



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL DEL DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP
SINTASA MITOCONDRIAL DE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

QFB. SERGIO JAVIER COUOH CARDEL

TUTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Con mi más profundo amor,
respeto y admiración;
a la gran mujer,
mi aliada en toda batalla,
Sra. Gloria Cardel Baizabal.*

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. José de Jesús García Trejo de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por sus enseñanzas durante mi formación académica.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la amistad y apoyo brindado durante el tiempo que permanecí en sus instalaciones y a todo su grupo de trabajo: Daniela Araiza, Manuel Gutiérrez, Gisela Ruiz, Ramón Méndez y Sergio Guerrero, quienes contribuyeron a mi desarrollo profesional.

Al Dr. Stephan Wilkens del Departamento de Bioquímica de la SUNY Upstate Medical University, por haberme enseñado y aconsejado en el manejo del microscopio electrónico y de los programas de análisis de imágenes, y especialmente por todo su tiempo y palabras como amigo.

A los miembros del laboratorio del Dr. Wilkens de la SUNY Upstate Medical University: Brandy Verhalen, Erick Kish-Trier, Elena Milgrom, Lee Pearson, Norton Kitagawa y Rebbeca Oot, por todo su apoyo, paciencia y amistad.

A mis amigos incondicionales, quienes me han hecho crecer en todos los ámbitos y cuyo apoyo es inagotable aún en mis momentos de flaqueza: Ady Couoh, Alejandra R. Curiel, Alfredo Cabrera, Álvaro Martínez, Armando Couoh, Carmen G. Hernández, Edgar Morales, Joana Sanluis, Mariel Zarco, Miriam J. Couoh, Paulina Cortés y Viridiana Olin.

A TODOS USTEDES, MIL GRACIAS.

ÍNDICE.

Resumen	6
Introducción	7
1. La mitocondria	7
2. La cadena de transporte de electrones	9
3. La F ₁ F ₀ -ATP sintasa	10
3.1. Composición general	10
3.2. Mecanismo catalítico rotacional	13
3.3. Estructura cristalográfica (F ₁ -c ₁₀ + OSCP ¹⁻¹²⁰ -d ³⁻¹²³ -F6 ⁵⁻⁷⁰ -b ⁷⁹⁻¹⁸³)	15
3.4. Estudio del sector F ₀ no cristalizado	17
3.5. Observación del monómero de la enzima bajo microscopía electrónica	20
4. Supercomplejos respiratorios	21
4.1. Supercomplejos de la cadena de transporte de electrones	22
4.2. Dímeros y oligómeros de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa	22
4.2.1. Subunidades dimerizantes y oligomerizantes	22
4.2.1.1. Fenotipo de mutantes con ablación de subunidades dimerizantes u oligomerizantes	25
4.2.2. Otras proteínas con probable implicación en la dimerización	25
4.2.3. Observación del dímero de la enzima bajo microscopía electrónica.....	26
4.2.3.1. Dímeros <i>in situ</i>	26
4.2.3.2. Dímeros aislados	29
Objetivos	32
Hipótesis	33
Resultados	34
Discusión	46
Conclusiones	63
Materiales y Métodos	64
Referencias	68

ABREVIATURAS.

AAN	Acarreador de adenin nucleotidos.
BN-PAGE	Corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida nativos azules.
CMC	Concentración micelar crítica.
CMR	Clasificación por multireferencia.
CN-PAGE	Corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida nativos claros.
2D-SDS-PAGE	Corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida en segunda dimensión desnaturalizante.
DTM	Dominio transmembranal.
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.
Fx	Fracción.
IEM	Inmuno electromicroscopía.
ME	Microscopía electrónica.
MEM	Membrana externa mitocondrial.
MFA	Microscopía de fuerza atómica.
MIC	Membrana interna de cresta.
MIL	Membrana interna limítrofe.
MIM	Membrana interna mitocondrial.
PSM	Partícula submitocondrial.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RT	Reconstrucción tomográfica.
Su	Subunidad.
YPD	Medio de cultivo: extracto de levadura, peptona y glucosa.
YPLac	Medio de cultivo: extracto de levadura, peptona y ácido láctico.

RESUMEN.

La F_1F_0 -ATP sintasa es una enzima ubicua que se encuentra virtualmente en todos los organismos vivos; mediante un mecanismo rotacional, que emplea la energía proveniente del gradiente electroquímico generado por las cadenas respiratorias o fotosintéticas, cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Existe evidencia de que la enzima es capaz de formar dímeros y oligómeros esenciales para la morfología, estructura y función mitocondrial.

En este trabajo, detectamos y aislamos el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el uso de geles nativos azules y gradientes de glicerol. El alto grado de purificación, aunado a una excelente tinción con acetato de uranilo, permitió la captura de una serie de imágenes bidimensionales en diferentes orientaciones espaciales obtenidas bajo microscopía electrónica (ME) donde se revela, por primera vez, la vista de los sectores catalíticos (F_1 's) desde los canales de protones (F_0 's); mostrando de forma contundente la disposición de los dos anillos de 10 subunidades 9 (Su.9) y los conglomerados de los dominios transmembranales de las otras subunidades que conforman los segundos dominios de los sectores F_0 's asociados a los cuellos periféricos. Éstos últimos se resolvieron para cada monómero en la interfase dimerizante de la estructura analizando las imágenes envista lateral.

Las vistas inferiores de los dímeros de la enzima permiten describir cambios en los sectores F_0 's relacionados con la variación de la apertura de las F_1 's en la vista lateral, siendo las formas cerradas las predominantes en el muestreo, por lo cual proponemos la dinámica del cuello periférico y del segundo dominio del sector F_0 como un sólo ensamblaje.

Finalmente, se desarrolló el primer modelo 3D del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en ángulo de 40° , diseñado a partir de la proyección de los datos generados por ME. El modelo 3D muestra dos ejes axiales de simetría y una nueva interacción de los cuellos periféricos con sus correspondientes $\alpha_3\beta_3$.

INTRODUCCIÓN.

1. LA MITOCONDRIA.

La mitocondria es un organelo celular, propio de eucariontes, en el que ocurre una gran variedad de eventos que incluyen: la síntesis de ATP, el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, participa también en procesos como la apoptosis, la homeostasis de calcio y la señalización por las especies reactivas de oxígeno. Las dimensiones de la organela oscilan entre 1 – 2 μm de largo por 0.1 – 0.5 μm de ancho, encontrándose constituida por dos membranas cuya composición proteica y lipídica varía enormemente: la membrana externa mitocondrial (MEM) y la membrana interna mitocondrial (MIM). Ésta última, presenta invaginaciones que se denominan crestas mitocondriales. Desde los primeros análisis de microscopía electrónica (ME) se ha considerado que las crestas son pliegues simples de la MIM como se muestra en los esquemas clásicos de los libros de texto [Figura 1]. Sin embargo, con el desarrollo de la tomografía electrónica se ha demostrado la complejidad y dinámica de la MIM misma que adopta formas tubulares y/o laminares en estado fisiológico.

