogel F., Neupert W., y Reichert A.S.** (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.

**Boyer P. D.** (1993) The binding change mechanism for ATP synthase-some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 215-220.

**Bravo C., Minauro-Sanmiguel F., Morales-Ríos E., Rodríguez-Zabala J.S. y García, J.J.** (2004) Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36:257-264

**Brunner S., Everard-Gigot V., y Stuart R.A.** (2002). Structure of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase forms homodimers. *J. Biol. Chem.* 277:48484-48489.

**Bulgyn V.V., Duncan T.M., y Cross R.L.** (1998) Rotation of the epsilon subunit during catalysis by *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 273:31765-9.

**Bullough D.A., Ceccarelli E.A., Verburg J.G., y Allison W.S.** (1989) Localization of sites modified during inactivation of the bovine heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase by quinacrine mustard using [3H]aniline as a probe. *J. Biol. Chem.* 264:9155-63.

**Cabezón E., Butler P.J., Runswick M.J., y Walker J.E.** (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein, IF<sub>1</sub>, by pH. *J. Biol. Chem.* 275:25460-2464.

**Cabezón E., Montgomery M.G., Leslie A.G., y Walker J.E.** (2003) The structure of bovine F<sub>1</sub>-ATPase in complex with its regulatory protein IF<sub>1</sub>. *Nat. Struct. Biol.* 10:744-750.

**Chen C., Ko Y., Delannoy M., Ludtke S.J., Chiu W., y Pedersen P.L.** (2004) Mitochondrial ATP Synthasome: Three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* 279:31761-31768.

**Cintron N.M., y Pedersen P.L.** (1979) A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 254: 3439-3443.

**De Chiara C., Nicastro G., Spisni A., Zanotti F., Cocco T., y Papa S.** (2002) Activity and NMR structure of synthetic peptides of the bovine ATPase inhibitor protein, IF<sub>1</sub>. *Peptides* 23:2127-2141.

**Dianoux A.C., Vignais P.V., y Tsugita A.** (1981) Partial proteolysis of the natural ATPase inhibitor from beef heart mitochondria. Isolation and characterization of an active cleavage product. *FEBS Lett.* 130:119-123.

**Dianoux A.C., Tsugita A., Klein G., y Vignais P.V.** (1982) Effects of proteolytic fragmentations on the activity of the mitochondrial natural ATPase inhibitor. *FEBS Lett.* 140:223-228.

**Dienhart M., Pfeiffer K., Scagger H., y Stuart R.A.** (2002) Formation of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J. Biol. Chem.* 277:39289-95.

**Fillingame R.H. y Dmitriev O.Y.** (2002) Structural model of the transmembrane F<sub>0</sub> rotary sector of H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking *in situ*. *Biochim. Biophys. Acta* 1565: 232-245.

**Domínguez-Ramírez L., Mendoza-Hernández G., Cárabez-Trejo A., y Gómez-Puyou M.** (2001) Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F<sub>1</sub>-inhibitor protein complexes *FEBS Lett.* 507: 191-194

**Dreyfus G, Gómez-Puyou A., y Tuena de Gómez Puyou M.** (1981) Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATP ase inhibitor protein from mitochondria

ATPase as detected by antibodies against the inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:400-406.

**Dreyfus G. y Valdés A.M.** (1987) Structural and functional differences in H<sup>+</sup> ATPases with native and reconstituted Inhibitor protein. *Biochem. Int.* 15: 459-466

**Duncan T.M., Bulygin V.V., Zhou Y., Hutcheon M.L., y Cross R.L.** (1997) Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:10964-10968.

**Dudkina N.V., Heinemeyer J., Keegstra W., Boekema E.J., y Braun H.P.** (2005) Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* 579:5769-72.

**Dudkina N.V., Sunderhaus S., Keegstra W., Braun H.P., y Boekema E.J.** (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* 580:3427-32.

**Eubel H., Heinemeyer J., Sunderhaus S., y Braun H.P.** (2004) Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant. Physiol. Biochem.* 42:937-942.

**Everard-Gigot V., Dunn C.D., Dolan B.M., Brunner S., Jensen R.E., y Stuart R.A.** (2005). Functional analysis of subunit e of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot. Cell.* 4:346-55.

**Fernández-Morán H.** (1962) Cell membrane ultrastructure: low-temperature electron microscopy and x-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulation* 26: 1039-1065.

**Fornells L.A., Guimaraes-Motta N., Neheme J.S., y Silva J.L.** (1998) Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 349:304-312

**Frey T.G. y Manella C.A.** (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25:319-324.

**García, J.J.** (2004). Metabolismo cardiaco: “Fosforilación oxidativa y ATP sintetasa”. Coordinadora: Dra. Guadalupe Baños de MacCarthy. En: “El comportamiento del miocardio en la isquemia y la reperfusión”. Editores: Dr. Sergio Mario Férrez Santander y Dr. Eulo Lupi Herrera. Elsevier España S.A. ISBN: 84-8174-778-5. pp 129-149.

**García Trejo, J.J.** (2006) Estructura, rotación, regulación y dimerización de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa mitocondrial". En "La Física Biológica en México. Editores. Leopoldo García-Colín S., Pedro Miramontes, Arturo Rojo y Leonardo Dagdug. Publicado y editado por El Colegio Nacional. ISBN: 970-640-317-5. pp 121-135.

**García J.J., Tuena de Gómez-Puyou M., y Gómez-Puyou A.** (1995) Inhibition by trifluoperazine of ATP synthesis and hydrolysis by particulate and soluble mitochondrial  $F_1$ : competition with  $H_2PO_4^-$ . *J. Bioenerg. Biomembr.* 27: 127-136.

**García J.J., Ogilvie I., Robinson B.H., y Capaldi R.A.** (2000) Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in  $\rho(0)$  cells completely lacking *mtDNA*. *J. Biol. Chem.* 275: 11075-11081.

**García J.J., Minauro-Sanmiguel F., y Bravo C.** (2002) "Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6." En: *Recent Research Developments in Human Mitochondrial Myopathies*". Vol. 1. Editor: **García J.J.** Research Signpost . Trivandrum, India. pp 127-150.

**García J.J., Morales-Ríos E., Cortés-Hernández P., Rodríguez-Zavala J.S.** (2006) The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial  $F_1F_0$ -ATP synthase. *Biochemistry* 45:12695-12703.

**Gavin P.D., Prescott M., Luff S.E., y Devenish R.J.** (2004) Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae. *J. Cell Sci.* 117:2333-43.

**Gavin P.D., Prescott M., y Devenish R.J.** (2005)  $F_1F_0$ -ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37:55-66.

**Gibbons C., Montgomery M.G., Leslie A.G.W., y Walker J.E.** (2000) The structure of the central stalk in bovine  $F_1$ -ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7:1055-61.

**Gilkerson R.W., Margineantu D.H., Capaldi R.A., y Selker J.M.L.** (2000) Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett.* 474:1-4.

**Gilkerson R.W., Selker J.M., y Capaldi R.A.** (2003) The cristae membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 546:355-358.

- Giraud M.F., Paumard P., Soubannier V., Vaillier J., Arselin G., Salin B., Schaeffer J., Brethes D., di Rago J.P., y Velours J.** (2002) Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim. Biophys. Acta* 1555:174-180.
- Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Puyou M., y Ernster L.** (1979) Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta* 547: 252-257.
- Krause F., Kilbienski I., Mulisch M., Rodiger A., Schafer A., y Krupinska K.** (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:583-90.
- Hackenbrock C.R.** (1966) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* 30: 269–297.
- Hashimoto T., Negawa Y., y Tagawa K.** (1981) Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase--stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J. Biochem. (Tokyo)* 90: 1151-1157.
- Horstman L.L., y Racker E.** (1970) Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. XXII. Interaction between mitochondrial adenosine triphosphatase inhibitor and mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 245:1336-1344.
- Husain I., Jackson P.J., y Harris D.A.** (1985) Interaction between F<sub>1</sub>-ATPase and its naturally occurring inhibitor protein. Studies using a specific anti inhibitor antibody. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 64-74.
- Jackson P.J. y Harris D.A.** (1986) Sites of protein-protein interaction on the mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein. *Biochem. J.* 235:577-83.
- Jackson P.J. y Harris D.A.** (1988) The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F<sub>1</sub> beta-subunit. *FEBS Lett.* 229: 224-228.
- Joshi S. y Burrows R.** (1990) ATP synthase complex from bovine heart mitochondria. Subunit arrangement as revealed by nearest neighbor analysis and susceptibility to trypsin. *J. Biol. Chem.* 265:14518-25.

**Kandpal R.P. y Boyer P.D.** (1987) Escherichia coli F1 ATPase is reversibly inhibited by intra- and intersubunit crosslinking: an approach to assess rotational catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 890:97-105.

**Klein G., Satre M., Dianoux A. C., y Vignais P.V.** (1980) Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14C) isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* 19: 2919-2925

**Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

**Lai-Zhang J., Xiao Y., y Mueller D.M.** (1999) Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F1-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 18:58-64.

**Lebowitz M.S., y Pedersen P.L.** (1993) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence, overexpression, and secondary structural characterization of a functional protein inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 64-70.

**Lopez-Mediavilla C., Vigny H., y Godinot C.** (1993) Docking the mitochondrial inhibitor protein IF1 to a membrane receptor different from the F1-ATPase beta subunit. *Eur. J. Biochem.* 215: 487-496.

**Lowry O.H., Rosengrough N.J., Farr A.L., y Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

**Meier T., Yu J., Raschle T., Henzen F., Dimroth P., y Muller D.J.** (2005) Structural evidence for a constant c11 ring stoichiometry in the sodium F-ATP synthase. *FEBS J.* 272:5474-83.

**Mimura H., Hashimoto T., Yoshida Y., Ichikawa N., y Tagawa K.** (1993) Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between alpha- and beta-subunits of F1F0 ATPase upon de-energization of mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* 113:350-4.

**Minauro-Sanmiguel F., Bravo C., y García J.J.** (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein with rotor ( $\gamma,\epsilon$ ) and stator ( $\alpha$ ) subunits of mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34: 433-443.

- Minauro-Sanmiguel F., Wilkens S., y García J.J.** (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.
- Noji H., Yasuda R., Yoshida M., y Kinoshita K.** (1997) Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 386:299-302.
- Norling B., Tourikas C., Hamsur B., y Glaser E.** (1990) Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 188: 247-252
- Oster G. y Wang H.** (2003) Rotary protein motors. *Trends in cell biology* 13: 114-121.
- Paumard P., Vaillier J., Couлары B., Schaeffer J., Soubannier V., Mueller D.M., Brethes D., di Rago J.P., y Velours J.** (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21:221-30
- Papa S., Zanotti F., Cocco T., Perrucci C., Candita C., y Minuto M.** (1996) Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 240: 461-467
- Papa S., Zanotti F., y Caballo A.** (2000) The structural and functional connection between the catalytic and proton translocating sectors of the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32:401-11.
- Paumard P., Vaillier J., Couлары B., Schaeffer J., Soubannier V., Muller DM., Brethes D., Rago JP., y Velours J.** (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21:221-230.
- Panchenko M.V., y Vinogradov A.D.** (1985) Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett.* 184:226-230
- Pedersen, P. L., Schwerzmann K., y Cintron N. M.** (1981) Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP in biological systems: role of peptide inhibitors of H<sup>+</sup>-ATPases. En: *Current Topics in Bioenergetics.* (Sanadi, D.R., ed.), Academic Press 11:149-199.
- Penefsky H.S.** (1979) A centrifuged-column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F<sub>1</sub>. *Methods Emzymol.* 56: 527-530.

- Penin F., Di Pietro A., Godinot C., y Gautheron D.C.** (1988) Fate of nucleotides bound to reconstituted F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> during adenosine 5'-triphosphate synthesis activation or hydrolysis: role of protein inhibitor and hysteretic inhibition. *Biochemistry* 27:8969-8974.
- Polgreen K.E., Featherstone J., Willis A.C., y Harris D.A.** (1995) Primary structure and properties of the inhibitory protein of the mitochondrial ATPase (H(+)-ATP synthase) from potato. *Biochim. Biophys. Acta* 1229:175-180.
- Pullman M.E. y Monroy G.C.** (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 238: 3762-3769.
- Rexroth S., Meyer Zu Tittingdorf J.M., Schwassmann H.J., Krause F., Seleert H., y Dencher N.A.** (2004) Dimeric H<sup>+</sup>-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1658:202-11.
- Robinson J.B. y Srere P.A.** (1985) Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260:10800-10805.
- Rondelez Y., Tresset G., Nakashima T., Kato-Yamada G., Fujita H., Takeuchi S., y Noji H.** (2005) Highly coupled ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase single molecules. *Nature* 433:773-777.
- Rouslin, W.** (1983) Protonic inhibition of the mitochondrial oligomycin-sensitive adenosine 5'-triphosphatase in ischemic and autolyzing cardiac muscle. Possible mechanism for the mitigation of ATP hydrolysis under nonenergizing conditions. *J. Biol. Chem.* 258: 9657-9661.
- Rubinstein J. L., Walker J. E. y Henderson R.** (2003). Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO Journal* 22: 6182 – 6192.
- Sabbert D., Engelbrecht S., y Junge W.** (1996) Intersubunit rotation in active F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 381:623-5.
- Schägger H., Cramer W.A., y Von Jagow G.** (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217:220-230.
- Schägger H., y Pfeiffer K.** (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19: 1777-1783.



- Schägger H.** (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1555: 154-159.
- Schägger H., De Coo R., Bauer M.F., Hofmann S., Godinot C., y Brandt U.** (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *EMBO J.* 21:221-230.
- Schwerzmann K. y Pedersen P.L.** (1981) Proton--adenosinetriphosphatase complex of rat liver mitochondria: effect of energy state on its interaction with the adenosinetriphosphatase inhibitory peptide. *Biochemistry* 20:6305-6311.
- Schwerzman K. y Pedersen P.L.** (1986) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 1-18.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., y Klenk D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Solaini G., Baracca A., Gabellieri E., y Lenaz G.** (1997) Modification of the mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase epsilon subunit, enhancement of the ATPase activity of the IF<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> complex and IF<sub>1</sub>-binding dependence of the conformation of the epsilon subunit. *Biochem. J.* 327: 443-448.
- Sorgen P.L., Bubb M.R., y Cain B.D.** (1999) Lengthening the second stalk of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP Synthase in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* 274: 36261-36266.
- Sorgen P.L., Caviston T.L., Perry R.C., y Cain B.D.** (1998) Deletions in the second stalk of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273:27873-27878.
- Spannagel C., Vaillier J., Arselin G., Graves P.V., Grandier-Vazeille X., y Velours J.** (1998) Evidence of a subunit 4 (subunit b) dimer in favor of the proximity of ATP synthase complexes in yeast inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1414: 260-264.
- Stock D., Leslie A.G. y Walker J.E.** (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286:1700-1705.
- Tomasetig L., Di Pancrazio F., Harris D.A, Mavelli I., y Lippe G.** (2002) Dimerization of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF<sub>1</sub> *Biochim. Biophys. Acta* 1556: 133-141.
- Trinei M., Vannier J-P., Beurton-Aimar M., y Norris V.** (2004) A hyperstructure approach to mitochondria. *Mol. Microbiol.* 53: 1-13.

- Tsunoda S.P., Rodgers A.J.W., Aggeler R., Wilce M.C.J., Yoshida M., y Capaldi R.A.** (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6560-6564.
- Tuena de Gómez-Puyou M., y Gómez-Puyou A.** (1977) A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. Arch. Biochim. Biophys. 182: 82-86.
- Turina P., Rebecchi A., D'Alessandro M., Anefors S., y Melandri B.A.** (2006) Modulation of proton pumping efficiency in bacterial ATP synthases. Biochim. Biophys. Acta 1757:320-5.
- Van de Stadt R.J., De Boer B.L., y Van Dam K.** (1973) The interaction between the mitochondrial ATPase F<sub>1</sub> and the ATPase inhibitor. Biochim. Biophys. Acta 292:338-349.
- Van Heeke G., Deforce L., Schnizer R.A., Shaw R., Couton J.M., Shaw G., Song P.S., y Schuster S.M.** (1993) Recombinant bovine heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification, and structural studies. Biochemistry 32:10140-10149.
- Van Lis R., Atteia A., Mendoza-Hernández G., y Gonzáles-Halphen D.** (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. Plant. Physiol. 132:318-330.
- Van Raaij M.J., Orriss G.L., Montgomery M.G., Runswick M.J., Fearnley I.M., Skehel J.M., y Walker J.E.** (1996) The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: The minimal inhibitory sequence. Biochemistry 35:15618-15625.
- Wilkens S. y Capaldi R.** (1998) ATP synthase's second stalk comes into focus. Nature 393: 29.
- Wilkens S. y Capaldi R.** (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. Biochim. Biophys. Acta 1365:93-97.
- Wilkens S., Zhou J., Nakayama R., Dunn S.D., y Capaldi R.A.** (2000) Localization of the delta subunit in the *Escherichia coli* F1F0-ATP synthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F<sub>1</sub>. J. Mol. Biol. 290: 379-384.

**Zhuo S., Paik S.R., Register J.A., y Allison W.S.** (1993) Photoinactivation of the bovine heart mitochondrial F1-ATPase by [14C]dequalinium cross-links phenylalanine-403 or phenylalanine-406 of an alpha subunit to a site or sites contained within residues 440-459 of a beta subunit. *Biochemistry* 32:2219-27.