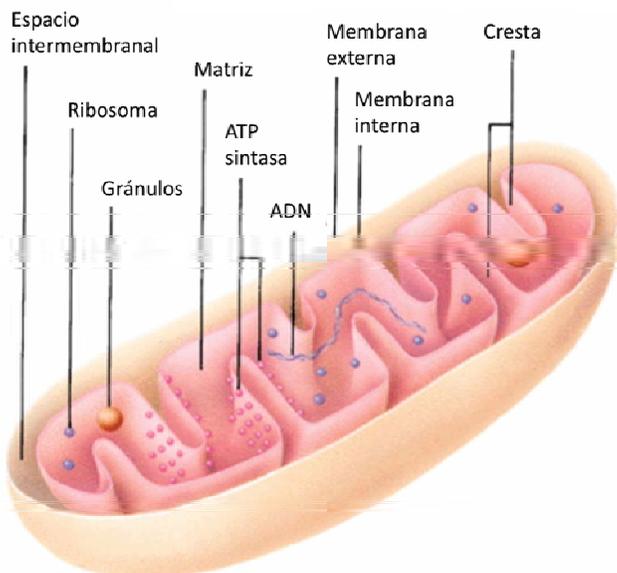


Figura 1. Esquema clásico de una mitocondria. El organelo se encuentra constituido por dos membranas: la externa (MEM) y la interna (MIM), ésta última forma invaginaciones a través de toda la estructura y son denominadas crestas mitocondriales. El volumen delimitado por la MIM es el espacio matricial, mientras que el localizado entre la MIM y la MEM corresponde a el espacio intermembranal. (Frey y Mannella, 2000).

El nuevo modelo dinámico de este organelo (pleomórfico), sugiere que la MIM se subcompartimentaliza en la membrana interna limítrofe (MIL) y la membrana interna de crestas (MIC), las cuales se conectan entre sí a través de las denominadas uniones de crestas. Los espacios divididos por todas las membranas, establecen el espacio intermembranal y matricial, y el recientemente definido, espacio intracresta cuya composición depende de la difusión de metabolitos al formarse la unión de cresta (Mannella, 2000; Mannella y cols, 2001; Frey y cols, 2002).

Los cambios morfológicos internos son reflejo del nivel energético de la mitocondria, existiendo dos estados: (1) el ortodoxo (alta concentración de ATP), donde el número de crestas es bajo y la interacción con la MIL es mínima, y (2) el condensado (baja concentración de ATP), en el que hay un incremento súbito del número de crestas al igual que de las uniones de crestas, provocando la contracción de la matriz mitocondrial [Figura 2]. La biogénesis y/o el mantenimiento de las crestas depende de procesos de fusión y fisión, así como de cambios en la composición proteica y lipídica de la MIM (Mannella, 2006).

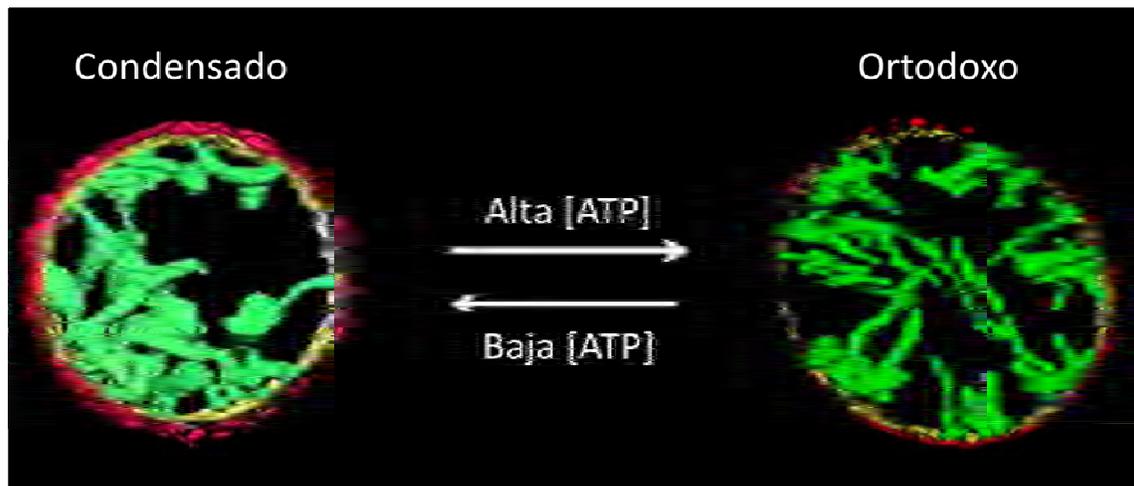


Figura 2. La mitocondria es un organelo dinámico. El estado energético de la mitocondria se define por las concentraciones de ATP y ADP que conllevan a cambios morfológicos internos. Cuando los niveles de ATP descienden y los de ADP aumentan; la cantidad de crestas, así como las uniones de crestas, se incrementan de forma súbita, mientras que la matriz se contrae mejorando la eficiencia de la síntesis de ATP (Mannella, 2006).

2. LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.

La cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria se encuentra localizada en la MIM y está formada por cuatro complejos respiratorios multiproteicos (I, II, III y IV).

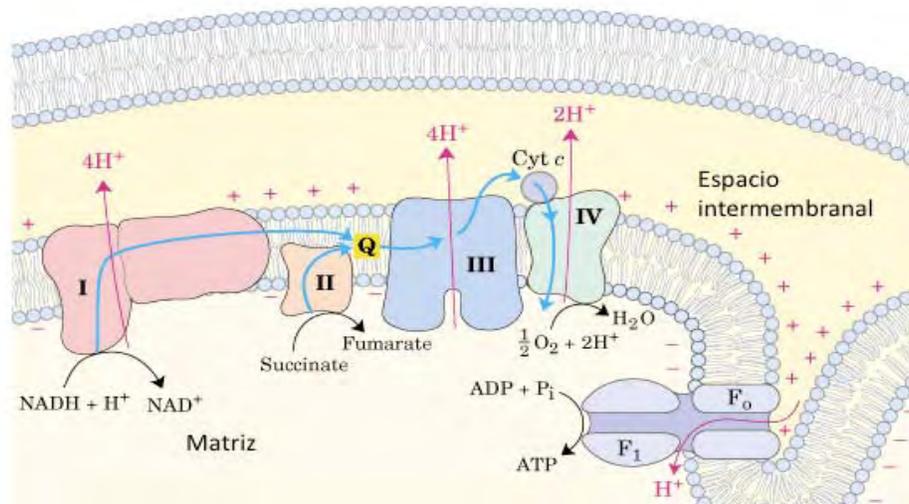


Figura 3. La cadena de transporte de electrones genera un gradiente electroquímico, el cual es utilizado por la F₁F₀-ATP sintasa para catalizar la formación de ATP a partir de ADP y P_i. La reducción del NADH ocurre a nivel del Complejo I mientras que la del succinato, en el Complejo II. Cuando los electrones pasan por Complejos I, III y IV provocan la translocación de protones de la matriz mitocondrial al espacio intracresta, éstos son utilizados por la F₁F₀-ATP sintasa para formar ATP, un proceso que conlleva el regreso de los protones del espacio intracresta hacia la matriz mitocondrial (Lehninger, 2006).