## Cross-Linking of the Endogenous Inhibitor Protein (IF<sub>1</sub>) With Rotor ( $\gamma$ , $\epsilon$ ) and Stator ( $\alpha$ ) Subunits of the Mitochondrial ATP Synthase

Fernando Minauro-Sanmiguel,<sup>1</sup> Concepción Bravo,<sup>1</sup> and José J. García<sup>1,2</sup>

Received October 15, 2002; accepted October 16, 2002

The location of the endogenous inhibitor protein (IF<sub>1</sub>) in the rotor/stator architecture of the bovine mitochondrial ATP synthase was studied by reversible cross-linking with dithio-bis(succinimidylpropionate) in soluble F<sub>1</sub>I and intact F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complexes of submitochondrial particles. Reducing two-dimensional electrophoresis, Western blotting, and fluorescent cysteine labeling showed formation of  $\alpha$ -IF<sub>1</sub>, IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>,  $\gamma$ -IF<sub>1</sub>, and  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages in soluble F<sub>1</sub>I and in native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complexes. Cross-linking blocked the release of IF<sub>1</sub> from its inhibitory site and therefore the activation of F<sub>1</sub>I and F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complexes in a dithiothreitol-sensitive process. These results show that the endogenous IF<sub>1</sub> is at a distance  $\leq 12$  Å to  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits of the central rotor of the native mitochondrial ATP synthase. This finding strongly suggests that, without excluding the classical assumption that IF<sub>1</sub> inhibits conformational changes of the catalytic  $\beta$  subunits, the inhibitory mechanism of IF<sub>1</sub> may involve the interference with rotation of the central stalk.

**KEY WORDS:** ATP synthase; inhibitor protein; IF; rotor; stator; cross-linking.

### INTRODUCTION

The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase is a rotational motor enzyme that provides most of the ATP required in all species. Experimentally, the enzyme can be separated in soluble (F<sub>1</sub>) and membranal (F<sub>0</sub>) portions. F<sub>0</sub> works as a proton channel, and the soluble F<sub>1</sub> is the catalytic moiety that preserves

the capacity to hydrolyze ATP. In the intact ATP synthase, F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> are structurally and functionally coupled through two stalks. The central stalk forms part of the rotor of the enzyme, and the peripheral stalk is part of the stator that anchors the catalytic sites of F<sub>1</sub> to the membrane (for recent reviews, see Boyer, 2000; Capaldi and Aggeler, 2002; García *et al.*, in press; Noji and Yoshida, 2001).

Because the whole ATP synthase is a reversible motor, it can work as ATPase or ATP synthase. The enzyme is controlled in physiological conditions by the so-called inhibitor protein (IF<sub>1</sub>) to prevent ATP hydrolysis. Therefore, the functional form of the mitochondrial ATP synthase *in vivo* is that containing its endogenous IF<sub>1</sub>, i.e., the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex (Vázquez-Contreras *et al.*, 1995). Since its first isolation in 1963 by Pullman and Monroy (1963), several laboratories have studied the properties of IF<sub>1</sub> as the intrinsic inhibitor of the ATPase activity of the enzyme. The binding stoichiometry of IF<sub>1</sub> is 1 per ATP synthase (Hashimoto *et al.*, 1981; Klein *et al.*, 1980). Most of the available structural data show the cross-linking of IF<sub>1</sub> with  $\alpha$  (Mimura *et al.*, 1993) and  $\beta$  (Beltrán *et al.*, 1988; Jackson and Harris, 1988; Klein *et al.*, 1980, 1981) subunits of F<sub>1</sub>; however, cross-linking, activity, and assembly

Key to abbreviations: CAPS, 3-(ciclohexilamino)-1-propanesulfonic acid; CPM, 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; DSP, dithio-bis(succinimidylpropionate); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; F<sub>1</sub>, the soluble F<sub>1</sub>-ATPase; F<sub>0</sub>, the membranal proton channel of the ATP synthase; F<sub>1</sub>I, the complex of soluble F<sub>1</sub>-ATPase containing the inhibitor protein; F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I, the native ATP synthase containing the inhibitor protein; IF<sub>1</sub>, the inhibitor protein of the mitochondrial ATP synthase; FRET, fluorescence resonance energy transfer; mAb, monoclonal antibody; NMR, nuclear magnetic resonance; SDS-PAGE, denaturing sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SMP, submitochondrial particles.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez," México, D.F. 14080, México.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed at Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano #1, Col. Sección XVI, México D.F. 14080, México; e-mail: jjgarcia\_trejo@yahoo.com.

studies (García *et al.*, 2000; López-Mediavilla *et al.*, 1993; Papa *et al.*, 2000) suggest interactions of IF<sub>1</sub> with F<sub>0</sub> subunits. The soluble F<sub>1</sub> containing IF<sub>1</sub> can be isolated as the so-called F<sub>1</sub>I complex whose latent ATPase activity is recovered after activation in conditions of high-ionic strength and pH (Klein *et al.*, 1982; Pullman and Monroy, 1963), i.e., conditions similar to those required for activation of the whole F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex. Circular dichroism (Lebowitz and Pedersen, 1993, 1996; Van Heeke *et al.*, 1993; Van Raaij *et al.*, 1990), NMR (Gordon-Smith *et al.*, 2001), and crystallographic (Cabezón *et al.*, 2001) analyses of recombinant rat liver and bovine soluble IF<sub>1</sub>s show a high content of  $\alpha$ -helix that decreases at acidic pH where it exerts a stronger inhibition. Recently, it has been shown that these changes are associated to a shift in the aggregation state of soluble IF<sub>1</sub> from a noninhibitory tetramer to an inhibitory IF<sub>1</sub> dimer (Cabezón *et al.*, 2000a). Furthermore, it has been also shown that the soluble F<sub>1</sub>I complex containing the reconstituted (Cabezón *et al.*, 2000b) or endogenous (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2001) IF<sub>1</sub> exists preferentially in a dimerized form that is induced by formation of IF<sub>1</sub> dimers (Cabezón *et al.*, 2000b).

Several studies have shown intrinsic differences between the reconstituted and the endogenous IF<sub>1</sub> (Feinstein and Moudrianakis, 1984; Fornells *et al.*, 1998; Galante *et al.*, 1981; Krull and Schuster, 1981; Schwerzmann *et al.*, 1982; Valdés and Dreyfus, 1987). Therefore, we studied the location of the endogenous IF<sub>1</sub> in the soluble F<sub>1</sub>I and in the intact ATP synthase. Chemical modification of F<sub>1</sub>I and F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I with dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP) formed novel cross-linkages of IF<sub>1</sub> with  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits, i.e., components of the central rotor that controls the conformational changes of the catalytic  $\alpha/\beta$  interfaces (Aggeler *et al.*, 1997; Boyer, 2000; Capaldi and Aggeler, 2002; Duncan *et al.*, 1995; García *et al.*, in press; Gibbons *et al.*, 2000; Kato-Yamada *et al.*, 1998; Noji *et al.*, 1997; Noji and Yoshida, 2001; Sabbert *et al.*, 1996; Tsunoda *et al.*, 2001). Therefore, these findings strongly suggest that IF<sub>1</sub> may not only inhibit the conformational changes of the catalytic  $\beta$  subunits as it has been inferred from previous cross-linking results (Beltrán *et al.*, 1988; Jackson and Harris, 1988; Klein *et al.*, 1980; Mimura *et al.*, 1993); IF<sub>1</sub> could also interfere with rotation of the central stalk to inhibit ATP hydrolysis.

## MATERIALS AND METHODS

Bovine heart mitochondria and "Mg-ATP" submitochondrial particles (SMP) were prepared as described before (García *et al.*, 1995). Soluble F<sub>1</sub>-ATPase and the F<sub>1</sub>I complex containing the endogenous IF<sub>1</sub> were purified

from SMP by affinity chromatography with Sepharose-EAH (Pharmacia) as described elsewhere (Tuena de Gómez-Puyou and Gómez-Puyou, 1977). Soluble F<sub>1</sub>I was activated by incubation in media containing Tris-SO<sub>4</sub>, 50 mM; EDTA, 2 mM; KCl, 100 mM; and ATP, 10 mM (pH 8.0) at 40°C for 90 min. ATPase activity was measured spectrophotometrically as described before (García *et al.*, 1995).

*Cross-linking of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex in SMP and of soluble F<sub>1</sub>I with DSP.* Cross-linking experiments were carried out with DSP (Pierce), a DTT-reversible and homo-bifunctional reactant that forms highly specific cross-linkages between lysines that are at about 12 Å proximity. To form cross-linkages between neighboring subunits of the ATP synthase, SMP or soluble F<sub>1</sub>I were incubated at concentrations of 1 or 4 mg or protein/mL, respectively, with the indicated concentrations of DSP. For soluble F<sub>1</sub>I, the cross-linking buffer was 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, whereas for the SMP it also included 250 mM sucrose. The reaction was carried out for 30 min at room temperature and arrested with 20 mM L-lysine.

*Reducing 2D SDS-PAGE after nonreducing 1D SDS-PAGE.* First, F<sub>1</sub>I subunits and their cross-linked products were separated in a nonreducing 1D (10–22%) SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Afterwards, the lanes containing the samples of interest were excised from the gels as fragments of the indicated range of molecular weights and incubated 1 h with 20 mM DTT (Gibco) at room temperature in 0.1% SDS (Biorad). Subsequently, the cut lanes were washed three times with 0.1% SDS to remove residual DTT and re-electrophoresed in a 2D (10–22%) SDS-PAGE. Lane fragments were horizontally layered on the top of 2D gels; a stacking gel was polymerized between the excised lane and the separating gradient gel. Two spacers were included at the sides of the layered excised lane for appropriate standards.

*Immunoprecipitation of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I solubilized from SMP.* The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex was immunoprecipitated from SMP with a new monoclonal antibody named 12F4AD8 described elsewhere (Aggeler *et al.*, 2002). This antibody immunoprecipitates the whole, native, functional, and oligomycin-sensitive F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex (Aggeler *et al.*, 2002). SMP at 1.5 mg of protein/mL were first solubilized in lauryl maltoside buffer (20 mM Mes-Tris (pH 6.8), 150 mM sucrose, 1 mM ADP, and 2.25 mg/mL lauryl maltoside). The mixtures were centrifuged for 45 min at 45,000 rpm at 4°C. The soluble portion was incubated with control Protein-G beads coupled to non-specific antibodies (NSA) of preimmune mice antiserum for 1 h at room temperature. Afterwards, the beads were pelleted and the supernatant was incubated with the monoclonal antibody 12F4AD8 coupled to Protein-G beads for

## Cross-Linking of IF<sub>1</sub> With the Rotor of the ATP Synthase

435

2 h at room temperature. At this point, the coupled beads were washed five times with 20 mM Mes-Tris (pH 6.8), 150 mM sucrose, 1 mM ADP, 0.05% lauryl maltoside. Finally, the immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex was eluted with glycine 100 mM, pH 2.5, and the pH was readjusted to 7.5 with phosphate buffer.

**Immunodetection of cross-linked subunits.** SDS-PAGE was carried out under nonreducing (without DTT) and reducing (+20 mM DTT) conditions. Afterwards, proteins were transferred 2 h to PVDF membranes at 100 mA in a buffer containing 100 mM CAPS, 10% methanol (pH 11.0). For immunodetection of IF<sub>1</sub>, mAb raised against recombinant rat liver IF<sub>1</sub> (García *et al.*, 2000) was used. The recombinant rat liver IF<sub>1</sub> was overexpressed in *Escherichia coli* and purified as described elsewhere (García *et al.*, 2000; Lebowitz and Pedersen, 1993). Immunodetection of subunit  $\alpha$  was carried out with another mAb as described before (García *et al.*, 2000). A polyclonal antibody raised against bovine  $\gamma$  subunit was also used and it was a generous gift of Professors M. Tuena de Gómez-Puyou and A. Gómez-Puyou. Reactive bands were immunodetected with secondary goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgGs conjugated to HRP and the chemiluminescent ECL-Plus kit of Amersham-Pharmacia.

**Fluorescent labeling of accessible cysteines of  $\alpha$ ,  $\gamma$ , and  $\epsilon$  subunits with CPM.** Labeling with coumarin maleimide (CPM, Mol. Probes) was carried out for 2 min at room temperature by using a concentration of 5 mg/mL of F<sub>1</sub>I complex and 100  $\mu$ M of CPM in 25 mM potassium phosphate at pH 7.0. The labeling reaction was arrested by column centrifugation (Penefsky, 1979). Fluorescent CPM-labeled subunits were detected after 1D or 2D SDS-PAGE by exciting CPM in an UV transilluminator. A standard or digital photo camera stored the images. After CPM labeling, DSP cross-linking was carried out as described earlier.

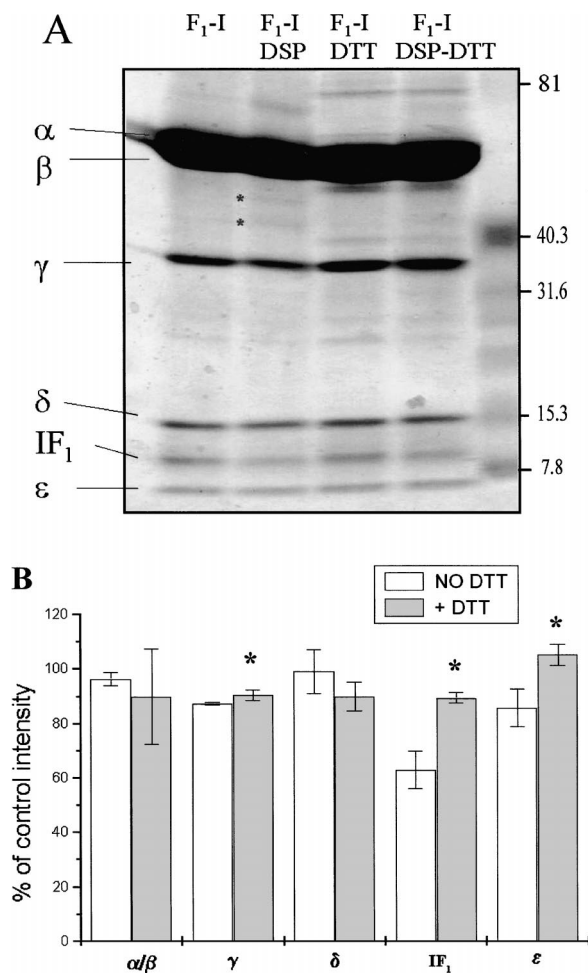
**Other methods and materials.** The amount of protein in SMP, F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I, and F<sub>1</sub>I preparations was measured with the method of Lowry *et al.* (1951). Densitometric analyses of Coomassie-stained bands in SDS-PAGE gels were carried out with the digital camera and imaging software "ALPHADIGIDOC" of Alpha Innotech Corporation according to the manufacturer's instructions. In each gel the molecular weights of cross-linking products were calculated from interpolation by using the appropriate standards. The intensities of subunits were measured by peak integration after densitometry analyses relative to controls nontreated with DSP. Coupling enzymes and substrates for ATPase activity were obtained from Sigma. Reactants for SDS-PAGE were obtained from Biorad laboratories.

## RESULTS

The functional integrity of our preparation of soluble F<sub>1</sub>I was determined by activation assays. The basal ATPase activity of 2–3  $\mu$ mol/min/mg increased to 50–70  $\mu$ mol/min/mg after F<sub>1</sub>I was activated as described under Materials and Methods. By comparison, the basal F<sub>1</sub>-ATPase activity of the soluble F<sub>1</sub> lacking IF<sub>1</sub> was also 50–70  $\mu$ mol/min/mg. We used 0.1–2.0 mg/mL of DSP and looked for a DTT-reversible inhibition of IF<sub>1</sub> release (ATPase activation) to find an optimal DSP concentration to cross-link IF<sub>1</sub> with neighboring subunits. In correlation with parallel Western blotting analyses using the mAb against IF<sub>1</sub> (not shown), we found maximal DTT reversibility in ATPase activation and Western analyses at 1 mg/mL DSP. Therefore, this concentration of DSP was used for all experiments shown with soluble F<sub>1</sub>I.

**DSP cross-linking products in the soluble F<sub>1</sub>I complex as detected by Coomassie blue staining of SDS-PAGE.** After cross-linking of soluble F<sub>1</sub>I with 1 mg/mL DSP, non-cross-linked and cross-linked F<sub>1</sub>I were subjected to reducing and nonreducing SDS-PAGE. After Coomassie staining, statistical densitometric analyses showed that the intensities of IF<sub>1</sub>,  $\gamma$ , and  $\epsilon$  subunits diminished upon cross-linking in a DTT-sensitive process (Fig. 1(A) and 1(B)). Figure 1(A) shows a representative gel where these intensity changes can be observed by eye. Several DTT-sensitive high-molecular products appeared above  $\alpha$  and  $\beta$  subunits (not shown), but their nature was not explored. However, two DTT-sensitive faint bands of 36.0 and 43.0 kDa appeared reproducibly in the DSP cross-linked F<sub>1</sub>I between  $\alpha$  and  $\beta$  subunits (Fig. 1(A), second lane from left to right labeled with \*). The DTT-reversible decrease of IF<sub>1</sub> (10 kDa),  $\epsilon$  (6 kDa), and  $\gamma$  (30 kDa) intensities suggested that the 36- and 43-kDa products corresponded to  $\gamma$ - $\epsilon$  and  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages, respectively.