Los electrones derivados de la oxidación de la glucosa o de los ácidos grasos son transferidos del NADH al Complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y de ahí a la ubiquinona; y desde el succinato hacia el FADH₂ del Complejo II (FADH₂:ubiquinona oxidoreductasa) y de éste a la ubiquinona. De la ubiquinona, los electrones pasan al Complejo III (ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa), subsecuentemente al citocromo c que difunde en el espacio intracresta para llegar al Complejo IV (citocromo c oxidasa) y terminar en el aceptor final, el oxígeno molecular. Cuando los electrones pasan por los complejos I, III y IV provocan la translocación de protones de la matriz mitocondrial al espacio intracresta. Lo anterior genera un gradiente electroquímico, el cual es utilizado por la F₁F₀-ATP sintasa (Complejo V) para

catalizar la formación de ATP: proceso que se denomina fosforilación oxidativa [Figura 3].

La teoría quimiosmótica de Peter Mitchell propuso y demostró que la energía proveniente del gradiente electroquímico de protones impulsa a la síntesis de ATP de manera compatible con modelos de acoplamiento termodinámicos cercanos al 100% en mitocondrias, cloroplastos y membranas plasmáticas bacterianas, es decir, el mecanismo quimiosmótico es ubicuo y eficiente, y considera que la disipación de energía a través de las membranas es despreciable, siempre y cuando la permeabilidad membranaral intrínseca a los protones sea mínima (Mitchell, 1961).

Las crestas mitocondriales son compartimentos submitocondriales especializados en la síntesis de ATP debido a que el mayor porcentaje de los complejos respiratorios reside en éstas estructuras, de acuerdo a resultados de inmuno-electromicroscopía (IEM) (Gilkerson y cols, 2003; Vogel y cols, 2006).

3. LA F_1F_0 -ATP SINTASA

La F_1F_0 -ATP sintasa es una enzima ubicua que se encuentra virtualmente en todos los organismos vivos; cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i mediante un mecanismo rotacional, que emplea el gradiente electroquímico generado por las cadenas respiratorias o fotosintéticas derivado de la oxidación de nutrientes o de la luz, siendo la responsable de la formación de aproximadamente el 95% del ATP generado en la célula.

3.1. COMPOSICIÓN GENERAL.

Funcionalmente, la F_1F_0 -ATP sintasa está conformada por dos sectores: una parte hidrofílica (F_1 -ATPasa) la cual contiene a los sitios catalíticos, que se proyecta hacia el lumen de los tilacoides en cloroplastos, al citosol en bacterias y

a la matriz mitocondrial en eucariontes; y una parte hidrofóbica (F_0) responsable de la translocación de protones, que se encuentra embebida en todas las membranas transductoras de energía mencionadas.

Estructuralmente, se puede detallar la presencia de dos cuellos: uno central y otro periférico (Wilkins y Capaldi, 1998; Wilkins, 2000).

La F_1F_0 -ATP sintasa de procariontes es la menos compleja, conteniendo 8 subunidades (Su's) con diferente estequiometría: α_3 , β_3 , γ_1 y ϵ_1 pertenecientes al sector F_1 ; y δ_1 , b_2 , a_1 y c_{9-15} presentes en el sector F_0 . La enzima en eucariontes tiene componentes homólogos y otras proteínas adicionales que están involucradas en su estructura y regulación; la de bovino está conformada por 16 subunidades mientras que la de levadura por 21 [Tabla 1].

		<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. taurus</i>
Sector	F_1	α	α	α
		β	β	β
		γ	γ	γ
		ϵ	δ	δ
		-	ϵ	ϵ
	F_0	δ	OSCP	OSCP
		Su a	Su 6	Su 6
		Su c	Su 9	Su 9
		-	Su 8	A6L
		Su b	Su b (4)	Su b
		-	Su d	Su d
		-	Su f	Su f
		-	Su h	F6
		-	Su i / j	-
Prot. accesorias	Estructurales	-	Su g	Su g
		-	Su k	-
		-	Su e	Su e
	Inhibidoras	-	Inh1	IF ₁
		-	Stf1	-
		-	Stf2	-
		-	Sfl2	-

Tabla 1. Subunidades que constituyen a la F_1F_0 -ATP sintasa de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *B. taurus*. La F_1F_0 -ATP sintasa de bacteria se conforma por 8 subunidades, mientras que la de bovino y de levadura se constituyen por 16 y 21, respectivamente. El símbolo negativo indica que la contraparte entre las especies no existe o no se ha descrito.

La nomenclatura de los homólogos entre procariontes y eucariontes difiere, por ejemplo, ϵ y δ en bacterias corresponden a δ y OSCP en eucariontes, respectivamente, mientras que ϵ de eucariontes no tiene contraparte en bacterias. Una variación similar se observa entre eucariontes; la Su.8 y Su.h en *Saccharomyces cerevisiae* corresponden a A6L y F6 en *Bos taurus*, respectivamente. Además, existen subunidades que no tienen contraparte descrita entre eucariontes inferiores y superiores; Su.k y Su.i (Devenish y cols, 2000; Velours y Arselin, 2000).

Subunidad	Gen	a.a.	Masa molecular (KDa)
α	ATP1	510	54.9
β	ATP2	478	51.3
γ	ATP3	278	30.6
δ	ATP16	138	14.6
ϵ	ATP15	61	6.6
6	ATP6 ^M	249	27.9
8	ATP8 ^M	48	5.9
9	ATP9 ^M	76	7.8
b	ATP4	209	23.3
d	ATP7	173	19.7
e	ATP21 (TIM11)	95	10.7
f	ATP17	95	10.6
g	ATP20	115	12.9
h	ATP14	92	10.4
i / j	ATP18	59	6.7
k	ATP19	68	7.5
OSCP	ATP5	195	20.9
Inh1	INH1	63	7.4
Stf1	STF1	63	7.3
Stf2	STF2	83	9.5
Sfl2	YLR327c	84	-

Tabla 2. Subunidades que conforma a la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*. La enzima de levadura contiene 21 subunidades diferentes que son mitocondrial (superíndice M) o nuclearmente codificadas (Devenish y cols, 2000; Velours y cols, 2000).

Cuando la célula es privada de oxígeno y el gradiente electroquímico se colapsa, la enzima tiende a cambiar termodinámicamente de su actividad de síntesis de ATP a la de hidrólisis, por lo que también es denominada F_1F_0 -ATPasa. En eucariontes existe una proteína que evita la hidrólisis de ATP; la

proteína inhibidora (IF₁) en bovino o Inh1 en levadura. Así mismo, se han descrito factores en *S. cerevisiae* que inhiben a la enzima (Stf1) o ayudan a la estabilización del subcomplejo de inhibición (Stf2 y Sfl2) (Hashimoto y cols, 1990a; Hashimoto y cols, 1990b).

En este trabajo nos centraremos al estudio de la F₁F₀-ATP sintasa de la levadura *S. cerevisiae*. De todas las subunidades que la conforman, tres de ellas (Su.6, Su.8 y Su.9) son codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las restantes por el nuclear; al igual que sus contrapartes en mamíferos. En la **Tabla 2**, se presenta la masa molecular y los genes que codifican cada una de las distintas subunidades de la enzima.

3.2. MECANISMO CATALÍTICO ROTACIONAL.

La F₁F₀-ATP sintasa, puede ser descrita como un motor nanomolecular conformado de dos partes: (1) el rotor que se compone por Su.9, γ , δ y ϵ ; y (2) el estator formado por α , β , Su.6, Su.8, Su.f, Su.i, Su.b, Su.d, Su.h y OSCP. La parte catalítica de la enzima se encuentra contenida en la subunidad β y ésta se asocia con α intercaladamente en un heterohexámero $\alpha_3\beta_3$ [Figura 4A].

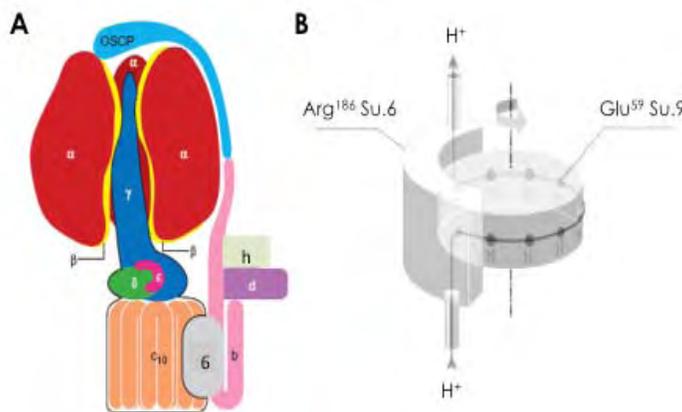


Figura 4. La F₁F₀-ATP sintasa es un motor nanomolecular que se compone de un rotor y un estator. En la enzima de *S. cerevisiae*: (A) El cuello central (γ , δ y ϵ) y el anillo de Su.9 forman el rotor, mientras que el cuello periférico (Su.b, Su.d, Su.h y OSCP) fija a $\alpha_3\beta_3$ con la Su.6 manteniéndose estáticos durante la síntesis de ATP. (B) La translocación de protones ocurre por la formación y ruptura secuencial e intermitente de un puente salino entre la Arg¹⁸⁶ de la Su.6 y la Glu⁵⁹ de la Su.9 (Stock y cols, 2000).

Se ha planteado que la primera interacción de los protones presentes en el espacio intracresta (translocados por paso de los electrones a través de los complejos respiratorios I, III y IV) con la F_1F_0 -ATP sintasa ocurre a través de un hemicanal de entrada, que se forma en la interfase de la Su.6 con una Su.9. Un protón entra e interacciona con el Glu⁵⁹ de la Su.9 (Asp⁶¹ en Su.c de *E. coli*) lo que provoca el movimiento del anillo en una posición en dirección opuesta al giro de las manecillas del reloj (visto desde F_1 hacia F_0), de tal forma que otra Su.9 desprotonada se mantiene en contacto con la Su.6 hasta que otro protón interacciona con ella para desplazarse nuevamente. La traslación del anillo de Su.9 provoca a su vez el movimiento del cuello central (γ , δ y ϵ); es el giro de γ dentro de $\alpha_3\beta_3$ quien ocasiona los cambios conformacionales y de afinidad de los reactivos y productos para catalizar la síntesis del ATP en las interfases α/β catalíticas.

El heterohexámero $\alpha_3\beta_3$ se une al cuello periférico formado por las subunidades b, d, h y OSCP. A su vez, la parte membranal de la Su.b del cuello periférico está en contacto con la Su.6 para contrarrestar la inercia rotacional de γ .

Cuando el primer protón unido a la Su.9 completa los 360° de movimiento dentro del anillo, se encuentra con la Arg¹⁸⁶ de la Su.6 (Arg²¹⁰ en la Su.a de *E. coli*) la cual repele la interacción inicial provocando la expulsión del protón por el hemicanal de salida [**Figura 4B**]. De ésta manera el proceso de translocación del protón, del espacio intracresta hacia la matriz mitocondrial, y la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i se completa (Sambongi y cols, 1999).

El número de Su.c (10 en levaduras y mamíferos, 14 en cloroplastos y 9 - 15 en bacterias) tiene profundas implicaciones: cada evento de síntesis de ATP requiere que γ gire 120°, por lo que el cociente H^+/ATP es de 3 a 4. La diferencia de un protón es debido tanto a la variación estequiométrica de subunidades c encontradas entre especies como a la existencia de un posible grado de elasticidad en γ (Stock y cols, 2000).

Se ha descrito que la IF_1 es un inhibidor bidireccional de la F_1F_0 -ATP sintasa, ya que inhibe las actividades de hidrólisis y de síntesis de ATP. Las partículas submitocondriales (PSM's) de bovino que contienen a la IF_1 muestran un retardo que precede la fosforilación del ADP al re-establecerse el potencial electroquímico de protones, éste es quien promueve el reacomodo de la IF_1 en la enzima para permitir la síntesis de ATP (Gómez-Puyou y cols, 1979).

Un papel similar lo lleva a cabo ϵ de bacteria, sin embargo, en este caso ϵ funciona como un inhibidor unidireccional pues en su conformación extendida interacciona con la subunidad γ permitiendo la síntesis de ATP pero al mismo tiempo bloquea la hidrólisis del nucleótido. En su conformación compacta, ϵ ya no interactúa con la parte superior de la γ rotatoria posibilitando ambas actividades catalíticas (Feniouk y cols, 2006).

3.3. ESTRUCTURA CRISTALOGRAFICA (F_1 - c_{10} + OSCP¹⁻¹²⁰- d ³⁻¹²³- F_6 ⁵⁻⁷⁰- b ⁷⁹⁻¹⁸³).

En 1999, el grupo del Dr. John E. Walker presentó la estructura del cristal de F_1 - c_{10} de *S. cerevisiae* determinada por difracción de rayos X con una resolución de 3.9 Å conteniendo $\alpha_3\beta_3$, γ , δ y 10 copias de la Su.9 (Stock y cols, 1999).

Las subunidades α y β están arregladas alternativamente, para formar al heterohexámero $\alpha_3\beta_3$, alrededor de las 2 α -hélices entrelazadas antiparalelas de γ . La parte globular de γ interactúa con el anillo de Su.9 y δ está asociada a dicha sección de γ . La subunidad δ tiene dos dominios: un N-terminal de 10 hojas β -plegadas y un C-terminal de 2 α -hélices en forma de horquilla.

Las densidades electrónicas de las Su.9 individuales muestran que consisten de 2 α -hélices unidas por un asa hidrofílica dirigida hacia F_1 , éstas subunidades están empaquetadas fuertemente una contra la otra formando en el homo-oligómero dos anillos concéntricos de una sola α -hélice. El anillo interior de las Su.9 (cuya área se piensa debe estar ocupada por fosfolípidos) lo

componen las regiones N-terminales, mientras que los C-terminales conforman al anillo exterior. La longitud de la α -hélice del anillo interno y externo son 58 Å y 47 Å, respectivamente. Las regiones correspondientes del asa polar de cinco Su.9 (Su.9-1 a Su.9-5) están cubiertas por δ , mientras que γ interactúa con dos Su.9 (Su.9-9 y Su.9-10) y con una que está en contacto con δ (Su.9-1). Por lo que, dos tercios de la superficie superior del anillo están en contacto con la base del cuello central, involucrando probablemente puentes de hidrógeno [Figura 5]. El cristal de la F_1F_0 -ATP sintasa presenta una altura de 18.1 nm y el anillo de Su.9 tiene un diámetro externo de 5.5 nm (Stock y cols, 1999).