**Identification of the  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> cross-linked product in the soluble F<sub>1</sub>I complex and resolution of two more  $\gamma$  cross-linked products by 2D SDS-PAGE.** To obtain a better resolution of the cross-linked subunits of the F<sub>1</sub>I complex, reducing 2D SDS-PAGE was carried out after overloading and overrunning a nonreducing 1D SDS-PAGE with 300  $\mu$ g of protein per lane. Each lane was excised as a fragment expanding the 25–70-kDa range before reducing it with DTT and loading it into a minigel. As control, cross-linked F<sub>1</sub>-ATPase lacking IF<sub>1</sub> was also analyzed under identical conditions. Cross-linked subunits can be identified as vertically aligned spots under the diagonal formed by non-cross-linked subunits and residual cross-linking products. The identity of cross-linked subunits was determined by the vertical position of the spots relative to a non-cross-linked F<sub>1</sub>I standard. In soluble F<sub>1</sub> two  $\gamma$  spots



**Fig. 1.** DSP cross-linking of the  $F_1I$  complex forms DTT-sensitive cross-linkages between subunits  $IF_1$ ,  $\epsilon$ , and  $\gamma$  as shown by Coomassie-stained SDS-PAGE. (A)  $F_1I$  was cross-linked with 1 mg/mL of DSP as described under Materials and Methods. Afterwards, 60  $\mu$ g of control and cross-linked samples were loaded in each lane of a 10–22% SDS-PAGE with and without 20 mM DTT. DSP induced the formation of two products of about 36 and 43 kDa that are not observed after DTT reduction (\*). Statistical densitometric analyses of three different experiments and  $F_1I$  preparations (B) showed that subunits  $IF_1I$ ,  $\gamma$  and  $\epsilon$  are diminished in the cross-linked sample (without DTT), and their intensity is recovered after DTT reduction. One hundred percent corresponds to the intensity of the respective band in the non-cross-linked  $F_1I$  standard. Statistical significance of the differences between samples with and without DTT was calculated with the  $U$  values of the nonparametric Meann Withney method. These values were  $\alpha/\beta = 0.513$ ,  $\gamma = 0.05$ ,  $\delta = 0.275$ ,  $IF_1 = 0.05$ ,  $\epsilon = 0.05$ ; therefore, statistically significant differences were observed for subunits  $\gamma$ ,  $IF_1$ , and  $\epsilon$  (labeled with \*).

were vertically aligned to  $\epsilon$  and  $\delta$ , respectively; the latter was too weak to appear in Fig. 2(A), but it was detected by densitometry analysis (not shown). In contrast, in the cross-linked  $F_1I$  complex an additional  $\gamma$  spot appeared between those observed in  $F_1$  (Fig. 2(B)). This spot was

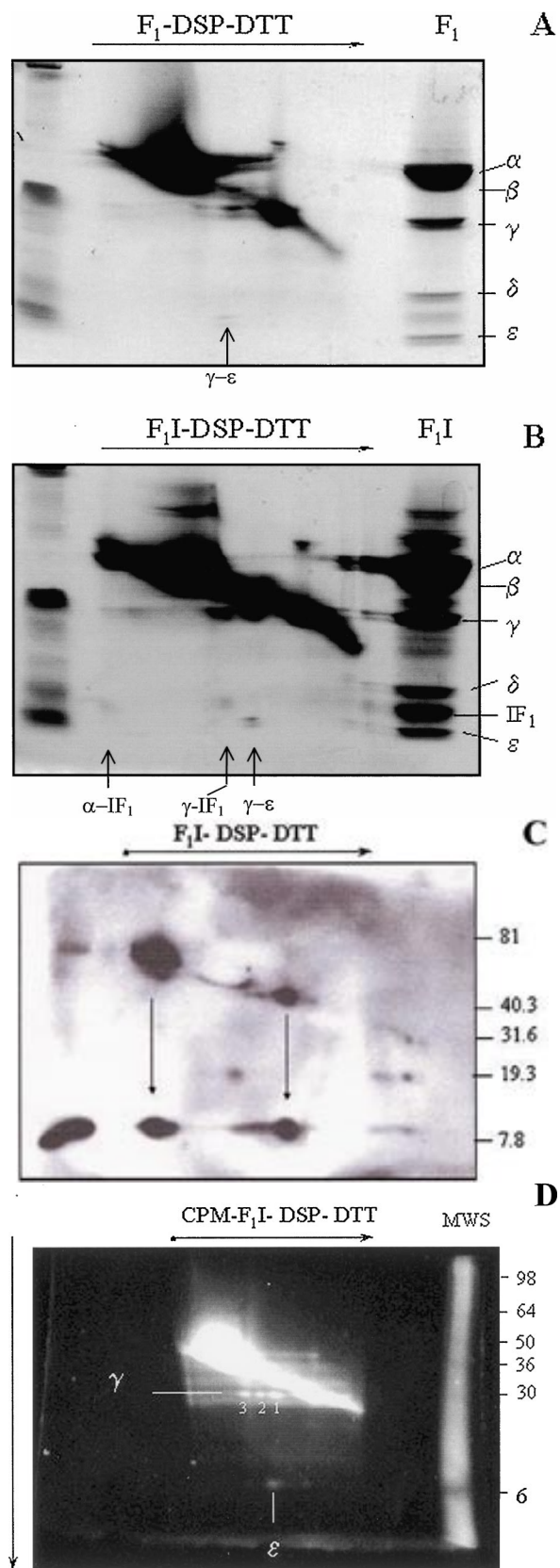
vertically aligned to  $IF_1$ . A second  $IF_1$  spot at the left side of the gel aligned vertically to  $\alpha$  subunit. Western blot of 2D gels loaded with lower amounts of cross-linked  $F_1I$ , indicated that  $IF_1$  aligned vertically under two cross-linked  $IF_1$  products of 66 and 43 kDa (Fig. 2(C)). Taken together, the results showed that the product of 36 kDa is a  $\gamma$ - $\epsilon$  cross-link, that of 43 kDa is  $\gamma$ - $IF_1$ , and that of 66 kDa is  $\alpha$ - $IF_1$ .

To confirm the identity of these cross-linked subunits, the accessible cysteines of  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , and  $\alpha$  subunits were fluorescently labeled with CPM. Subunits  $\beta$ ,  $\delta$ , and  $IF_1$  lack cysteines, and therefore, they are not CPM-labeled.  $F_1I$  was first labeled with CPM and afterwards cross-linked with 1 mg/mL of DSP. Two-dimensional SDS-PAGE loaded with 300  $\mu$ g of protein showed a fluorescent smearing along the diagonal due to  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits and residual cross-linking products. Under this diagonal, the three fluorescent  $\gamma$  spots were observed together with the fluorescent  $\epsilon$  spot aligned in the position of the  $\gamma$ - $\epsilon$  product (Fig. 2(D)). As expected from their lack of cysteines, no fluorescence was detected in the  $IF_1$  and  $\delta$  spots under the other two  $\gamma$  spots.

To resolve smaller  $F_1I$  cross-linking products, the nonreducing first dimension lane containing 400  $\mu$ g of cross-linked  $F_1I$  was excised as a fragment from about 100 kDa to the bottom front. This excised lane was subjected to reducing 2D SDS-PAGE in a large gel. The resulting 2D gel showed several aligned spots clearly defined under the diagonal of  $F_1I$  subunits (Fig. 3). Three  $\gamma$  spots were vertically aligned to  $\epsilon$ ,  $IF_1$ , and  $\beta$  subunits, from right to left in order of ascending molecular weights. The  $\gamma$  spot aligned to  $\delta$  (Fig. 2) was not resolved, presumably because the first dimension gel was not overrun. Four  $IF_1$  spots were vertically aligned to  $\epsilon$ , none,  $\gamma$ , and  $\alpha$  subunits. These results confirmed the identity of the 43- and 66-kDa cross-linked products as  $\gamma$ - $IF_1$  and  $\alpha$ - $IF_1$ , respectively. They also show formation of the previously observed  $\gamma$ - $\epsilon$  cross-linkage (Joshi and Burrows, 1990, and Fig. 2). Of significant relevance was the presence of  $\epsilon$ - $IF_1$  and  $IF_1$ - $IF_1$  cross-linkages clearly observed in the lower right part under the diagonal (Fig. 3). Similar analyses carried out with a control non-cross-linked  $F_1I$  showed, as expected, no spots under the diagonal of  $F_1I$  subunits (not shown). Taken together, these results confirm unequivocally the formation of cross-linkages of  $IF_1$  with the rotor subunits  $\gamma$  and  $\epsilon$ , together with other products, i.e.,  $\alpha$ - $IF_1$ ,  $\gamma$ - $\beta$ , and  $IF_1$ - $IF_1$ .

*Immuno-identification of  $\gamma$ - $IF_1$  and  $\alpha$ - $IF_1$  cross-linked products formed by DSP in soluble  $F_1I$  complex.* After cross-linking of soluble  $F_1I$  with 1 mg/mL of DSP, Western blotting revealed with the mAb against  $IF_1$  showed formation of four  $IF_1$  cross-linked products of

Cross-Linking of IF<sub>1</sub> With the Rotor of the ATP Synthase



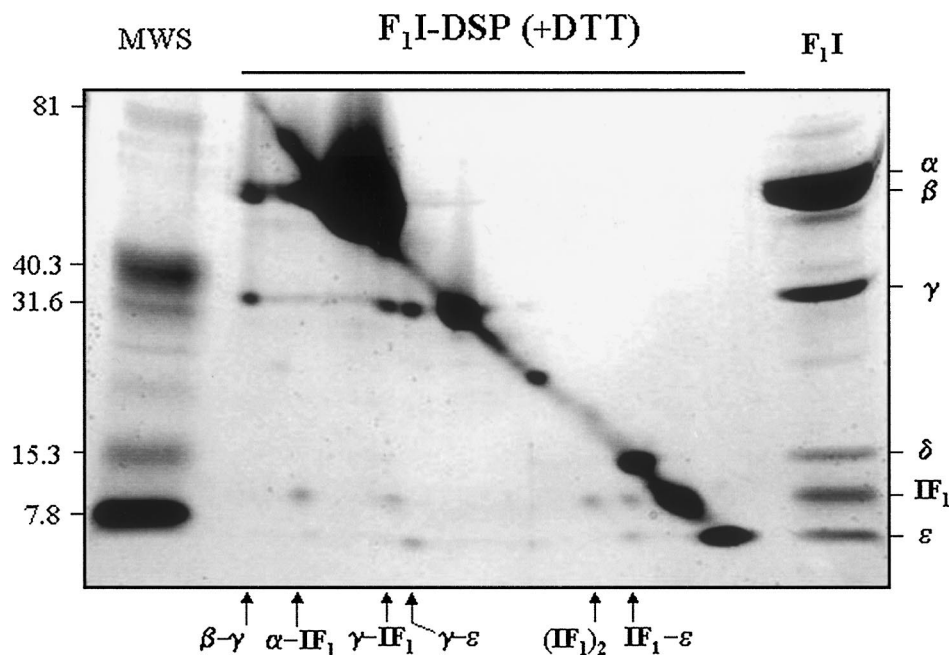
approximately 16, 20, 43, and 66 kDa that were reduced with DTT (Fig. 4, left). The band of about 66 kDa corresponds to the α-IF<sub>1</sub> cross-linked product (Fig. 3), whereas that of 43-kDa results from the γ-IF<sub>1</sub> cross-linkage. The 20-kDa IF<sub>1</sub> product is the cross-linked IF<sub>1</sub> dimer (Fig. 3), whereas the product of 16 kDa corresponds to the ε-IF<sub>1</sub> cross-linkage (Fig. 3).

To confirm the identity of the subunits cross-linked with IF<sub>1</sub> in the 43- and 66-kDa products, Western blotting of control and cross-linked F<sub>1</sub>I complexes was carried out using polyclonal and mAbs directed against γ and α subunits, respectively. The two cross-linking products of 43 and 66 kDa revealed with γ (Fig. 4, center) and α (Fig. 4, right) antibodies, respectively, aligned horizontally with the corresponding IF<sub>1</sub> products (Fig. 4, left). These products were completely reduced with DTT, except for the α-IF<sub>1</sub> product which was reduced partially (Fig. 4, left and right). Other cross-linking products of γ and α subunits were observed, including a γ product of 36 kDa corresponding to the γ-ε cross-linkage (Figs. 2 and 3). Larger products containing the α subunit were also observed (Fig. 4, right), but these were not further analyzed.

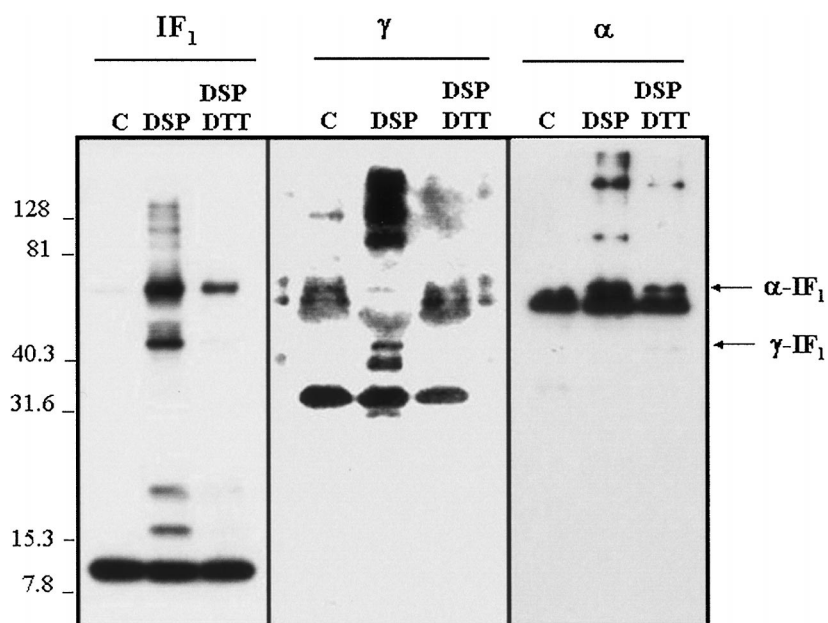
*Cross-linking of the native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I-ATP synthase with DSP in SMP.* We also studied if the endogenous IF<sub>1</sub> cross-links with rotor subunits of the whole intact F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I-ATP synthase. For this purpose, SMP were incubated with 5–500 μg/mL DSP and cross-linking products containing IF<sub>1</sub> were detected by Western blotting with the mAb against IF<sub>1</sub> after 1D nonreducing SDS-PAGE (Fig. 5(A)). At low DSP concentrations (5–30 μg/mL, Fig. 5(A)), the α-IF<sub>1</sub> (66 kDa) and γ-IF<sub>1</sub> (43 kDa) were the predominant cross-linking products formed in the native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex of SMP. At higher DSP concentrations (50–500 mg/mL),

**Fig. 2.** Identification of subunits cross-linked by DSP in F<sub>1</sub>I by 2D SDS-PAGE. Reducing 2D (10–22%) SDS-PAGE after a nonreducing 1D was carried out with 300 μg of F<sub>1</sub>(A) and F<sub>1</sub>I(B) previously cross-linked with 1 mg/mL DSP as described under Materials and Methods. In both cases, the lane of interest was excised from the first dimension as a fragment from about 70–25 kDa that was loaded into the second dimension after DTT reduction. In F<sub>1</sub>, two γ spots appeared under the diagonal. The larger spot was vertically aligned (cross-linked) to ε (arrow). In the F<sub>1</sub>I complex, a third γ product appeared, which was vertically aligned to IF<sub>1</sub>. The identification of IF<sub>1</sub> located under the third γ spot was corroborated by immunoblotting with an IF<sub>1</sub> monoclonal antibody (C) where the products with IF<sub>1</sub> can be detected (arrows). The standard left lane was loaded with 1.0 μg of purified rat liver IF<sub>1</sub>. (D) After CPM modification and DSP cross-linking (see Materials and Methods), 300 μg of F<sub>1</sub>I was processed for reducing 2D SDS-PAGE showing the three γ spots. Only the ε subunit was labeled and aligned under the first γ spot (from right to left), since δ and IF<sub>1</sub> lack cysteines. The fluorescence along the diagonal is due to overloading and labeling of α, γ, and residual non-reduced cross-linking products.



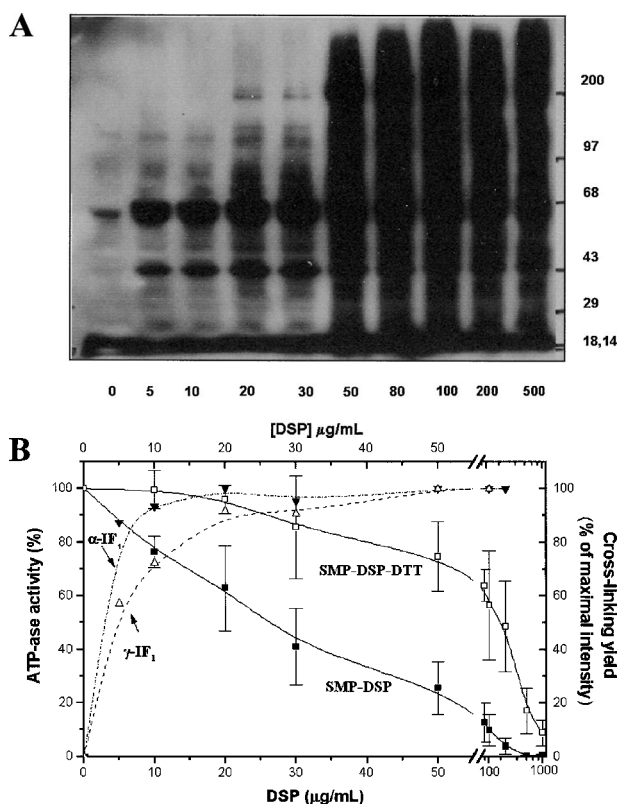


**Fig. 3.** Reducing 2D SDS-PAGE of DSP cross-linked F<sub>1</sub>I complex after a first nonreducing SDS-PAGE. Soluble F<sub>1</sub>I complex was cross-linked with 1 mg/mL DSP. Subsequently, 400 μg of cross-linked F<sub>1</sub>I was loaded in a single lane of a nonreducing 10–22% gel. Afterwards, the lane was excised as a fragment from about 100 kDa to the bottom and incubated with DTT before loading it horizontally in a large 2D (10–22%) SDS-PAGE gel. The right lane was loaded with control soluble F<sub>1</sub>I as standard, and the left lane with molecular weight standards. The gel was stained with Coomassie blue.