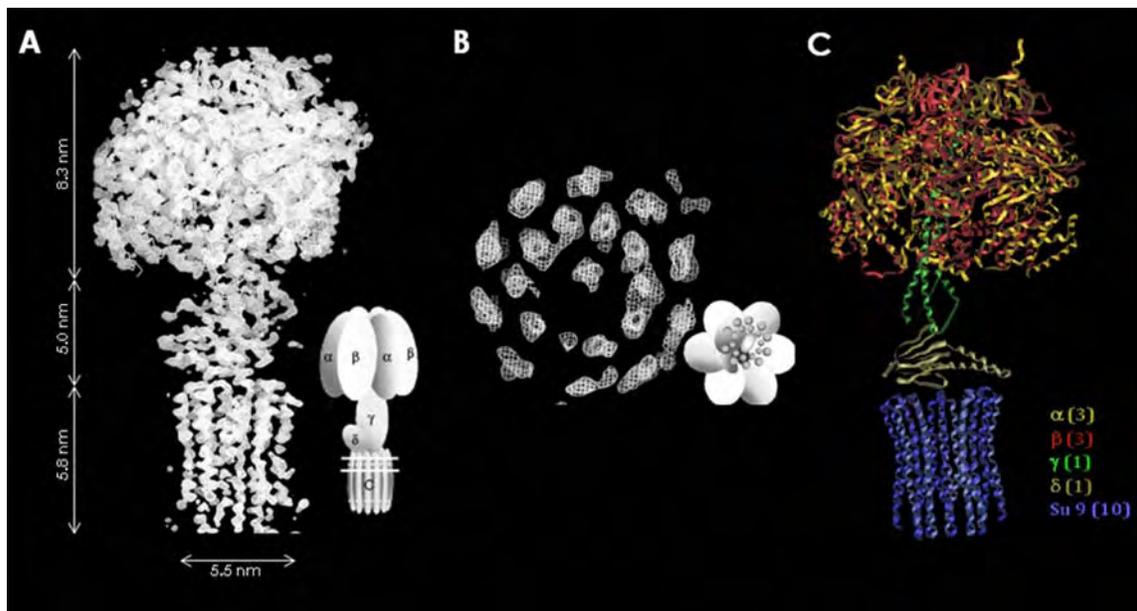


Figura 5. Estructura cristalográfica de la F_1 - c_{10} de *S. cerevisiae*. (A) El mapa de densidad electrónica obtenido por difracción de rayos X con resolución de 3.9 Å tiene una altura total de 18.1 nm, de los cuales 8.3 nm corresponden al heterohexámero $\alpha_3\beta_3$, 5.0 nm al cuello central y 5.8 nm al anillo de Su.9. (B) La vista inferior permite observar la disposición de las dos α -hélices de las 10 copias de la Su.9 que constituyen al anillo con un diámetro exterior de 5.5 nm. (C) El cristal de la F_1 - c_{10} de *S. cerevisiae* permitió definir que δ está unida a γ y éstas a su vez interactúan con dos tercios de la superficie del anillo de Su.9 para formar el rotor de la enzima e insertarse en $\alpha_3\beta_3$ (Stock y cols, 1999).

El mismo grupo, mediante la sobre-expresión de los segmentos de la Su.d³⁻¹²³, F6⁵⁻⁷⁰ y la Su.b⁷⁹⁻¹⁸³ (homóloga a la Su.h de levadura) de *B. taurus*, resolvió la estructura proveniente del cristal con un límite de resolución de 2.8 Å del subcomplejo formado por éstas subunidades del cuello periférico en estequiometría 1:1:1 [Figura 6]. La Su.d³⁻¹²³ está conformada por 5 α -hélices en

forma de clip y F6⁵⁻⁷⁰ es una proteína de 2 α -hélices de forma casi lineal: éstas dos subunidades se asocian al segmento de la Su.b⁷⁹⁻¹⁸³, una α -hélice curva que se extiende 160 Å en dirección al sector F₀ (Kane y cols, 2006).

Éstos resultados fueron conjugados a la estructura tridimensional, determinada por resonancia magnética nuclear (RMN), del segmento de OSCP¹⁻¹²⁰ de bovino consistente en una serie de 6 α -hélices; las predicciones indican que el N-terminal de OSCP interacciona, en la parte más alta de la enzima, con el N-terminal de α mientras que su C-terminal, con el C-terminal de la Su.b quien se extiende hasta F₀ para atravesar en dos ocasiones a la MIC y exponer su N-terminal al espacio matricial. Un dominio transmembranal (DTM) de la Su.b estaría en contacto con la Su.6 evitando el movimiento de $\alpha_3\beta_3$ y la Su.6 durante el movimiento del rotor (Walker y Kane, 2006).

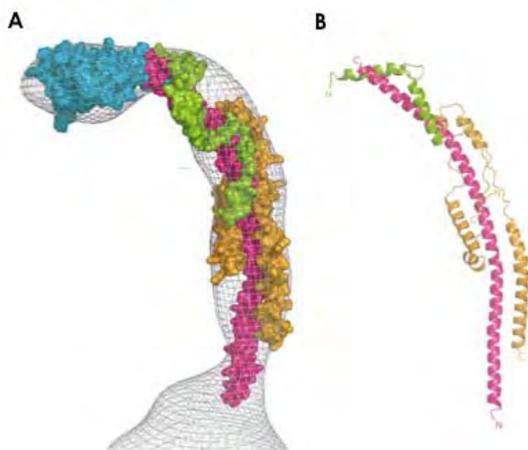


Figura 6. Estructura cristalográfica parcial del cuello periférico de *B. taurus*. (A) OSCP¹⁻¹²⁰ se localiza en la parte más alta del heterohexámero $\alpha_3\beta_3$. El N-terminal de OSCP se une al N-terminal de α mientras que su C-terminal, con el C-terminal de la Su.b. El cristal del subcomplejo de d³⁻¹²³-F6⁵⁻⁷⁰ - b⁷⁹⁻¹⁸³ con resolución de 2.8 Å, revela que la Su.d³⁻¹²³ y F6⁵⁻⁷⁰ se asocian a la Su.b⁷⁹⁻¹⁸³ para elongarse en dirección al sector F₀. (B) La Su. b⁷⁹⁻¹⁸³ (rosa) es una α -hélice curva de 160 Å. La Su.d³⁻¹²³ (anaranjado) está conformada por 5 α -hélices en forma de clip; y F6⁵⁻⁷⁰ (verde) es una estructura abierta de 2 α -hélices (Kane y cols, 2006).

3.4. ESTUDIO DEL SECTOR F₀ NO CRISTALIZADO.

El sector F₀ de la enzima de levadura está conformado por 3 subunidades hidrofóbicas importantes que se codifican mitocondrialmente (Su.6, Su.8 y Su.9) y otras, nuclearmente (Su.b, Su.f, Su.i, Su.e, Su.g y Su.k).

La porción del sector F₀ unido al anillo de Su.9 de la F₁F₀-ATP sintasa (**segundo dominio del sector F₀**[Su.6, Su.8, DTM's de la Su.b, Su.f, Su.i, Su.e y Su.g]), no ha sido cristalizada.

Subunidad 6. Es homóloga a la Su.a en *E. coli*. La conforman 249 a.a. [Tabla 2] que se predice contener 5 DTM's cuyo N-terminal se encuentra dirigido al espacio intracresta mientras que el C-terminal, hacia el matricial. La Su.6 interacciona con el anillo de Su.9 para formar los hemicanales de entrada y salida; en la posición 186 contiene a la Arg que está involucrada en la translocación de protones [Figura 4B]. Para estabilizarse dentro de la enzima la Su.b (Duvenzin-Caubet y cols, 2006), Su.i (Arnold y cols., 1999), Su.d, Su.8, Su.f y Su.h (Velours y Arselin, 2000) deben estar correctamente ensambladas.

Subunidad 8. Su homóloga en bovino es A6L. Está formada por 48 a.a. y atraviesa a la MIC en una sola ocasión (1 DTM) dirigiendo su N-terminal hacia el espacio intracresta y el C-terminal, al matricial. Dicha subunidad no está involucrada en la función de los hemicanales, sin embargo, se requiere para el correcto ensamblaje de la Su.6. Así mismo, su correcta unión a la enzima depende de la presencia de la Su.f (Velours y Arselin, 2000).

Subunidad b. Está formada por 209 a.a., posee 2 DTM's y un asa hidrofílica corta (residuos 46-56) dirigiendo su N- y C-terminal al espacio matricial, siendo este último quien está en contacto con OSCP localizado en la parte más alta de F_1 [Figuras 4A y 6] (Velours y Arselin, 2000). Su ensamblaje permite la unión de Su.6 (Duvenzin-Caubet y cols, 2006).

Subunidad f. Está conformada por 95 a.a. y posee 1 DTM dirigiendo su N-terminal al espacio matricial mientras que el C-terminal, al intracresta. Su presencia es necesaria para el correcto ensamblaje de la Su.6 y Su.8 (Velours y Arselin, 2000). Además, la presencia de la Su.f depende de la expresión de Su.e (Arnold y cols, 1998).

Subunidad i. Ésta subunidad ha sido nombrada como Su.i (por el grupo del Dr. Jean Velours) y Su.j (por el grupo de la Dra. Rosemary Stuart) aunque se

trata de la misma entidad. Es una proteína de 59 a.a. con 1 DTM; exponiendo su N-terminal en espacio matricial y su C-terminal, al intracresta. Su presencia se requiere para el ensamblaje de Su.6 y Su.f (Arnold y cols, 1999).

Estudios de entrecruzamientos han determinado la proximidad del cuarto dominio transmembranal de la Su.6 (Su.6-DTM4) con el Su.9-DTM2; la Su.i con la Su.f; el Su.6-DTM1 con la Su.f; y el Su.6-DTM1 con el Su.6-DTM2, el Su.b-DTM2 y la Su.i, mientras que a una mayor distancia se obtiene entre el Su.b-DTM2 con la Su.f (Devenish y cols, 2000; Velours y cols, 2000; Velours y Arselin, 2000, Weimann y cols, 2008), éstos datos describen la topografía hipotética dentro del F_0 no cristalizado de *S. cerevisiae* [Figura 7]. Por otro lado, se ha reportado un entrecruzamiento entre la A6L con la Su.g en *B. taurus* (Belogradov y cols, 1996), sin embargo no existe la correspondiente corroboración en levadura (Su.8-Su.g). Las Su.e, Su.g y Su.k se discutirán más adelante.

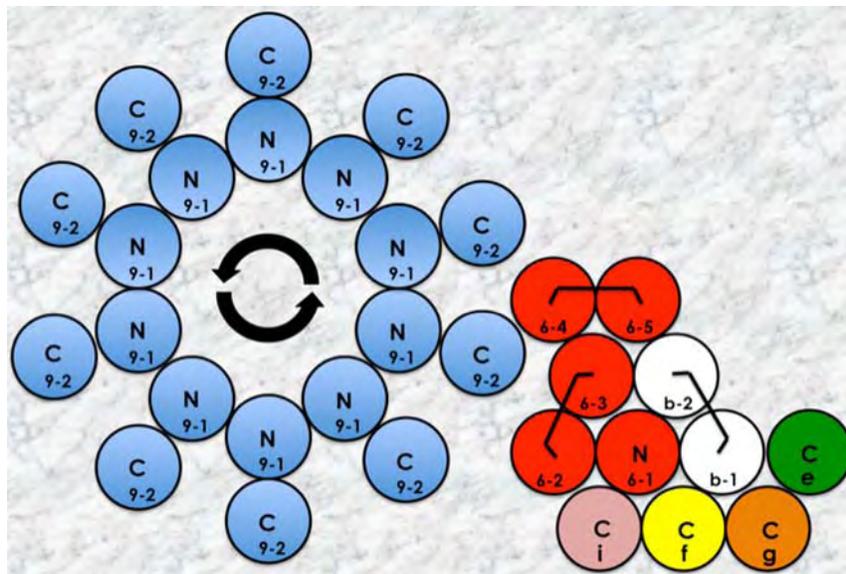


Figura 7. Modelo topográfico del sector F_0 embebido en la membrana intracresta de *S. cerevisiae*. En el esquema se muestran los DTM's de cada subunidad vistos desde el espacio intracresta, los cuales son enumerados en la parte inferior. Las asas hidrofílicas son representadas por líneas que interconectan a los círculos. N y C en el centro se refiere al amino y carboxilo terminal, respectivamente. La Su.e y la Su.g sólo se encuentran presentes cuando la enzima de levadura adopta una forma dimérica u oligomérica. El fondo gris representa a la MIC mientras que las flechas dentro del anillo de Su.9 indica el movimiento que describe el oligómero durante la translocación de protones en la síntesis de ATP. Modelo adaptado de Velours y Arselin, 2000.

3.5. OBSERVACIÓN DEL MONÓMERO DE LA ENZIMA BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La observación y estudio bajo ME de la F_1F_0 -ATP sintasa no sólo ha permitido definir la presencia de los cuellos central y periférico (Wilkins y Capaldi, 1998; Wilkins, 2000) sino que complementado con técnicas como la IEM, la cual emplea anticuerpos contra segmentos de alguna región nativa o introducida por mutagénesis, ha permitido localizar espacialmente algunas subunidades de la enzima como δ en *E. coli* (Wilkins y cols, 2000) y Su.h en *S. cerevisiae* (Rubinstein y cols, 2005).

Aún más, se ha obtenido el mapa electrónico 3D de la F_1F_0 -ATP sintasa completa [**Figura 8A**] con una resolución de 32 Å mediante la conjugación de imágenes 2D de crioelectromicroscopía de la enzima aislada por cromatografía (Rubinstein y cols, 2003). Las dimensiones de la enzima bajo ME son aproximadamente 22 nm de altura X 12 nm de ancho X 12 nm de profundidad (Wilkins, 2000), la variación que se presenta en la literatura depende de la técnica de aislamiento, del método de contraste utilizado, y de manera importante, del límite de resolución del microscopio electrónico empleado.