**Fig. 4.** Immuno-identification of  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> cross-linking products in soluble F<sub>1</sub>I. For immunodetection of IF<sub>1</sub>,  $\gamma$ , and  $\alpha$  subunits, 1, 20, and 0.5 μg of control, cross-linked, and cross-linked with DTT F<sub>1</sub>I were loaded as indicated in a linear 12% ID SDS-PAGE. Afterwards, Western blotting was carried out as described under Materials and Methods using subunit specific monoclonal (IF<sub>1</sub>,  $\alpha$ ) and polyclonal ( $\gamma$ ) antibodies as indicated.

Cross-Linking of IF<sub>1</sub> With the Rotor of the ATP Synthase



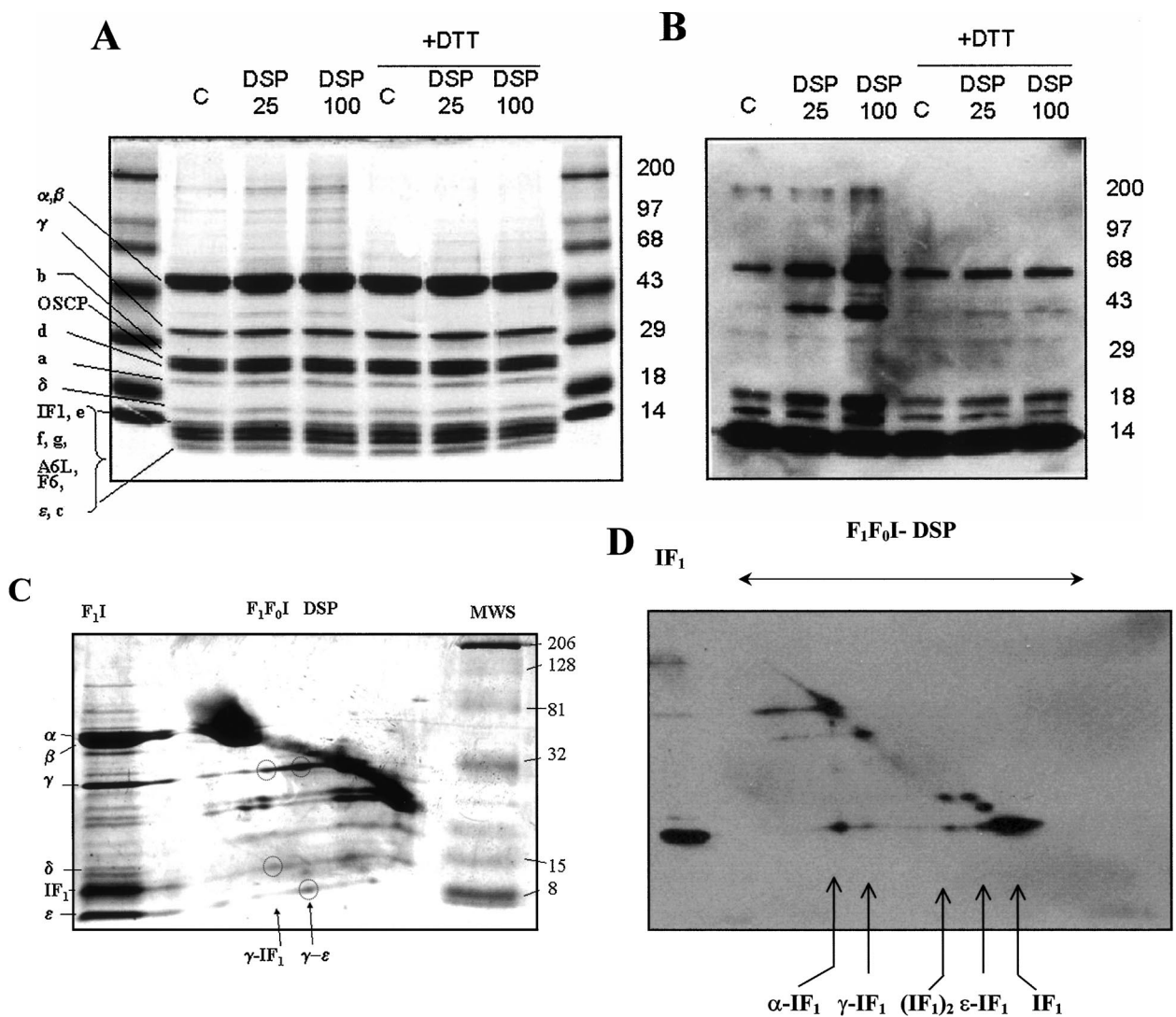
**Fig. 5.** Formation of IF<sub>1</sub> cross-linking products by DSP correlates with DTT-reversible inhibition of IF<sub>1</sub> release from native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex in SMP. (A) SMP were cross-linked with the DSP concentrations shown as described under Materials and Methods. After arresting the cross-linking with L-lysine, 30- $\mu$ g samples were loaded in each lane of a 10–22% SDS-PAGE. The cross-linked products were identified by immunoblotting with the mAb against IF<sub>1</sub>. (B) After cross-linking of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I in SMP at 1 mg/mL, samples were diluted 10-fold in activation medium with (□) and without (■) DTT and incubated at 40°C for 90 min. Afterwards, the ATPase activity was measured spectrophotometrically. The 100% of activated ATPase activities with and without DTT were in the range of 10–12  $\mu$ mol/min/mg, and the basal activities before activation were 0.8–1.2  $\mu$ mol/min/mg. The plot also shows the yield of  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> and  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages relative to the maximal intensity integrated by densitometry analysis at their respective positions of 66 and 43 kDa from the Western blot (A). These intensities were saturated at about 50  $\mu$ g/mL (B).

a smear of IF<sub>1</sub> bands indicated nonspecific cross-linking. In this gel, the smaller IF<sub>1</sub> products (IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> and IF<sub>1</sub>- $\epsilon$ ) were stacked with the main IF<sub>1</sub> band, but they were resolved after immunoprecipitation of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex (Fig. 6(B)). It is relevant to point out that at low DSP concentrations (5–30  $\mu$ g/mL) the yield of  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> and  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages increased progressively whereas the DTT reversibility of the inhibition of ATPase activation by DSP was higher than 80% (Fig. 5(B)). Because the DTT-reversible inhibition of the ATPase activity by DSP has been previously associated with intra- or intermolecular

cross-linkages (Kandpal and Boyer, 1987), this indicates that formation of  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages occurs in a functional fraction of enzymes where IF<sub>1</sub> release, i.e., ATPase activation, is restored by reduction with DTT. The overall inhibition of ATPase activity can be also associated with other cross-linkages not involving IF<sub>1</sub> (see, for example, Joshi and Burrows, 1990, and Fig. 6(C)). This is more evident at higher DSP concentrations where the reversibility by DTT declines (Fig. 5(B)) and formation of nonspecific cross-linkages increases (Fig. 5(A)). Saturation of the Western-blot signal (Fig. 5(B)) might underestimate the calculated yield of  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> and  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> at concentrations of DSP > 50  $\mu$ M, which actually increases in the immunoprecipitated enzyme (Fig. 6(B)). This would shift the curves of cross-linking yield to the right, therefore improving the correlation with activation assays.

*Detection of DSP cross-linked products containing IF<sub>1</sub> in the immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex.* According to the previous data, cross-linking was carried out in SMP with 25 and 100  $\mu$ g/mL of DSP. Afterwards, the fully functional F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I-ATP synthase (Aggeler *et al.*, 2002) was solubilized and immunoprecipitated as explained under Materials and Methods. Coomassie staining of the SDS-PAGE showed a clean preparation of control and cross-linked F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complexes (Fig. 6(A)). Reducing and nonreducing SDS-PAGE of the DSP cross-linked samples showed a DTT-sensitive Coomassie-stained band of about 36 kDa (Fig. 6(A)) that corresponded to the  $\gamma$ - $\epsilon$  cross-linkage found in F<sub>1</sub>I (Figs. 2 and 3). High-molecular weight and DTT-sensitive cross-linked bands were also present (see Fig. 6(A), above  $\alpha$  and  $\beta$  subunits). As with soluble F<sub>1</sub>I, the nature of these products was not ascertained.

Western blotting with the monoclonal against IF<sub>1</sub> (Fig. 6(B)) confirmed the presence of the  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> (43 kDa) cross-linked product that was observed in soluble F<sub>1</sub>I, and in whole SMP (Fig. 5). It was important to show that the 43-kDa  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> band disappeared almost completely after DTT reduction (Fig. 6(B)). In contrast, although the  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> (16 kDa), IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> (20 kDa), and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> (66 kDa) products were also observed in immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I (Fig. 6(B)), their reversibility by DTT was lower than in soluble F<sub>1</sub>I and they were also present in the non-cross-linked enzyme. This may result from insoluble IF<sub>1</sub> aggregates that are also observed in the purified recombinant IF<sub>1</sub> (Fig. 6(D)). The extent of cross-linking increased with 100  $\mu$ g/mL of DSP. In this case, smearing was not observed, as was the case for SMP (Fig. 5). Presumably the nonspecific IF<sub>1</sub> products formed in SMP were eliminated after solubilization and immunoprecipitation. Further 2D SDS-PAGE carried out before (Fig. 6(A)) and after Western blotting against IF<sub>1</sub> (Fig. 6(B)) confirmed the presence of the  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> (66 kDa),  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> (43 kDa), and  $\gamma$ - $\epsilon$



**Fig. 6.** Detection of  $\gamma$ -IF<sub>1</sub>,  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub>, and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> cross-linking products in the native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex by 1D and 2D SDS-PAGE, and Western blotting. SMP were incubated with 25  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/mL of DSP as described before, and F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I was solubilized and immunoprecipitated as described under Materials and Methods. (A) Coomassie staining of 30  $\mu$ g/lane of control (“C”) and F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I cross-linked with 25 and 100  $\mu$ g/mL DSP (named “25” and “100”). Lanes 1–3 without DTT, and lanes 4–6 previously reduced with 10 mM DTT. (B) Immunoblotting of 5  $\mu$ g of immunoprecipitated enzyme per lane with the IF<sub>1</sub> mAb. Where indicated, 20 mM DTT was added to the samples 20 min before loading the gels. (C) Reducing 2D SDS-PAGE of 300  $\mu$ g of immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I previously cross-linked with 25  $\mu$ g/mL DSP in SMP. The gel was stained with silver. Two  $\gamma$  spots were vertically aligned with  $\epsilon$  and  $\gamma$  (dashed circles). Other cross-linked subunits also appeared corresponding to the second stalk proteins. Those products were not further analyzed. The left standard is purified F<sub>1</sub>I complex. The  $\delta$  subunit was not stained very well in the standard with silver, but it was strongly stained with Coomassie (not shown). (D) The entire lane of nonreducing first dimension containing 20  $\mu$ g of cross-linked F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I was excised and subjected to reducing 2D SDS-PAGE to detect the IF<sub>1</sub> products of low-molecular weight. Western blotting with the mAb against IF<sub>1</sub> showed that IF<sub>1</sub> aligned vertically under residual  $\alpha$ -IF<sub>1</sub>,  $\gamma$ -IF<sub>1</sub>, IF-IF<sub>1</sub>, and  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> cross-linking products. An apparent IF<sub>1</sub> product appeared in the diagonal between  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> and (IF<sub>1</sub>)<sub>2</sub> that was an artifact formed by gel fracture before the transfer. Note the residual IF<sub>1</sub> aggregate of approximately 66 kDa that appears in the left standard lane loaded with pure recombinant IF<sub>1</sub>. This band comigrates with the  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> product of 66 kDa.

(36 kDa) products in the immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex. In the 2D gel stained with silver (Fig. 6(A)), the  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> product was not evident because it was not included in the lane fragment of the 1D gel, or because it was present as a low-yield product. However, other products contain-

ing second stalk subunits were also observed in the region of 15–30 kDa after silver staining (Fig. 6(C)). Since some of them have been observed before (Joshi and Burrows, 1990), these were not further analyzed. Taken together, these experiments confirm that the  $\gamma$ -IF<sub>1</sub>,  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub>, and

## Cross-Linking of IF<sub>1</sub> With the Rotor of the ATP Synthase

441

$\alpha$ -IF<sub>1</sub> cross-linked products are not exclusive of the soluble F<sub>1</sub>I complex, and they are also formed in the native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex of the inner mitochondrial membrane.

### DISCUSSION

This work shows the closest distance found so far ( $\leq 12$  Å) between IF<sub>1</sub> and subunits  $\gamma$  and  $\epsilon$  of the mitochondrial ATP synthase rotor. Because the  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages were obtained with the endogenous IF<sub>1</sub> in the soluble F<sub>1</sub>I and in the native F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex, the biological relevance of these results is reinforced. Most of the previous studies have been made with isolated or reconstituted IF<sub>1</sub> in the soluble F<sub>1</sub>I complex.

The most important implication of these results is that according to previous proposals (Cabezón *et al.*, 2001; García *et al.*, in press; Lai-Zhang *et al.*, 1999) IF<sub>1</sub> could interfere with the angular movement of the central stalk. For a long time, and on the basis of cross-linking studies (Beltrán *et al.*, 1988; Jackson and Harris, 1988; Klein *et al.*, 1980; Mimura *et al.*, 1993), it has been assumed that IF<sub>1</sub> exerts its inhibitory action by blocking conformational changes of the  $\beta$  subunits. Therefore, our results showing that IF<sub>1</sub> cross-links with stator ( $\alpha$ ) and rotor ( $\gamma$ ,  $\epsilon$ ) subunits strongly suggest that the primary mechanism of IF<sub>1</sub> may also involve the interference with rotation. These results also suggest that IF<sub>1</sub> may interact with the  $\alpha/\beta$  interfaces, thus IF<sub>1</sub> could interfere with the closure of catalytic  $\alpha/\beta$  interfaces, i.e., resembling the inhibition by aurovertin (Van Raaij *et al.*, 1996). Conversely, the cross-linking of IF<sub>1</sub> with  $\alpha$  and  $\beta$  subunits suggests that these interactions could stabilize its association with the stator to resist the drag exerted by the rotor to inhibit ATP hydrolysis. Furthermore, formation of the IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> cross-linking with endogenous IF<sub>1</sub> in soluble F<sub>1</sub> and whole F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex (Figs. 3 and 6) confirms that IF<sub>1</sub> may exist in a dimerized form in the native enzyme, as suggested by studies with isolated and reconstituted recombinant IF<sub>1</sub> (Cabezón *et al.*, 2000a,b).

Previous studies of phosphorescence decay (Solaini *et al.*, 1997) and of fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Baracca *et al.*, 2002) indicated that IF<sub>1</sub> is proximal to  $\epsilon$  and  $\gamma$  subunits. FRET studies showed that the N-terminal inhibitory region of IF<sub>1</sub> is closer than its C terminus to the so-called  $\beta_E$ -DELSEED region (Abrahams *et al.*, 1994; Baracca *et al.*, 2002). However, the closest distance found in soluble F<sub>1</sub>I between  $\gamma$  and reconstituted IF<sub>1</sub> fragments was 50–60 Å (Baracca *et al.*, 2002), a distance 4–5 times larger than the upper limit of 12 Å indicated by our cross-linking data. The 12 Å cross-linking distance of DSP is calculated from its extended structure, therefore

it could be shorter if DSP rotates and bends its bonds to cross-link lysines that are closer than 12 Å to each other. Therefore, the  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\gamma$ - $\epsilon$  cross-linkages that we found (Figs. 1–3 and 6) provide the most conclusive structural evidence described so far showing that IF<sub>1</sub> is located at a distance short enough to interfere with rotation of the central stalk. Because  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits interact closely to each other in the central stalk (Gibbons *et al.*, 2000), the detection of  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages complement each other to confirm the close proximity of IF<sub>1</sub> to the central rotor at a distance  $\leq 12$  Å. Although the lysine residues involved in these cross-linkages were not determined, a possible docking site of the inhibitory N-terminal region of IF<sub>1</sub> in the F<sub>1</sub>-ATPase can be inferred from the current structural data available. As mentioned, according to cross-linking (Jackson and Harris, 1988) and FRET (Baracca *et al.*, 2002) experiments the functionally inhibitory N-terminal portion of IF<sub>1</sub> (Harris, 1997; Lebowitz and Pedersen, 1996; Papa *et al.*, 1996; Van Heeke *et al.*, 1993; Van-Raaij *et al.*, 1990) is closer to the  $\beta_E$ -DELSEED region than to the other  $\beta$  subunits. According to FRET analyses, K24 of this inhibitory domain of IF<sub>1</sub> is closer than the other lysines to the  $\gamma$  subunit (Baracca *et al.*, 2002). Furthermore, K24 is the only lysine of IF<sub>1</sub> that becomes less accessible to chemical modification upon binding to F<sub>1</sub> (Jackson and Harris, 1986). Thus, K24 is the best candidate to be in cross-linking distance to  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , and probably the  $\beta_E$ -DELSEED region. However, the lysine residues of IF<sub>1</sub> actually cross-linked with  $\gamma$  and  $\epsilon$  will be determined by the angular position of the rotor relative to IF<sub>1</sub>. This relative angular position may also determine the low cross-linking yield observed (Figs. 1–3 and 6) since only those  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits properly oriented would cross-link with IF<sub>1</sub>. In this line, we used Rasmol 2.6 to accommodate the IF<sub>1</sub> fragment 19–47 derived from the crystal structure of IF<sub>1</sub> H49K (Cabezón *et al.*, 2001) into the  $\beta_E/\alpha_E$  interface of the crystal structure of F<sub>1</sub> interface of the crystal structure of F<sub>1</sub>-DCCD (Gibbons *et al.*, 2000) (not shown). We used the orientation of IF<sub>1</sub> suggested by Baracca *et al.* (2002), and we added the restriction of about 12 Å cross-linking distance between IF<sub>1</sub> and  $\gamma$  or  $\epsilon$  subunits. The IF<sub>1</sub> 19–47 fragment fitted very well in a cleft formed between  $\beta_E$ -DELSEED and the central stalk, with K24 in cross-linking distance to  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits. In this or another similar position, IF<sub>1</sub> would interfere with rotation of the central stalk and it also will interact with the  $\alpha_E/\beta_E$  interface. The position of IF<sub>1</sub> in this or another  $\alpha/\beta$  interface is in concordance with previous reports (Cabezón *et al.*, 2001; Stout *et al.*, 1993) suggesting that the inhibitory domain of IF<sub>1</sub> could substitute an homologous  $\beta$ -DELSEED domain by interacting with  $\gamma$  at this “catch” position (Abrahams *et al.*, 1994),