Contando con el mapa electrónico 3D y los datos cristalográficos correspondientes al F_1 - C_{10} de *S. cerevisiae* y parcialmente del cuello periférico (OSCP¹⁻¹²⁰-d³⁻¹²³-F6⁵⁻⁷⁰-b⁷⁹⁻¹⁸³) de *B. taurus*; se ha podido realizar una superposición, describiendo un gran porcentaje de la estructura de la enzima [**Figura 8B**] y se ha propuesto la posición de los dominios transmembranales de la Su.b, Su.6 (Su.a en *B. taurus*), Su.e y Su.g [**Figura 8C**]. La localización de las dos últimas subunidades se obtuvo al comparar el modelo 3D de la enzima monomérica de *S. cerevisiae* con el de *B. taurus* [**Figura 8D**] (Lauy cols, 2008), teniendo en cuenta que éstas subunidades se inmunolocalizan por réplica de Western en extracciones monoméricas de bovino (Belogradov y cols,

1996), mientras que en *S. cerevisiae* no se detecta su presencia en la fracción monomérica sino sólo en sus dímeros y oligómeros (Arnold y cols, 1998).

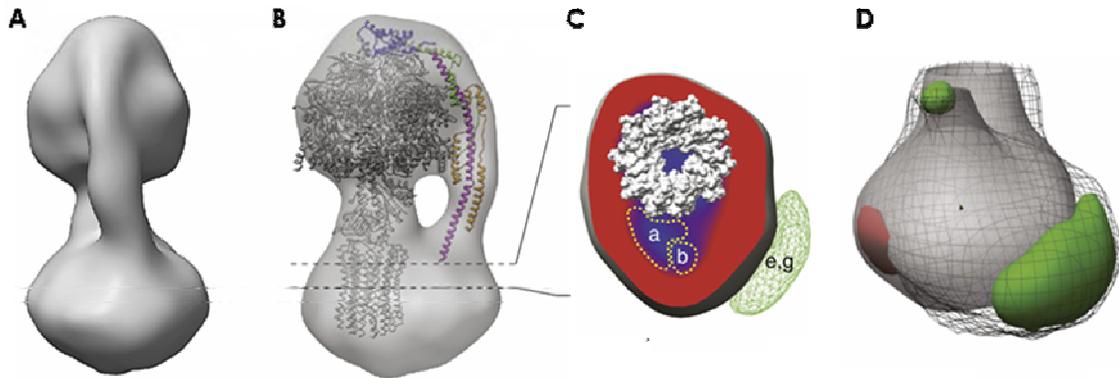


Figura 8. Modelos 3D obtenidos por crioelectromicroscopía. (A) El modelo 3D de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae* se obtiene por algoritmos computacionales que fusionan un conjunto de imágenes en 2D obtenidas por crioelectromicroscopía (B) La superposición de los datos cristalográficos de la F_1-C_{10} de *S. cerevisiae* (en gris) y la porción del cuello periférico de *B. taurus* (OSCP¹⁻¹²⁰ en azul, Su.d³⁻¹²³ en amarillo, F6⁵⁻⁷⁰ en verde y Su.b⁷⁹⁻¹⁸³ en rosa) son concordantes con el mapa 3D de la enzima. (C) El análisis en la parte inferior del modelo 3D (líneas punteadas en B) muestra el lugar hipotético de la Su.a (Su.6 en levadura) y de los DTM's de la Su.b. El área blanca en el interior corresponde al anillo de 10 subunidades 9. Así mismo, (4) comparando los modelos tridimensionales de la enzima de *S. cerevisiae* (estructura sólida gris) y de *B. taurus* (enrejado) se ha propuesto la posición de las Su.e y Su.g (área verde en el sector F_0) dado que éstas se detectan en el monómero de la enzima de bovino y no en el monómero de levadura (Lauy cols, 2008).

4. SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS.

Mediante el empleo de detergentes suaves y el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida nativos azules o claros (BN-PAGE y CN-PAGE, respectivamente) y segundas dimensiones desnaturizantes (2D-SDS-PAGE) se ha podido aislar y caracterizar los complejos presentes en la MIC (Schägger y Von Jagow, 1991; Schägger y cols, 1994). Los complejos respiratorios no sólo se obtienen de manera monomérica sino que se han descrito asociaciones entre ellos, que en general son denominados supercomplejos respiratorios. La estabilidad de éstos supercomplejos durante su extracción depende de factores como la cantidad y tipo de detergente utilizado, el espécimen solubilizado y la técnica de aislamiento (Boekema y Braun, 2007).

4.1. SUPERCOMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.

De los cuatros complejos que conforman la cadena de transporte de electrones sólo tres de ellos (I, III y IV) interaccionan para formar supercomplejos con diferente composición y estequiometría, por ejemplo I+III₂, III₂, III₂+IV₁₋₂ y I+III₂+IV₁₋₄ (Boekema y Braun, 2007). Su estudio no sólo se ha limitado a su identificación en geles nativos y desnaturalizantes, sino que al igual que la F₁F₀-ATP sintasa, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de observarlos bajo ME, proponer la disposición espacial mediante el empalme con los cristales correspondientes y generar modelos 3D (Heinemeyer y cols, 2007). Se ha propuesto que la formación de éstos supercomplejos aumenta la eficiencia en la transferencia de los electrones de un complejo respiratorio a otro (Vonck y Schäfer, 2009).

4.2. DÍMEROS Y OLIGÓMEROS DE LA F₁F₀-ATP SINTASA.

El revelado por actividad de ATPasa en geles nativos donde se cargan muestras de mitocondrias solubilizadas con detergentes suaves como la digitonina, permite la identificación de una serie de bandas correspondientes al monómero, homodímero y homo-oligómeros (Krause y cols, 2005), formados por números pares de la estructura monomérica (Wittig y cols, 2006), de la F₁F₀-ATP sintasa.

4.2.1. SUBUNIDADES DIMERIZANTES Y OLIGOMERIZANTES.

A través de 2D-SDS-PAGE se estableció que la Su.e, la Su.g y la Su.k están en el dímero y en los oligómeros de la F₁F₀-ATP sintasa de *S. cerevisiae* y no en su forma monomérica [Figura 7]. Así mismo, mutantes con ablación de la Su.e o la Su.g carecen de dímeros y oligómeros en solubilizados con Tritón X-100 (Arnold y cols, 1998).

Subunidad e. Es una proteína conformada por 95 a.a (única Cys²⁸). Contiene 1 DTM (residuos 4-21) en el cual se localiza un motivo GXXXG, cuya mutación provoca la desestabilización de los dímeros de la enzima. Su C-terminal se encuentra dirigido al espacio intracresta conteniendo una secuencia que promueve la formación de estructuras entrecruzadas (residuos 27-57) que son las responsables directas de la dimerización de la subunidad y otorga a la Su.g una disposición espacial que evita su degradación por las proteasas presentes en la MIC(Everard-Gigot y cols, 2005; Bornhövd y cols, 2006).