therefore interfering with rotation and possibly with the  $\alpha/\beta$  inter-subunit communication. This or a similar position of IF<sub>1</sub> will also allow changes in  $\alpha$ -helical content of the N-terminal and C-terminal regions of IF<sub>1</sub> that are important for the inhibitory action of IF<sub>1</sub> (Lebowitz and Pedersen, 1993, 1996), including formation of a C-terminal antiparallel coiled-coil with another IF<sub>1</sub> (Cabezón *et al.*, 2000a,b) to form F<sub>1</sub>I dimers (Cabezón *et al.*, 2000a,b; Domínguez-Ramírez *et al.*, 2001). The mechanism of inhibition of IF<sub>1</sub> could be therefore similar to that of  $\epsilon$  subunit of the *E. coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex. The latter subunit works as a ratchet that inhibits rotation only in the ATPase direction by extending its two C-terminal  $\alpha$ -helices toward the DELSEED region of a  $\beta$  subunit (Hara *et al.*, 2001; Tsunoda *et al.*, 2001). Because bovine IF<sub>1</sub> cross-links with the  $\beta$ -DELSEED region (Jackson and Harris, 1988) and with  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits (Figs. 1 and 2) the overall data suggest that IF<sub>1</sub> could also control rotation of the central stalk by a mechanism similar to that of  $\epsilon$  in the *E. coli* ATP synthase. Furthermore, the proton motive force is an important factor since it prevents the productive association of IF<sub>1</sub> with the ATP synthase, therefore favoring the ATP synthase activity of the enzyme (Gómez-Puyou *et al.*, 1979; Harris *et al.*, 1979; Schwersmann and Pedersen, 1981; Van De Stadt *et al.*, 1973).

In summary, this work shows the closest proximity reported between the endogenous IF<sub>1</sub> and the rotor of the soluble F<sub>1</sub>I complex. To date, his work provides the more conclusive structural evidence supporting the proposal (Cabezón *et al.*, 2001; García *et al.*, in press; Lai-Zhang *et al.*, 1999) that the inhibitory mechanism of IF<sub>1</sub> may involve the blockade of the angular movement of the rotor in addition to its possible interference with the conformational changes of an  $\alpha/\beta$  catalytic interface. In the whole F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex, IF<sub>1</sub> may be associated to other subunits of the stator and probably of F<sub>0</sub> to resist the rotational drag, therefore adding more stability to the productive binding of IF<sub>1</sub> (García *et al.*, 2000, in press; Papa *et al.*, 2000). It will be important to determine the effect of IF<sub>1</sub> on the rotational movement of the central stalk, and the possible conformational changes that IF<sub>1</sub> experience in the whole ATP synthase to inhibit ATP hydrolysis and favor ATP synthesis *in situ*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant No. J34744-N from CONACyT, México. The critical review of this work is acknowledged to Professors Marietta Tuena de Gómez-Puyou, and Armando Gómez-Puyou from the National University of México. They also kindly pro-

vided the antibody directed against the  $\gamma$  subunit. The rat liver IF<sub>1</sub> cloned in pMal-IF<sub>1</sub> in *E. coli* was a generous gift of Prof Roderick A. Capaldi. (Original source: Dr Peter L. Pedersen, The Johns Hopkins University School of Medicine.) Prof. Capaldi also made important suggestions. We thank the help of Leopoldo Gómez-Caudillo with statistical analyses.

#### REFERENCES

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994). *Nature (London)* **370**, 621–628.
- Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S. W., Gosh, S. S., García, J. J., Capaldi, R. A., and Marusich, M. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 33906–33912.
- Aggeler, R., Ogilvie, I., and Capaldi, R. A. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 19621–19624.
- Baracca, A., Barogi, S., Paolini, S., Lenaz, G., and Solanini, G. (2002). *Biochem. J.* **362**, 165–171.
- Beltrán, C., Gómez-Puyou, A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **152**, 867–873.
- Boyer, P. D. (2000). *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 252–262.
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., and Walker, J. E. (2000a). *J. Biol. Chem.* **275**, 28353–28355.
- Cabezón, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (2000b). *J. Biol. Chem.* **275**, 25460–25464.
- Cabezón, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2001). *EMBO J.* **20**, 6990–6996.
- Capaldi, R. A., and Aggeler, R. (2002). *Trends Biochem. Sci.* **27**, 154–160.
- Domínguez-Ramírez, L., Mendoza-Hernández, G., Cárabez-Trejo, A., Gómez-Puyou, A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. (2001). *FEBS Lett.* **507**, 191–194.
- Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L., and Cross, R. L. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10964–10968.
- Feinstein, D. L., and Moundrianakis, E. N. (1984). *J. Mol. Biol.* **259**, 4230–4236.
- Fornells, L. A. M., Guimaraes-Motta, N., Neheme, J. S., Martins, O. B., and Silva, J. L. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 304–312.
- Galante, Y. M., Wong, S.-Y., and Hatefi, Y. (1981). *Biochemistry* **20**, 2671–2678.
- García, J. J., Bravo, C., and Minauro-Sanmiguel, F. (in press). In *Recent Research Developments in Bioenergetics* (García, J. J., and Pandalarai, S. G., eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, India.
- García, J. J., Ogilvie, I., Robinson, B. H., and Capaldi, R. A. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 11075–11081.
- García, J. J., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1995). *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 127–36.
- Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2000). *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055–1061.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Ernster, L. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **547**, 252–257.
- Gordon-Smith, D. J., Carbajo, R. J., Ynag, J.-Ch., Videler, H., Runswick, M. J., Walker, J. E., and Neuhaus, D. (2001). *J. Mol. Biol.* **308**, 325–339.
- Hara, K. Y., Kato-Yamada, Y., Kikuchi, Y., Hisabori, T., and Yoshida, M. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 23969–23973.
- Harris, D. A. (1997). *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 8–16.
- Harris, D. A., Von Tscharner, V., and Radda, G. K. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 72–84.
- Hashimoto, T., Negawa, Y., and Tagawa, K. (1981). *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 1151–1157.
- Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1986). *Biochem. J.* **235**, 577–583.
- Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1988). *FEBS Lett.* **229**, 224–228.

Cross-Linking of IF<sub>1</sub> With the Rotor of the ATP Synthase

443

- Joshi, S., and Burrows, R. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 14518–14525.
- Kandpal, R. P., and Boyer, P. D. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* **890**, 97–105.
- Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K., Jr., and Yoshida, M. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 19375–19377.
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., and Vignais, P. V. (1980). *Biochemistry* **19**, 2919–2925.
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., and Vignais, P. V. (1981). *Biochemistry* **20**, 1339–1344.
- Klein, G., Satre, M., Zaccari, G., and Vignais, P. V. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* **681**, 226–232.
- Krull, K. W., and Schuster, S. M. (1981). *Biochemistry* **20**, 1592–1598.
- Lai-Zhang, J., Xiao, Y., and Mueller, D. M. (1999). *EMBO J.* **18**, 58–64.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**, 680–685.
- Lebowitz, M. S., and Pedersen, P. L. (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 64–70.
- Lebowitz, M. S., and Pedersen, P. L. (1996). *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 342–354.
- Lopez-Mediavilla, C., Vigny, H., and Godinot, C. (1993). *Eur. J. Biochem.* **215**, 487–496.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N., and Tagawa, K. (1993). *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 350–354.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K., Jr. (1997). *Nature (London)* **386**, 299–302.
- Noji, H., and Yoshida, M. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 1665–1668.
- Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perrucci, C., Candita, C., and Minuto, M. (1996). *Eur. J. Biochem.* **240**, 461–467.
- Papa, S., Zanotti, F., and Gaballo, A. (2000). *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 401–411.
- Penefsky, H. S. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 527–530.
- Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769.
- Sabbert, D., Engelbrecht, S., and Junge, W. (1996). *Nature (London)* **381**, 623–625.
- Schwerzmann, K., Hüllihen, J., and Pedersen, P. L. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 9555–9560.
- Schwerzmann, K., and Pedersen, P. L. (1981). *Biochemistry* **20**, 6305–6311.
- Solaini, G., Baracca, A., Gabellieri, E., and Lenaz, G. (1997). *Biochem. J.* **327**, 443–448.
- Stout, J. S., Partridge, B. E., Dibern D. A., and Schuster, S. M. (1993). *Biochemistry* **32**, 7496–7502.
- Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J. W., Aggeler, R., Wilce, M. C. J., Yoshida, M., and Capaldi, R. A. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6560–6564.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 82–86.
- Valdés, A. M., and Dreyfus, G. (1987). *Biochem. Intl.* **15**, 459–466.
- Van De Stadt, R. J., De Boer, B. L., and Van Dam, K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 338–349.
- Van Heeke, G., Deforce, L., Schinzer, R. A., Shaw, R., Couton, J. M., Shaw, G., Song, P.-S., and Schuster, S. M. (1993). *Biochemistry* **32**, 10140–10149.
- Van Raaij, M. J., Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6913–6917.
- Van Raaij, M., Orriss, G. L., Montgomery, G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., and Walker, J. E. (1990). *Biochemistry* **35**, 16618–16625.
- Vázquez-Contreras, E., Vázquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. (1995). *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 109–116.

**Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis**

Fernando Minauro-Sanmiguel, Stephan Wilkens, and José J. García

*PNAS* 2005;102;12356-12358; originally published online Aug 16, 2005;  
doi:10.1073/pnas.0503893102**This information is current as of February 2007.**

|  |   |
|--|---|
| <b>Online Information &amp; Services</b> | High-resolution figures, a citation map, links to PubMed and Google Scholar, etc., can be found at:<br><a href="http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/35/12356">www.pnas.org/cgi/content/full/102/35/12356</a>   |
| <b>References</b>                        | This article cites 25 articles, 10 of which you can access for free at:<br><a href="http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/35/12356#BIBL">www.pnas.org/cgi/content/full/102/35/12356#BIBL</a><br><br>This article has been cited by other articles:<br><a href="http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/35/12356#otherarticles">www.pnas.org/cgi/content/full/102/35/12356#otherarticles</a> |
| <b>E-mail Alerts</b>                     | Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or <a href="#">click here</a> .   |
| <b>Rights &amp; Permissions</b>          | To reproduce this article in part (figures, tables) or in entirety, see:<br><a href="http://www.pnas.org/misc/rightperm.shtml">www.pnas.org/misc/rightperm.shtml</a>  |
| <b>Reprints</b>                          | To order reprints, see:<br><a href="http://www.pnas.org/misc/reprints.shtml">www.pnas.org/misc/reprints.shtml</a>   |

Notes:

# Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel $F_0$ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis

Fernando Minauro-Sanmiguel\*, Stephan Wilkens†, and José J. García\*\*

\*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," Tlalpan 14080 Mexico D.F., México; and †Department of Biochemistry, University of California, Riverside, CA 92521

Edited by Paul D. Boyer, University of California, Los Angeles, CA, and approved July 18, 2005 (received for review May 10, 2005)

The  $F_1F_0$ -ATP synthase exists as a dimer in mitochondria, where it is essential for the biogenesis of the inner membrane cristae. How two ATP synthase complexes dimerize to promote cristae formation is unknown. Here we resolved the structure of the dimeric  $F_1F_0$  ATP synthase complex isolated from bovine heart mitochondria by transmission electron microscopy. The structure of the ATP synthase dimer has an overall conic appearance that is consistent with the proposed role of the dimeric enzyme in mitochondrial cristae biogenesis. The ATP synthase dimer interface is formed by contacts on both the  $F_0$  and  $F_1$  domains. A cross-bridging protein density was resolved which connects the two  $F_0$  domains on the intermembrane space side of the membrane. On the matrix side of the complex, the two  $F_1$  moieties are connected by a protein bridge, which is attributable to the  $IF_1$  inhibitor protein.

$F_1F_0$  dimer | electron microscopy | protein bridge

The  $F_1F_0$  ATP synthase is a ubiquitous rotary motor enzyme that couples a transmembrane flow of protons through its  $F_0$  channel to ATP synthesis taking place on its  $F_1$  moiety (1). The mechanism of energy coupling between the  $F_1$  ATPase and the  $F_0$  proton channel involves a rotating central stalk as well as a peripheral stalk that is part of the stator. In the ATP synthase of *Escherichia coli* ( $EcF_1F_0$ ), five different subunits of  $F_1$  ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) and three of  $F_0$  ( $ab_2c_{10-12}$ ) form the core of the  $F_1F_0$  motor structure. The mitochondrial enzyme, also called complex V, is more complicated in that it contains the accessory proteins  $IF_1$ ,  $\epsilon$ ,  $A_6L$ ,  $F_6$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$ , and  $g$  in bovine heart. The enzyme of yeast mitochondria contains additional supernumerary subunits named  $i$  and  $k$ . With the exception of  $\epsilon$  and  $IF_1$ , which bind to  $F_1$ , most of the additional subunits are associated with the  $F_0$  proton channel or the peripheral stalk.  $IF_1$  is a small-molecular-weight protein that controls the ATPase and ATP synthase activities of the enzyme (2). The structure of soluble  $F_1$ -ATPase from bovine heart ( $MF_1$ ) reconstituted with  $IF_1$  corresponds to a  $F_1$ - $F_1$  dimer bridged by two  $IF_1$  molecules (3, 4). Low-resolution crystallographic studies of the whole  $F_1F_0$  complex from yeast showed a ring of 10 rotary  $c$ -subunits, but the other  $F_0$  subunits were not resolved (5). Remarkably, electron microscopy (EM) studies of  $EcF_1F_0$  (6) and the bovine heart complex V ( $MF_1F_0$ ) (7) provided the unique view of the second stalk (8) and the position of some of its subunits. EM was also used to resolve the whole architecture of bovine  $MF_1F_0$  in its typical monomeric form with the  $F_1$  and  $F_0$  parts connected by central and peripheral stalks (9). In addition, an ATP synthasome complex that contains monomeric  $F_1F_0$  associated to adenine nucleotide translocator and  $P_i$  carriers has also been examined by EM (10). This complex is assumed to improve the efficiency of ATP synthesis by substrate-product channeling.

Recently it was shown by blue native gel electrophoresis (BN/PAGE) that the mitochondrial ATP synthase of yeast can exist as a dimer (11, 12) and that dimer formation depends on the accessory subunits  $e$  and  $g$ . Deletion of these subunits abolishes ATP synthase dimerization, and, remarkably, mito-

chondria of these yeast cells exhibit altered morphology, suggesting that biogenesis of mitochondrial cristae depends on formation of the  $F_1F_0$  dimer (12, 13). Models in which  $F_1F_0$  dimers oligomerize to form arc-like assemblies and multimeric ATP synthase chains that can induce membrane invaginations and eventually cristae have been proposed (12, 14, 15). The models are based on the existence of a dimeric  $F_1F_0$  structure that remains, until now, unresolved. In this work, we purified dimeric  $F_1F_0$ -ATP synthase from bovine heart mitochondria and analyzed its structure by EM and single-particle image analysis. The images show that the dimer interface is formed predominantly by the two  $F_0$  domains in such a way that the long axes of the two ATP synthase monomers are arranged at an angle of  $\approx 40^\circ$ . The results indicate that the angle between the ATP synthase monomers determines the curvature observed in the cristae of the inner mitochondrial membrane upon further  $F_1F_0$  polymerization.

## Materials and Methods

**Extraction of Dimeric  $F_1F_0$ -ATP Synthase.** Mitochondria were isolated from bovine heart as described before (16). Isolated mitochondria were diluted to 10–15 mg/ml in solubilization buffer (750 mM 6-aminohexanoic acid/50 mM Bis-Tris, pH 7.0) and extracted with 2.5 mg/mg digitonin. Under these conditions, solubilization of dimeric  $F_1F_0$  is favored (11). Afterward, the samples were centrifuged at  $186,000 \times g$  for 45 min at  $4^\circ\text{C}$ , and the soluble fraction was recovered. BN/PAGE was carried out as described in ref. 11, and subsequent 2D SDS/PAGE was carried out as described in ref. 16.

**In-Gel ATPase Activity Staining.** Mitochondrial extracts were subjected to BN/PAGE. Lanes of interest were excised and incubated overnight at room temperature with ATPase activity-developing buffer (10 mM ATP/30 mM  $\text{CaCl}_2$ /50 mM HEPES, pH 8.0). Precipitated calcium phosphate was visualized as white bands on a dark background by densitometric scanning.

**Enrichment of Dimeric  $F_1F_0$  by Glycerol Gradient Centrifugation.** Mitochondrial digitonin extracts were loaded on a discontinuous glycerol gradient (20–40% glycerol/20 mM Mes, pH 7.0/2 mM EDTA/2 mM ADP/5 mM digitonin) and centrifuged at  $54,000 \times g$  for 16 h at  $4^\circ\text{C}$ . Afterward, 0.5-ml fractions were collected from the gradient from top to bottom. Fractions containing monomeric and dimeric  $F_1F_0$ -ATP synthase were identified by BN/PAGE followed by SDS/PAGE.

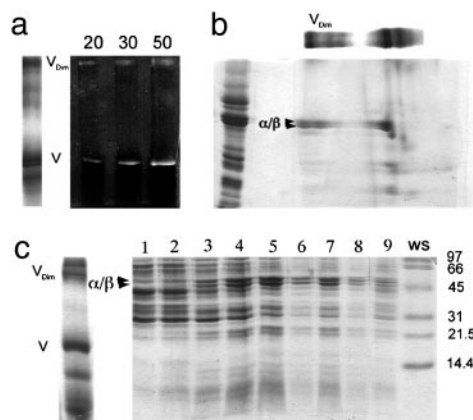
This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviation: BN/PAGE, blue native gel electrophoresis.

†To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez," Juan Badiano 1 Colonia Sección XVI, Tlalpan 14080 México D.F., México. E-mail: jggarcia.trejo@yahoo.com.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA





**Fig. 1.** Gel analysis of dimeric ATP synthase. (a) Digitonin extracts of mitochondrial protein complexes were subjected to BN/PAGE and stained with Coomassie blue (Left) or developed for ATPase activity (Right, containing 20–50  $\mu\text{g}$  of extracted protein). (b) An excised lane from the BN/PAGE was loaded as shown on top of a SDS/polyacrylamide gel together with an enriched  $F_1F_0$  standard (left lane). Major  $F_1$  subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and dimeric  $F_1F_0$  ( $V_{dim}$ ) are indicated. (c) Monomeric ( $V$ ) and dimeric ( $V_{dim}$ )  $F_1F_0$  were identified by BN/PAGE in a mitochondrial digitonin extract (Left). The digitonin extract was subsequently loaded on a glycerol density gradient, and fractions obtained after centrifugation were analyzed by SDS/PAGE (Right). Dimeric  $F_1F_0$  (fraction 7) was resolved from the monomer (fractions 4 and 5). The lane marked WS shows molecular mass standards. For details, see text.

**EM.** Samples of dimeric ATP synthase were diluted to 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and applied to carbon-coated copper grids. Grids were washed once with water and stained with 1% uranyl acetate. Grids were examined in a FEI Tecnai12 transmission electron microscope operating at 100 kV. Images were recorded on a 2,048  $\times$  2,048 slow-scan charge-coupled device camera in low-dose mode with an underfocus of 500 nm and an electron optical magnification of 30,000, placing the first zero of the contrast transfer function at  $\approx 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ . Images were analyzed with the IMAGIC-5 package of programs (17) on a dual processor Octane workstation (Silicon Graphics, Mountain View, CA). A data set of 1,130 molecular images (140  $\times$  140 pixels) was extracted interactively from a total of 111 charge-coupled device frames. Images were band-pass-filtered to eliminate unwanted spatial frequencies ( $< 0.008 \text{ \AA}^{-1}$  and  $> 0.13 \text{ \AA}^{-1}$ ) and normalized. Image analyses, including alignment by classification, multivariate statistical

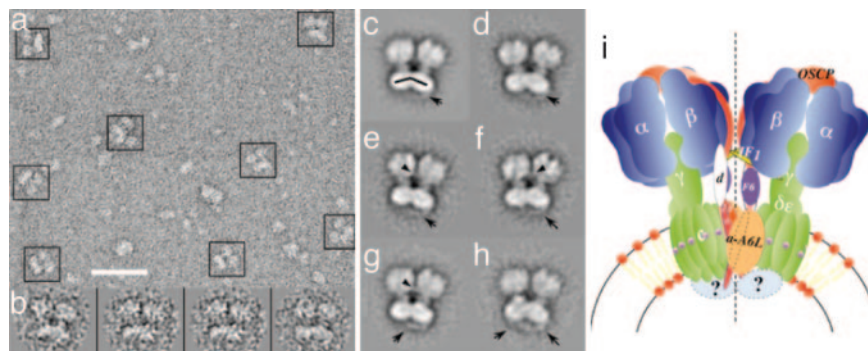
analysis, and multireference alignment were done as described in refs. 6 and 8.

## Results and Discussion

Dimeric ATP synthase was extracted from bovine heart mitochondria with digitonin and enriched by glycerol density gradient centrifugation. Fig. 1a Left shows BN/PAGE of respiratory chain complexes and dimers and monomers of the ATP synthase. The presence of ATP synthase at the top and in the middle of the native gel was confirmed by ATPase activity staining (Fig. 1a Right) and 2D SDS/PAGE (Fig. 1b). To obtain dimeric ATP synthase suitable for EM, the solubilized protein complexes were separated by centrifugation on glycerol gradients. The gradients were fractionated and analyzed by SDS/PAGE (Fig. 1c) where two ATP synthase peaks were observed (fractions 5 and 7). Analysis of the corresponding fractions by negative-stain EM revealed that the fraction near the bottom of the gradient (fraction 7) contained predominantly ATP synthase dimers (Fig. 2a). Representative images of the dimers are shown in Fig. 2b.

To determine the structure of the dimeric ATP synthase complex, a data set of 1,130 single images was collected and analyzed by computer-assisted single-particle image alignment and classification. Fig. 2c shows the average of the total data set calculated after the final alignment step. Fig. 2d–h shows the most characteristic averages of the data set after classification. Note that in Fig. 2c–h essentially all of the  $F_1F_0$  dimers are oriented on the carbon film to produce the side view projection in which the ATP synthase is seen perpendicular to the long axis of the complex. Closer inspection of the averages revealed that there are no image/mirror image pairs, suggesting that the two ATP synthase monomers associate to form a dimer with a twofold symmetry axis that passes through the dimer interface, parallel to the long axis of the complex.

The association of the two ATP synthase monomers occurs at the level of both  $F_0$  and  $F_1$  subunits (Fig. 2c–h). Associated  $F_0$  portions show very close packing in the membrane interface of the dimer, whereas the two  $F_1$  parts are more distant. This arrangement produces an angle of  $\approx 40^\circ$  between the long axes of the two  $F_1F_0$  monomers (see the black lines in the  $F_0$  domains, Fig. 2c). The two  $F_1$  parts of the dimer are connected by a bridge-like structure of low density (see arrowheads in Fig. 2e–g). Among several subunits of  $F_1$ , it is likely that this  $F_1$ – $F_1$  bridge corresponds to the inhibitor protein ( $IF_1$ ). Although  $IF_1$  is not essential for  $F_1F_0$  dimerization, as shown by gene disruption experiments in yeast (18) and by physical removal of  $IF_1$  in



**Fig. 2.** EM and image analysis of ATP synthase dimer. Dimeric  $F_1F_0$  enriched as described in the text and in Fig. 1 was used for EM analysis. (a) Area of a typical electron micrograph used for collecting single images. (Scale bar: 50 nm.) The ATP synthase dimers are indicated by boxes. (b) Representative images of the  $F_1F_0$  dimer. (c) Total average of a data set of 1,130 ATP synthase dimers after the final alignment step. (d–h) Averages of the aligned data set after sorting by multivariate statistical analysis. Between 100 and 150 individual images were averaged to produce the images shown. (i) Current working model of the dimeric  $F_1F_0$  ATP synthase complex. We propose that the association of the two  $F_0$  domains involves subunits e and g, which have been shown to be essential for dimer formation. The subunit arrangement is drawn according to cross-linking (16, 23) and EM data (7–10).  $F_1$  association might result from  $IF_1$  bridging in a similar way as seen in the crystal structure of the dimer of soluble  $F_1$ -ATPase (3). The proposed twofold symmetry axis is indicated by the dotted line. For details, see text.

bovine heart submitochondrial particles (19), the inhibitor protein does induce dimerization of the soluble  $F_1$  portion (3, 4, 20) by forming an  $IF_1$  bridge connecting the two  $F_1$  monomers (3, 4). Furthermore, when  $IF_1$  is overexpressed or reconstituted, the ratio of dimeric to monomeric  $F_1F_0$ -ATP synthase is significantly increased in digitonin extracts of rat liver mitochondria (J.J.G., unpublished data). Therefore, it is likely that the ATP synthase dimer can be formed in the absence of  $IF_1$  because the essential and closest contacts for  $F_1F_0$  dimerization take place at the  $F_0$  level (refs. 11–13 and Fig. 2); however, the binding of  $IF_1$  could stabilize this ATP synthase dimer by forming the observed  $F_1$ - $F_1$  bridge.

A salient feature of the images in Fig. 2 is that a novel bridging protein density was observed in the intermembrane space side of the complex; this is right underneath the interacting  $F_0$  parts (see arrows in Fig. 2 *c-f*). This protein density, which is not seen in the monomeric mitochondrial ATP synthase (7, 9), forms a hanging bridge-like structure connecting the two  $F_0$  domains of the dimer. The identity of the bridging protein(s) is not clear at this point, but in all likelihood it is formed by some of the dimer-specific accessory proteins of mitochondrial ATP synthase. The hanging bridge-like structure probably contains part of subunit e, which is known to be essential for dimer formation (18, 21). Subunit e contains a transmembrane GxxxG dimerization motif and a coiled-coil forming region in the C-terminal domain, which is predicted to protrude into the intermembrane space (21–23). Another subunit that was predicted to be bound on the intermembrane space of the yeast enzyme is subunit k (11). However, it remains to be established if a homologous protein exists in the ATP synthase complex from bovine heart mitochondria. It is also noted that  $MF_1F_0$  also forms an ATP synthasome complex containing complex V and adenine nucleotide translocator and Pi carriers (10); therefore, it is possible that other proteins contribute in the formation of the  $F_0$ - $F_0$  bridge.

It should be pointed out that the second stalk of the  $F_1F_0$  complex has been previously resolved by EM of the bacterial (6) and mitochondrial (11, 12) enzymes. Our data do not show the peripheral stalk; it is possible that this is occluded in the dimer interface. Fig. 2*i* shows our current working model of the  $F_1F_0$ -ATP synthase dimer. We have depicted the dimer-forming subunits (e and g) in the  $F_0$ - $F_0$  interface close to subunits 6 and

8 on the base of the second stalk according to cross-linking studies (23). The  $F_0$  bridging protein seems to reinforce the  $F_0$ - $F_0$  interface, thereby stabilizing the dimeric arrangement of the ATP synthase.

The most striking feature of the ATP synthase dimer is the conic geometry with which the two ATP synthase monomers are arranged. This conic shape of the dimer is consistent with the current models of cristae biogenesis, in that the inner mitochondrial membrane adopts a curvature comparable to the 40° angle formed by the tilting of the  $F_1F_0$  monomers. As put forth by Allen (14), polymerization of conic  $F_1F_0$  dimers could induce budding of the inner mitochondrial membrane, which would ultimately result in the observed tubular structure of the membrane cristae. Other authors have made similar proposals on the basis of genetic disruption of the dimer forming ATP synthase subunits e, g, and k (12, 13, 15, 21). The  $F_1F_0$  polymer should also add stability to the monomeric  $F_1F_0$  and resistance to the rotational drag of the central rotor to carry out ATP synthesis more efficiently.

In conclusion, the EM images of the mitochondrial  $F_1F_0$ -ATP synthase dimer here presented reveal the geometric arrangement of the two monomers of the complex. The data show that the two ATP synthase monomers are joined by protein bridges on both the intermembrane space and matrix sides of the complex. The tilting of the two monomers indicates that the formation of  $F_1F_0$  polymers could be a central issue in the formation of mitochondrial cristae, which are membrane structures designed to increase the overall surface available for oxidative phosphorylation. Further studies will be required to define the identity of the bridging subunits of the ATP synthase dimer and to confirm the role of this dimer in cristae biogenesis.

The valuable suggestions of Prof. Armando Gómez-Puyou (National University of México, Mexico City) on the revised version of this work are gratefully acknowledged. This work was supported by the University of California Institute for Mexico and the United States–Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Collaborative Grant CN-02-44 (to J.J.G. and S.W.), CONACyT (México) Grants J34744-N and V43814-M (to J.J.G.), and National Institutes of Health Grant GM68600 (to S.W.). F.M.-S. was partially supported by Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado Grant 202362 from the National University of México.

- Boyer, P. D. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 252–262.
- Pullman, M. E. & Monroy, G. C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769.
- Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. & Walker, J. E. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 744–750.
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G. & Walker, J. E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28353–28355.
- Stock, D., Leslie, A. G. & Walker, J. E. (1999) *Science* **286**, 1687–1688.
- Wilkens, S., Zhou, J., Nakayama, R., Dunn, S. D. & Capaldi, R. A. (2000) *J. Mol. Biol.* **295**, 387–391.
- Karrasch, S. & Walker, J. E. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 379–384.
- Wilkens, S. & Capaldi, R. A. (1998) *Nature* **393**, 29.
- Rubinstein, J. L., Walker, J. E. & Henderson, R. (2003) *EMBO J.* **22**, 6182–6192.
- Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S. J., Chiu, W. & Pedersen, P. L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 31761–31768.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. & Schagger, H. (1998) *EMBO J.* **17**, 7170–7178.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couly, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. & Velours, J. (2002) *EMBO J.* **21**, 221–230.
- Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D. & Velours, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 40392–40399.
- Allen, R. D. (1994) *Protoplasma* **189**, 1–8.
- Gavin, P. D., Prescott, M., Luff, S. E. & Devenish, R. J. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 2333–2343.
- Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. & García, J. J. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 433–443.
- Van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R. & Schatz, M. (1996) *J. Struct. Biol.* **116**, 17–24.
- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. & Stuart, R. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39289–39295.
- Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D. A., Mavelli, I. & Lippe, G. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1556**, 133–141.
- Domínguez-Ramírez, L., Mendoza-Hernandez, G., Cárabez-Trejo, A., Gómez-Puyou, A. & Tuena de Gómez-Puyou, M. (2001) *FEBS Lett.* **507**, 191–194.
- Arselin, G., Giraud, M. F., Dautant, A., Vaillier, J., Brethes, D., Couly, B., Salin, B., Schaeffer, J. & Velours, J. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 1875–1884.
- Everard-Gigot, V., Dunn, C. D., Dolan, B. M., Brunner, S., Jensen, R. E. & Stuart, R. A. (2005) *Eukaryot. Cell.* **4**, 346–355.
- Belogradov, G. I., Tomich, J. M. & Hatfield, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20340–20345.

# Overexpression of the Inhibitor Protein IF<sub>1</sub> in AS-30D Hepatoma Produces a Higher Association with Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP Synthase Compared to Normal Rat Liver: Functional and Cross-Linking Studies

Concepción Bravo,<sup>1</sup> Fernando Minauro-Sanmiguel,<sup>1</sup> Edgar Morales-Ríos,<sup>1</sup> José S. Rodríguez-Zavala,<sup>1</sup> and José J. García<sup>1,2</sup>

Received January 9, 2004; accepted January 15, 2004

According to functional studies, the higher IF<sub>1</sub> content reported in mitochondria of cancerous cells is supposed to induce a higher association with the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex than in normal cells and therefore a better inhibition of its ATPase activity. The first structural evidence supporting this prediction is here presented. Densitometric analyses of Western blotting experiments indicated a 2-fold increase in IF<sub>1</sub> content of AS-30D submitochondrial particles compared to normal rat liver controls. The ratio of IF<sub>1</sub>/F<sub>1</sub>  $\alpha$  subunit increased similarly as judged by Western blot analyses. This IF<sub>1</sub> overexpression correlated with a slower rate of IF<sub>1</sub> release (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activation) from the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex in AS-30D than in normal rat liver submitochondrial particles. The IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>,  $\gamma$ -IF<sub>1</sub>, and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages previously formed with dithiobis(succinimidylpropionate) in bovine F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I and IF<sub>1</sub> complexes (Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and García, J. J. (2002). *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 433–443) were reproduced in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I-ATP synthase of hepatoma AS-30D cells. However, a much lower yield of IF<sub>1</sub> cross-linkages was found in normal rat liver particles which made them almost undetectable in SMP as well as in the immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex. Modeling *in vivo* IF<sub>1</sub> overexpression of cancerous cells by *in vitro* reconstitution of excess recombinant IF<sub>1</sub> with rat liver submitochondrial particles devoid of IF<sub>1</sub> reproduced the same IF<sub>1</sub> cross-linkages observed in AS-30D particles.

**KEY WORDS:** Inhibitor protein; IF<sub>1</sub>; F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase; cancer; cross-linking; AS-30D.

## INTRODUCTION

The mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex synthesizes most of the ATP required by the cell by using Mg<sup>2+</sup> ADP and Pi as substrates. Because it is a reversible rotary motor enzyme, it can synthesize or hydrolyze ATP according to the working conditions. Thermodynamically, the enzyme is biased to ATP synthesis by the proton motive force ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) generated by the respiratory chain. The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase is also driven by the constant supply

of ADP and Pi by adenine nucleotide (ANT) and Pi carriers, respectively. Furthermore, a recent report indicates the presence of an ATP synthasome supercomplex containing F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>, ANT, and Pi carriers (Ko *et al.*, 2003) which ensures a more efficient ATP synthesis turnover. As a further mechanism to prevent ATP hydrolysis, the mitochondrial enzyme contains an inhibitor protein (IF<sub>1</sub>) which arrests the forward and backward functioning of

Abbreviations used: CAPS, 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid; DSP, dithiobis(succinimidylpropionate); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; F<sub>1</sub>, the soluble F<sub>1</sub>-ATPase; F<sub>1</sub>I, the complex of soluble F<sub>1</sub>-ATPase containing the inhibitor protein; F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I, the native ATP synthase containing the inhibitor protein; IF<sub>1</sub>, the inhibitor protein of the mitochondrial ATP synthase; mAb, monoclonal antibody; SDS-PAGE, denaturing sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SMP, submitochondrial particles; WB, Western blot.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez," México, México.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed at Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano # 1, Col. Sección XVI, México D.F. 14080, México; e-mail: jjgarcia\_trejo@yahoo.com.

the enzyme when the  $\Delta\mu_{H^+}$  drops (Gómez-Puyou *et al.*, 1979; Harris *et al.*, 1979; Pullman and Monroy, 1963; Schwerzmann and Pedersen, 1986). Re-establishment of  $\Delta\mu_{H^+}$  releases the inhibitory action of IF<sub>1</sub> (Harris *et al.*, 1979; Gómez-Puyou *et al.*, 1979) and favors ATP synthesis. Therefore, *in vivo* IF<sub>1</sub> produces a net inhibition of ATP hydrolysis. Physiologically, IF<sub>1</sub> protects the heart, and presumably other tissues, from ischemia-reperfusion injury by preventing cellular ATP depletion (Ala-Rämi *et al.*, 2003; Rouslin, 1991). IF<sub>1</sub> inhibits more efficiently the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in submitochondrial particles isolated from ischemic hearts in comparison with nonischemic controls (Ala-Rämi *et al.*, 2003; Rouslin, 1991). As a further tissue specific regulation, the expression of IF<sub>1</sub> relative to ATP synthase is higher in the heart than in other organs (Rouslin and Broge, 1996). This is in accordance with the high energy demand and fast regulation required by the heart. In contrast, it has been shown that in a more glycolytic tissue like rat liver, the IF<sub>1</sub> is subexpressed relative to the ATP synthase (Schwerzmann *et al.*, 1982), and therefore the ATPase activity of the rat liver F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> is higher.

On the other hand, several reports have shown that IF<sub>1</sub> is overexpressed in mice (Capuano *et al.*, 1997; Chernyak *et al.*, 1991; Luciakova and Kuzela, 1984) and human (Chernyak *et al.*, 1994) cancerous cells. On the basis of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase determinations, it has been proposed that the excess of IF<sub>1</sub> should prevent ATP hydrolysis more efficiently in cancerous cell lines than in normal cells (Chernyak *et al.*, 1991). Since many cancer cell lines exhibit a high glycolytic capacity, it has been concluded that IF<sub>1</sub> inhibits hydrolysis of the glycolytic ATP in these cells (Chernyak *et al.*, 1991). However, there is no structural evidence supporting a better productive interaction of IF<sub>1</sub> with the ATP synthase in cancerous cells. In this work we developed a new method to determine the productive association of the endogenous IF<sub>1</sub> with the ATP synthase in submitochondrial particles (SMP). The AS-30D cell line from hepatocellular carcinoma origin (Chang *et al.*, 1967; Smith *et al.*, 1970) was used in parallel to normal rat liver to isolate mitochondria and SMP. We took advantage of previous cross-linking studies of IF<sub>1</sub> with rotor ( $\gamma$  and  $\epsilon$ ) and stator ( $\alpha$ ) subunits of the ATP synthase that we described before with bovine heart SMP (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002). We found that the higher expression of IF<sub>1</sub> in rat AS-30D hepatoma compared to rat liver produces a better productive association of IF<sub>1</sub> with the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex. This was demonstrated by greater IF<sub>1</sub>-rotor/stator cross-linking yields as well as by ATPase activity assays.

## MATERIALS AND METHODS

Rat liver mitochondria and digitonin-extracted mitochondria from AS-30D hepatoma were obtained as

described before (Moreno-Sánchez, 1985; Moreadith and Fiskum, 1984). "Mg-ATP" submitochondrial particles (SMP) containing the endogenous IF<sub>1</sub> were prepared as described elsewhere (García *et al.*, 1995). The endogenous IF<sub>1</sub> was released from the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of SMP by incubation in "Activation Media" containing Sucrose 125 mM, Tris-SO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 2 mM, KCl 100 mM, and ATP 10 mM, pH 8.0. SMP were incubated at 40°C and aliquots were withdrawn at indicated times for spectrophotometric measurement of ATPase activity (García *et al.*, 1995). Activity measurements of liver and hepatoma SMP were carried out immediately after SMP preparation avoiding cycles of freezing and thawing. This procedure improved the stability of IF<sub>1</sub> inhibition and the maximal ATPase activity obtained after activation. SMP devoid of IF<sub>1</sub> were obtained by sonication and incubation in Activation Media as described elsewhere (Klein *et al.*, 1982).

### Cross-Linking of IF<sub>1</sub> With Subunits of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I Complex in SMP

Cross-linking experiments were carried out with DSP (Pierce) in Sucrose-phosphate buffer as described before (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002). Bovine SMP were incubated at a concentration 1 mg/mL; liver and hepatoma SMP were cross-linked at a final concentration of 1.8 mg/mL, with the indicated concentrations of DSP. The reaction was carried out for 30 min at room temperature and arrested with 20 mM *L*-lysine.

### Immunodetection of Cross-Linked Subunits

SDS-PAGE was carried out under nonreducing (without DTT) and reducing (+20 mM DTT) conditions. Afterwards, proteins were transferred 2 h to transfer membranes at 100 mA in a buffer containing 100 mM CAPS, 10% methanol, pH 11.0. Monoclonal antibodies (mAb) raised against recombinant rat liver IF<sub>1</sub> or bovine  $\alpha$  subunit (García *et al.*, 1995) were used. Reactive bands were immunodetected with secondary goat antimouse IgG conjugated to HRP and the chemiluminescent ECL-Plus kit of Amersham-Pharmacia.

### Purification of Recombinant Rat Liver IF<sub>1</sub> and Reconstitution Into Liver SMP

Sequence of the rat liver ATPase inhibitor protein was excised from the pMalIF1 fusion vector (kindly provided originally by Prof. Pedersen from Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA)

## Increased IF<sub>1</sub> Association and Cross-Linking With ATP Synthase in Rat Hepatoma

259

using the synthetic oligonucleotides N1 (GGAATTC-CATATGGGGTCCGACTCG) to insert a NdeI site at the 5' region of the sequence and the C1 (CC-CAAGCTTTCAATGCTCACTATT) to insert a HindIII restriction site at the 3' region of the sequence. The PCR generated fragment was restricted with the NdeI and HindIII restriction enzymes and subcloned into a pIN-III-A3 derived IPTG inducible plasmid (Inouye and Inouye, 1985). The plasmid generated this way was transformed into the *Escherichia coli* BL21 strain for expression.

### Protein Overexpression

The protein was overexpressed according to (Zheng *et al.*, 1993). The cultures were started by the addition of 2 mL of an overnight grown culture to a 500 mL LB medium. After 3 h of incubation (or Abs 600 nm = 0.5) at 37°C, the protein expression was induced by the addition of 0.4 mM IPTG, the incubation was continued overnight. The cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm and washed twice with 100 mL saline solution. After overnight IPTG induction, cells were broken by sonication followed by DNase treatment. Cell debris were collected by 15,000 rpm centrifugation at 4°C and the supernatant was precipitated with 50% ammonium sulfate. After a second centrifugation, the supernatant was precipitated with 80% ammonium sulfate. The pellet was resuspended in 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 8.0 and IF<sub>1</sub> was concentrated in Amicon membranes (10 kDa cutoff). Afterwards, pH was readjusted to 6.5 and the concentrated sample was loaded into a 3 mL CM-Sepharose column preequilibrated in the same buffer. IF<sub>1</sub> was eluted with a gradient of 20–600 mM of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and simultaneously a pH gradient of 6.5–8.7. The IF<sub>1</sub> sample was concentrated and desalted as described above and stored at –80°C until used. The purity of the sample was higher than 90% as judged by SDS-PAGE, Coomassie staining, and densitometry analyses (not shown). Pure recombinant IF<sub>1</sub> was reconstituted with liver SMP devoid of IF<sub>1</sub> as described by Lebowitz and Pedersen (1993).

### Other Methods and Materials

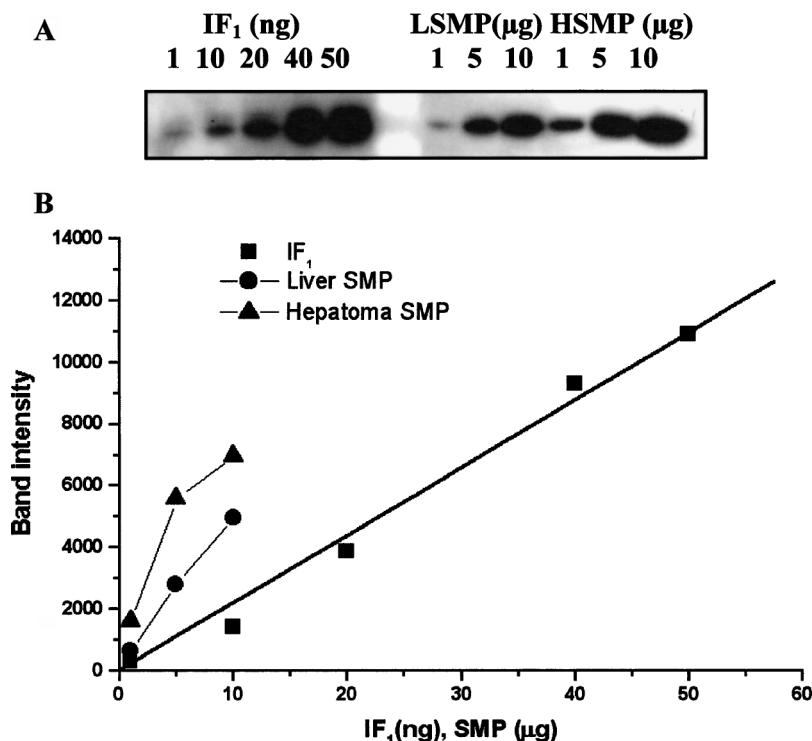
The amount of protein in SMP, F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I, and F<sub>1</sub>I preparations was measured with the method of Lowry *et al.* (1951). Densitometric analyses of Coomassie stained bands in SDS PAGE gels were carried out with the digital camera and imaging software "ALPHADIGIDOC" of Alpha Innotech Corporation according to the manufacturers instructions. In each gel the molecular weights of cross-linking products were calculated from interpolation using

the appropriate standards. The intensities of subunits were measured by peak integration after densitometry analyses. Coupling enzymes and substrates for ATPase activity were obtained from Sigma. Reactants for SDS PAGE were obtained from Bio-rad laboratories.

## RESULTS

Several reports have shown a higher expression of IF<sub>1</sub> in cancerous cells in comparison with normal cells. In order to compare the amount of IF<sub>1</sub> expressed in normal and cancerous cells, we designed a Western-blot titration approach in which loading of 1–50 ng of pure recombinant IF<sub>1</sub> resulted in a linear increase in band intensity as calculated from densitometry analyses. Higher amounts of IF<sub>1</sub> saturated the chemiluminescent signal of the detection system (not shown). Therefore, we interpolated the intensities of the IF<sub>1</sub> band obtained in normal and hepatoma SMP that were in the linear range of the titration curve. After several preparations and experiments carried out with different amounts of loaded protein, we found that the amount of IF<sub>1</sub> in hepatoma was about twice of that found in normal SMP from rat liver (Fig. 1). The amount of IF<sub>1</sub> estimated in liver and hepatoma SMP were  $0.55 \pm 0.11$  and  $0.26 \pm 0.04$  nmol/mg, respectively. This value is higher than that previously reported by Schwerzmann *et al.* (1982) for whole mitochondria. This might reflect the increase in IF<sub>1</sub> content in SMP relative to mitochondria since according to these authors IF<sub>1</sub> is mostly associated to the inner mitochondrial membrane.

In order to assay the functional association of IF<sub>1</sub> with the ATP synthase in SMP from AS-30D hepatoma and liver, F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activation assays were carried out. SMP were incubated in conditions that induce a progressive release of IF<sub>1</sub> to the media, i.e., pH 8.0, KCl 100 mM, and 40°C. At  $t = 0$  before activation, the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of AS-30D SMP showed about half of the basal F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activity of the normal rat liver enzyme (Fig. 2(A),  $t = 0$ ). Time courses revealed that the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from AS-30D SMP was activated with a slower rate than the control enzyme of SMP (Fig. 2(A)). However, both SMP reached similar maximal F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activities, although the enzyme from AS-30D hepatoma had a lower maximal ATPase rate. These results strongly suggest that in comparison with normal liver mitochondria, the higher expression of IF<sub>1</sub> in AS-30D hepatoma results in a better yield of productive association of IF<sub>1</sub> with the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex. Furthermore, the total amount of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase seems similar in AS-30D and normal liver mitochondria. According to maximal ATPase rates, if there is a difference in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase content in both systems, that should consist of a slightly lower amount of

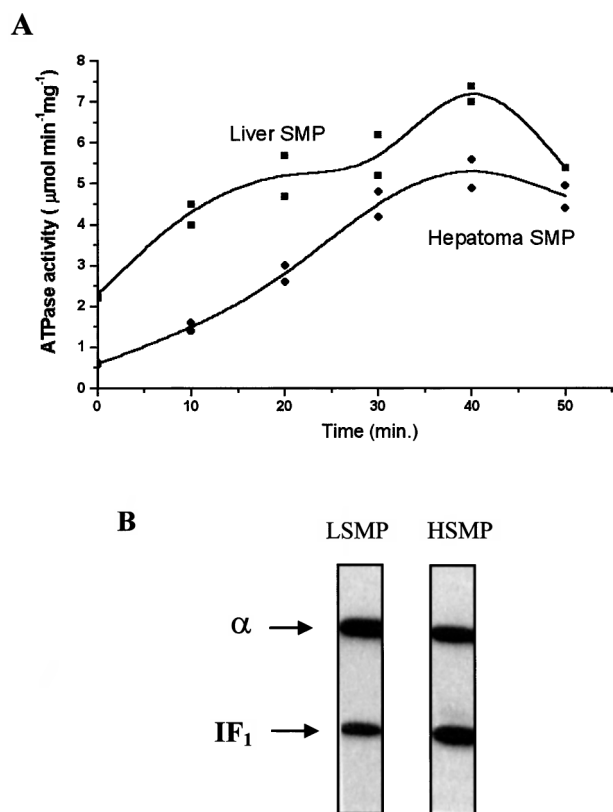


**Fig. 1.** Amount of IF<sub>1</sub> in liver and hepatoma SMP with Westernblot and densitometry analyses. (A) The shown amounts of recombinant rat liver IF<sub>1</sub>, liver (LSMP), and hepatoma (HSMP) submitochondrial particles were loaded on SDS-PAGE. Denaturing electrophoresis and WB were carried out as indicated in Materials and Methods with a mAb anti-IF<sub>1</sub>. The two clear spots in the center of the immunoblot membrane correspond to 7 and 14 kDa molecular weight standards which are negatively developed with the chemiluminescent kit, therefore estimated the size of the IF<sub>1</sub> band is 10 kDa, the expected size of IF<sub>1</sub>. (B) Densitometry analyses of each band was carried out as described in Materials and Methods. In the range of 1–50 ng of pure IF<sub>1</sub>, the band intensity increased linearly. With higher IF<sub>1</sub> amounts the band intensity diminished due to signal saturation (not shown). The content of IF<sub>1</sub> in SMP was estimated with interpolation of the observed band intensities obtained with known amounts of SMP protein in this linear range of IF<sub>1</sub> titration.

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in AS-30D SMP. To confirm this, we carried out a simultaneous immunodetection of IF<sub>1</sub> and the  $\alpha$  subunit of F<sub>1</sub>. Densitometry analyses (Fig. 2(B)) showed that the relative amounts of  $\alpha$  subunit was slightly lower in AS-30D SMP than in control rat liver particles ( $\alpha$  AS-30D/ $\alpha$  liver = 0.9). However, the ratio of IF<sub>1</sub>/ $\alpha$  intensities increased in AS-30D hepatoma (IF<sub>1</sub>/ $\alpha$  = 1.2) relative to normal rat liver SMP (IF<sub>1</sub>/ $\alpha$  = 0.8). These observations are in concordance with previous reports where the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase was found reduced in rat hepatoma cells (Kuzela *et al.*, 1977). Furthermore, the  $\beta$  subunit was also found diminished in mitochondria derived from human cancer cells (Capuano *et al.*, 1996, 1997). Taken together, the functional and WB analyses show that IF<sub>1</sub> is indeed over-expressed in AS-30D cells in relation to ATP synthase expression leading to a better inhibition of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in cancer cells.

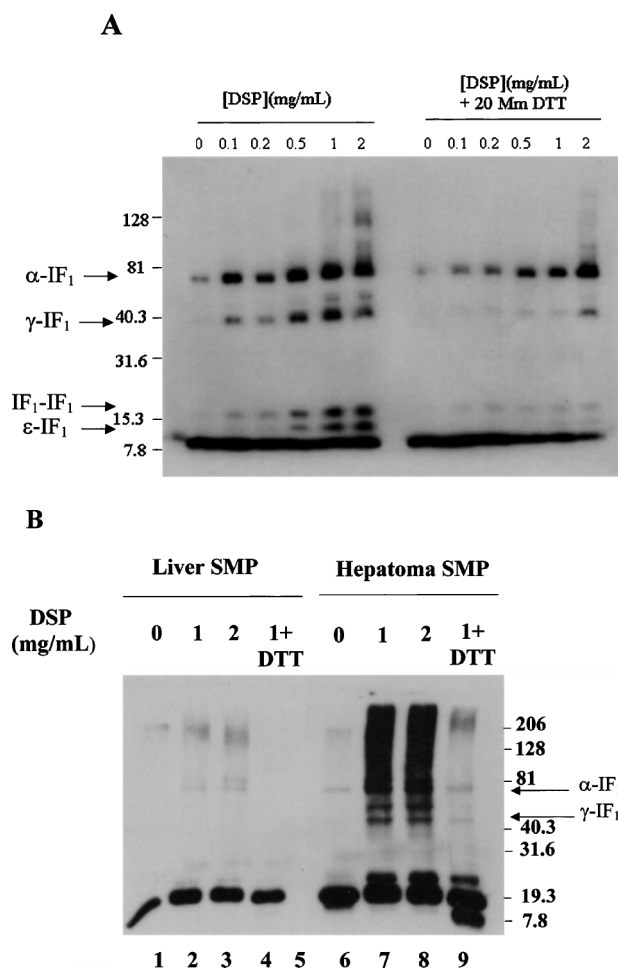
To obtain structural evidence for the association of IF<sub>1</sub> with the ATP synthase, we carried out DSP cross-linking of IF<sub>1</sub> with rotor ( $\gamma$ ,  $\epsilon$ ) and stator ( $\alpha$ ) subunits of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex as we described before with the bovine heart enzyme (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002, and Fig. 3). SMP from liver and AS-30D hepatoma were incubated with DSP as described in Materials and Methods and cross-linking was arrested with L-Lysine. Afterwards, aliquots containing 30  $\mu$ g of protein were loaded into SDS-PAGE with or without reduction by DTT. Figure 3(B) shows that in the SMP from normal liver, essentially no cross-linked products were obtained. However, in the SMP from hepatoma, three cross-linking products were clearly defined of about 43, 46, and 67 kDa, according to computer calculations carried out as described in Materials and Methods. The products of lower molecular weight above IF<sub>1</sub> correspond to  $\epsilon$ -IF<sub>1</sub> and IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> cross-linkages

Increased IF<sub>1</sub> Association and Cross-Linking With ATP Synthase in Rat Hepatoma



**Fig. 2.** Time course of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activation of liver and hepatoma SMP under conditions of IF<sub>1</sub> release. (A) Freshly prepared liver and hepatoma SMP were incubated at *t* = 0 in activation media as explained in Materials and Methods. At the times shown, 5 μL aliquots carrying 5 μg of protein were withdrawn for spectrophotometric measurement of ATPase activity. Basal activity at *t* = 0 was not modified by incubation of SMP in dilution media (see Materials and Methods) by 50 min. (B) Five micrograms of liver (LSMP) and hepatoma (HSMP) submitochondrial particles were loaded into SDS-PAGE and afterwards, Western blot was carried out as indicated in Materials and Methods with a mixture of anti-α and anti-IF<sub>1</sub> mAbs. Densitometry analyses showed the following band intensities in LSMP (IF<sub>1</sub> = 1724, α = 2440) and hepatoma (IF<sub>1</sub> = 2604, α = 2223) therefore, the IF<sub>1</sub>/α ratios were 0.8 and 1.2 for liver and hepatoma SMP, respectively.

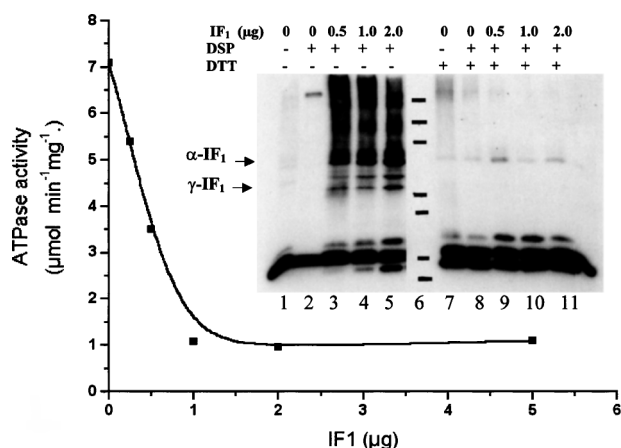
previously described (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002), whereas the products of about 43 and 67 kDa correspond to γ-IF<sub>1</sub> and α-IF<sub>1</sub> cross-linkages that we found in the bovine heart enzyme. The identity of these products was confirmed with α and γ immunoblots, respectively (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002). The product of about 46 kDa was not identified. The noncross-linked control of AS-30D SMP showed consistently about twice the intensity of the IF<sub>1</sub> monomer than in the normal liver SMP (Fig. 3(B), lanes 1 and 6). Formation of these cross-linked products was reversed by DTT reduction, except for the α-IF<sub>1</sub> product which, as in the bovine heart enzyme, was only partially reduced (Fig. 3(A)). Assuming that these



**Fig. 3.** IF<sub>1</sub> DSP cross-linking with ATP synthase subunits in bovine heart, rat liver, and rat hepatoma SMP. (A) Bovine heart SMP (1 mg/mL) were incubated by 30 min with the indicated amounts of DSP and cross-linking was arrested with 10 mM L-lysine. Afterwards, aliquots were withdrawn to load 20 μg of SMP protein in each lane of SDS-Page and anti-IF<sub>1</sub> Westernblot was carried out as described before. The previously identified α-IF<sub>1</sub> and γ-IF<sub>1</sub> products were observed besides a third 46 kDa product observed between them with 1 and 2 mg/mL of DSP. The presence of DTT reduced most of the γ-IF<sub>1</sub> and 46 kDa products as well as two smaller products that correspond to ε-IF<sub>1</sub> and IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> cross-linkages (see Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002). (B) The same cross-linking, SDS-PAGE and WB procedures were followed with Liver and hepatoma SMP with the exception that the initial SMP protein concentration was 1.8 mg/mL and 40 μg of SMP protein were loaded per lane. The same α-IF<sub>1</sub>, γ-IF<sub>1</sub>, and 46 kDa products observed in bovine heart SMP (A) were also obtained in liver and hepatoma SMP. DTT (20 mM) reduced most of these products.

products could be formed with very low yields in SMP from normal liver, further gels were overloaded and the same products showed as faint bands (not shown).

In order to discard the possibility that the IF<sub>1</sub> cross-linkages observed in AS-30D hepatoma SMP could result from nonspecific interactions, we carried out an *in vitro*



**Fig. 4.** Reconstitution of recombinant IF<sub>1</sub> into F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of rat liver SMP. The shown amounts of IF<sub>1</sub> were reconstituted into liver SMP as indicated in Materials and Methods and 10  $\mu$ l aliquots containing 4  $\mu$ g of protein were withdrawn for measurement of ATPase activity. Inset, the remaining of SMP samples were centrifuged once at 45,000 rpm in order to remove excess nonreconstituted IF<sub>1</sub> and the SMP pellets were dissolved directly in SDS-PAGE sample buffer to load 60  $\mu$ g of SMP. Where indicated, 20 mM DTT was added 10 min before gel loading. Anti-IF<sub>1</sub> Westernblot was carried out as described before.

reconstitution experiment as a model for the *in vivo* overexpression of IF<sub>1</sub> in cancer cells. Thus, recombinant rat liver IF<sub>1</sub> was reconstituted with SMP devoid of IF<sub>1</sub> before DSP cross-linking. Reconstitution produced about 90% inhibition of ATPase activity (Fig. 4) with an affinity similar to that previously reported by Lebowitz and Pedersen (1993) with recombinant rat liver IF<sub>1</sub>. Western blotting of these reconstituted samples showed exactly the same DTT-sensitive cross-linking products as in the endogenous IF<sub>1</sub> overexpressed in cancer cells (Fig. 4, inset). As an additional control, we measured the IC<sub>50</sub> of recombinant IF<sub>1</sub> for the rat liver and hepatoma F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex of SMP devoid of IF<sub>1</sub> by titration and reconstitution experiments in order to confirm that the enzyme from hepatoma retained a similar affinity for IF<sub>1</sub>. We found the same IC<sub>50</sub> of about 0.5  $\mu$ g of IF<sub>1</sub> (Fig. 4) in liver and hepatoma SMP (not shown). Taken together, these experiments demonstrate structurally that the overexpression of IF<sub>1</sub> in AS-30D cells leads to a higher amount of endogenous IF<sub>1</sub> associated with the rotor and stator of the ATP synthase.

As a further effort to confirm that the observed IF<sub>1</sub>-cross-linking products were formed within the intact F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex, the latter was immunoprecipitated as we described before for the bovine heart enzyme (Aggeler *et al.*, 2002; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2002). We obtained about half the yield of immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> from hepatoma than from liver SMP, consistent with the

lower amount of ATP synthase in the former system. DSP cross-linking decreased even further the yield of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex. However, after loading about 5  $\mu$ g of immunoprecipitated enzyme, the  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> cross-linkages were detected almost exclusively in the enzyme immunoprecipitated from hepatoma SMP (Fig. 5). These results confirm that IF<sub>1</sub> is associated with higher yield in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex of hepatoma than in that of normal rat liver mitochondria.

## DISCUSSION

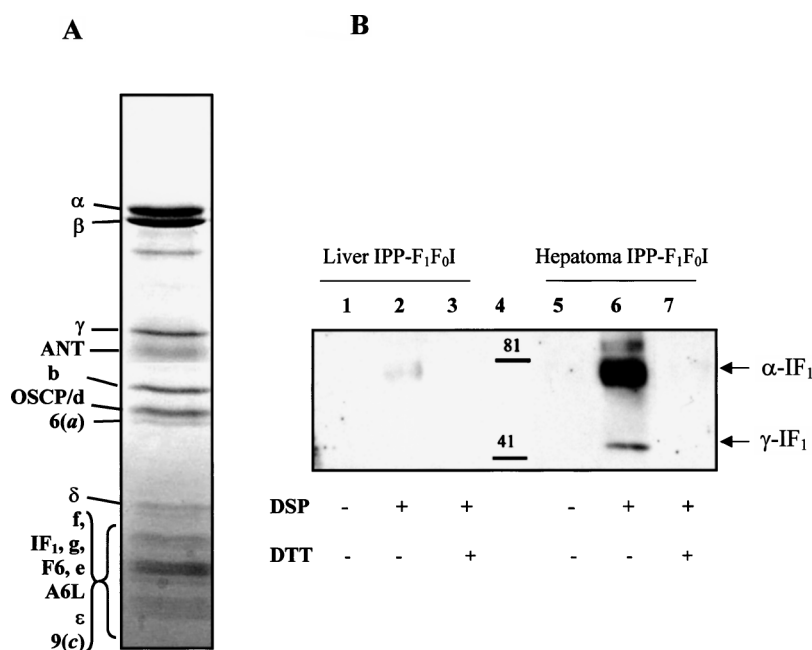
This work shows the first structural evidence demonstrating that overexpression of the inhibitor protein (IF<sub>1</sub>) in cancer cells produces a higher amount of association with the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase than is found in normal cells. We developed a new approach of DSP cross-linking useful to assay the degree of association of IF<sub>1</sub> with the native ATP synthase in SMP. Furthermore, Westernblot titration experiments allowed estimation of a 2-fold relative increase of IF<sub>1</sub> expression in mitochondria and SMP isolated from AS-30D cells relative to normal rat liver cells. Coimmunodetection of  $\alpha$  and IF<sub>1</sub> subunits demonstrated that this overexpression is not a parallel increase of the whole F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> subunits, but that IF<sub>1</sub> is over-expressed in relation to the ATP synthase. Furthermore, our functional (Fig. 2(A)), WB (Fig. 2(B)), and immunoprecipitation studies indicate a tendency of AS-30D cancer cells to subexpress the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase. These results are in concordance with previous reports where a lower amount of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase was observed in other cancer cells (Capuano *et al.*, 1996, 1997; Kuzela *et al.*, 1977). Previous careful estimations have shown that rat liver IF<sub>1</sub> is expressed with a stoichiometry of 0.4 IF<sub>1</sub> molecules per ATP synthase (Schwartzmann *et al.*, 1982). Therefore, our determinations of 2.0-fold increase of IF<sub>1</sub> expression indicate that this ratio in AS-30D cancerous cells could be increased to 0.8, or higher, recalling the apparent lower content of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> in comparison with normal cells. Thus, as predicted from previous functional studies (Chernyak *et al.*, 1994), IF<sub>1</sub> associates to F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> with better efficiency in cancerous cells than in normal cells.

In functional studies, the release of IF<sub>1</sub> demonstrated by ATPase activation was slower in AS-30D SMP than in the controls, indicating that the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex formed in AS-30D mitochondria contains a higher amount of endogenous IF<sub>1</sub> (Fig. 2). Since the IF<sub>1</sub> cross-linkages obtained in both systems were the same, it seems that only the yield of IF<sub>1</sub> cross-linking products was increased in AS-30D SMP. According to our IF<sub>1</sub> saturation curves, this



Increased IF<sub>1</sub> Association and Cross-Linking With ATP Synthase in Rat Hepatoma

263



**Fig. 5.** Cross-linking and immunoprecipitation of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex from liver and hepatoma SMP. (A) Rat liver F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex was immunoprecipitated from liver SMP and the purity and subunit composition was analyzed by SDS-PAGE. The identity of subunits was confirmed previously for the bovine heart enzyme (Aggeler *et al.*, 2002) and subunit composition was assumed the same for the rat liver enzyme. (B) Before and after DSP cross-linking, liver and hepatoma F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complexes were immunoprecipitated from the corresponding SMP. After determination of protein, 5  $\mu$ g of immunoprecipitated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complexes were loaded per lane. The gel was over-run to improve resolution of IF<sub>1</sub> products. The main IF<sub>1</sub> band ran off from the gel. The  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> and  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> products were detected in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex from hepatoma, but not in the enzyme immunoprecipitated from liver SMP. A faint band of  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> product was preserved in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex from liver SMP. No IF<sub>1</sub> product of 46 kDa was detected, however, the  $\alpha$ -IF<sub>1</sub> and  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> products were reduced by previous incubation with 10 mM DTT. The center empty lane contains molecular weight standards indicated as lines.

higher association of IF<sub>1</sub> with F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> in cancer cells is not the result of a shift in the affinity of the enzyme for IF<sub>1</sub>. However, these results do not rule out structural differences among the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complexes of normal and AS-30D mitochondria. For example, the lower yield of immunoprecipitation of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex in AS-30D cancer cells might indicate structural differences with the normal rat liver F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>I complex in addition to lower expression levels. We are in progress of site directed mutagenesis studies to identify the lysine residues of the rat liver IF<sub>1</sub> that form these cross-linking products by reconstitution of the recombinant IF<sub>1</sub> into rat liver SMP.

Taken together, these results provide structural and kinetic support to the previous proposals suggesting that cancer cells are protected more efficiently to prevent energy dissipation through the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activity since IF<sub>1</sub> is overexpressed and binds with higher efficiency to the enzyme.

## ACKNOWLEDGMENTS

The critical review of this work is acknowledged to Professor Marietta Tuena de Gómez-Puyou from the National University of México. This work was supported by the grant number J34744-N from CONACyT, México. The AS-30D hepatoma cell line was kindly provided by Prof. Rafael Moreno-Sánchez of the Department of Biochemistry of the "Instituto Nacional de Cardiología de México." Plasmid pMalIF<sub>1</sub> was a generous gift of Prof. Roderick A. Capaldi, University of Oregon.

## REFERENCES

- Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S. W., Gosh, S. S., García, J. J., Capaldi, R. A., and Marusich, M. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 33906–33912.  
 Ala-Rämi, A., Ylitalo, K. V., y Hassinen, I. E. (2003). *Basic Res Cardiol.* **98**, 250–258.

- Capuano, F., Guerrieri, F., and Papa, S. (1997). *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 379–384.
- Capuano, F., Varone, D., D'Eri, N., Russo, E., Tommasi, S., Montemurro, S., Prete, F., and Papa, S. (1996). *Biochem. Mol. Biol.* **38**, 1013–1022.
- Chang, J. P., Gibley, C. W., Jr., and Ichinoe, K. (1967). *Cancer Res.* **27**, 2065–2071.
- Chernyak, B. V., Dedov, V. N., and Gabai, V. L. (1994). *FEBS Lett.* **337**, 56–59.
- Chernyak, B. V., Dukhovich, V.F., and Khodjaev, E. Y. (1991). *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 604–609.
- García, J. J., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1995). *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 127–136.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Ernster, L. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **547**, 252–257.
- Harris, D. A., Von Tschärner, V., and Radda, G. K. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 72–84.
- Inouye, S., and Inouye, M. (1985). *Nucleic Acids Res.* **9**, 3101–3110.
- Klein, G., Satre, M., Zaccari, G., and Vignais, P. V. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* **681**, 226–232.
- Ko, H. Y., Delannoy, M., Hüllihen, J., Chiu, W., and Pedersen, P. L. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 12305–12309.
- Kuzela, S., Kolarov, J., Krempasky, V., Hatalova, I., Lakota, J., and Ujhazy, V. (1977). *Neoplasma* **24**, 559–562.
- Lebowitz, M. S., and Pedersen, P. L. (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 64–70.
- Lowry, O. H., Rosegrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Luciakova, K., and Kuzela, S. (1984). *FEBS Lett.* **177**, 85–88.
- Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and García J. J. (2002). *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 433–443.
- Moreadith, R., and Fiskum, G. (1984). *Anal. Biochem.* **137**, 360–367.
- Moreno-Sánchez, R. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 4028–4034.
- Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769.
- Rouslin, W. (1991). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 873–888.
- Rouslin, W., and Broge, C. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 23638–23641.
- Schwerzmann, K., Hüllihen, J., and Pedersen, P. L. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 9555–9560.
- Schwerzmann, K., and Pedersen, P. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 1–18.
- Smith, D. F., Walborg, E. F., Jr., and Chang, J. P. (1970). *Cancer Res.* **30**, 2306–2309.
- Zheng, C. F., Wang, T. T., and Weiner, H. (1993). *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 828–831.