Subunidad g. Proteína formada por 115 a.a. (única Cys⁷⁵) con 1 DTM que envía su C-terminal al espacio intracresta y, por ende, al N-terminal al matricial. Su presencia permite la coexpresión de la Su.k mientras que su estabilización depende de la presencia del motivo GXXXG y del N-terminal de la Su.e (Arnold y cols, 1998; Bornhövd y cols, 2006). Por entrecruzamientos se demostró que la Su.g está en contacto con Su.b-DTM1[Figura 7] (Soubannier y cols, 2002) y con la A6L en la enzima de *B. taurus*(Belogradov y cols, 1996).

Subunidad k. Proteína periférica que se localiza del lado del espacio intracresta, está constituida por 68 a.a. A pesar de haberse detectado sólo en el dímero de la enzima y que su expresión depende de la presencia de la Su.g; no es esencial para la dimerización ni para la actividad de la F₁F₀-ATP sintasa (Arnold y cols, 1998).

Considerando que: (1) la F₁F₀-ATP sintasa sólo contiene una copia de la Su.e y de la Su.g (Arnold y cols, 1998; Bisetto y cols, 2008); (2) estudios de entrecruzamiento han revelado la presencia de aductos como Su.e-Su.e y Su.e-Su.g (Belogradov y cols, 1996; Weimann y cols, 2008); y (3) que solubilizados mitocondriales de mutantes demuestran que las Su.e y Su.g por sí mismas pueden formar dímeros de la enzima pero su presencia conjunta aumenta la estabilidad de dicha estructura en comparación con su presencia unitaria

(Arselin y cols, 2004), se deduce que dos enzimas monoméricas estarían formando el dímero por contacto de Su.e-Su.e, Su.g-Su.g y/o Su.e-Su.g.

Por otra parte, la introducción por mutagénesis de una Cys en el asa hidrofílica de la Su.b, localizada en el espacio intracresta [**Figura 7**], permitió la descripción de la asociación Su.b-Su.b dentro de una cepa silvestre (Spannagel y cols, 1998) y en las mutantes Δe y Δg (Paumard y cols, 2002).

En estudios de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), donde los fluoróforos fueron introducidos en la Su.b, se demostró *in vivo* la cercanía de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa dentro de una cepa silvestre y en la mutante Δe ; por lo que la interacción Su.b-Su.b es capaz de formar una asociación diferente de la enzima monomérica, la cual es más lábil a la solubilización con digitonina (Gavin y cols, 2005). Ablaciones consecutivas de los aminoácidos que conforman el asa hidrofílica de la Su.b han revelado que específicamente ésta sección es la que estabiliza la unión de dímeros para formar los oligómeros de la enzima en cepas silvestres (Weimann y cols, 2008).

Adicionalmente, otros estudios han demostrado las interacciones diméricas Su.i-Su.i y Su.h-Su.h en cepas Δe y Δg por formación de un puente disulfuro al introducir Cys en las subunidades correspondientes (Fronzes y cols, 2006).

Concluyendo, la oligomerización de la F_1F_0 -ATP sintasa conlleva dos tipos de asociaciones: la **intradimérica** que se realiza dentro del sector F_0 (Su.e y Su.g) y la **interdimérica** que ocurre en el sector F_0 (asa hidrofílica de la Su.b y Su.i) y por interacción de los cuellos periféricos (Su.h) (Giraud y cols, 2002; Wittig y Schägger, 2008). Recientemente, se ha descrito la interacción Su.6-Su.6 para formar la entidad estable $(c_{10-a})_2$ en solubilizados de mitocondrias de bovino (Wittig y cols, 2008).

4.2.1.1. FENOTIPO DE MUTANTES CON ABLACIÓN DE SUBUNIDADES DIMERIZANTES U OLIGOMERIZANTES.

Las mutantes Δe y Δg presentan un lento crecimiento en medios no fermentables, la síntesis e hidrólisis de ATP no se ven afectadas aunque no se ha reportado un estudio sistemático de éstas actividades, en sus mitocondrias se observan discos concéntricos en forma de 'aros de cebolla' (Arselin y cols, 2004), la formación de los supercomplejos entre los complejos III y IV se ve afectada (Saddar y cols, 2008) y el potencial de membrana disminuye, motivo por el cual del 10% al 40% de la población pierde parcial (ρ^-) o totalmente (ρ^0) el ADN mitocondrial (Bornhövd y cols, 2006; Duvenzin-Caubet y cols, 2006).

La ablación del asa hidrofílica (Weimann y cols, 2008), del primer DTM (Soubannier y cols, 2002) o toda la Su.b (Paumard y cols, 2002) produce, similarmente, cepas cuyas crestas mitocondriales se presentan en forma de 'aros de cebolla' y del 30% al 40% son ρ^-/ρ^0 . Drásticamente, se ha observado la ausencia total de crestas cuando se realizan mutaciones que afectan el ensamblaje del heterohexámero $\alpha_3\beta_3$ de la enzima como en $\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$, siendo incapaces de sintetizar ATP por fosforilación oxidativa (Lefebvre-Legendre y cols, 2005).

Considerando lo anterior, se propone que la morfología tubular (Gavin y cols, 2004) y el potencial de membrana (Bornhövd y cols, 2006) dependen del correcto ensamblaje de los dímeros y oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa.

4.2.2. OTRAS PROTEÍNAS CON PROBABLE IMPLICACIÓN EN LA DIMERIZACIÓN.

La proteína inhibidora de bovino (IF_1) está conformada por 84 a.a. El C-terminal (residuos 46 - 84) tiene una secuencia capaz de dimerizar y tetramerizar a pH menor y mayor de 6.5, respectivamente (Cabezón y cols, 2002), mientras el N-terminal (residuos 14 - 47) inhibe la enzima al unirse en la interfase α/β . Se ha

propuesto la presencia de una bisagra (residuos 46 - 56), entre los dominios dimerizantes e inhibitorios que otorgan cierta flexibilidad a la proteína (Domínguez-Ramírez y cols, 2006). La IF₁ se mantiene unida a la F₁F₀-ATP sintasa monomérica por medio de la interacción de su C-terminal con OSCP (Zanotti y cols, 2004).

Se ha demostrado que la IF₁ dimeriza a la F₁ (Cabezón y cols, 2000; Domínguez-Ramírez y cols, 2001) y a la F₁F₀-ATP sintasa (García y cols, 2006) al formar un puente cruzado IF₁-IF₁ inhibiendo a ambos F₁'s. De manera contrastante, la Inh1 y la Stf1 de levadura tienen una menor tendencia a dimerizar aunque también forman dímeros lábiles en solución (Cabezón y cols, 2002). Además, la ablación única o combinada de Inh1, Stf1, Stf2 y Sfl2, no altera la formación del dímero de levadura (Dienhart y cols, 2002).

Por otra parte, existen indicios por réplica de Western y/o bajo ME de que el acarreador de adenín nucleótidos (AAN) se asocia ala forma monomérica (Chen y cols, 2004), dimérica y oligomérica de la enzima (Wittig y Schägger, 2008). Sin embargo, no existen datos exactos sobre la relación del AAN con dichas estructuras o si ésta favorece o no a la dimerización u oligomerización.

4.2.3. OBSERVACIÓN DEL DÍMERO DE LA ENZIMA BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Con el advenimiento de la ME, la microscopía de fuerza atómica (MFA) y el desarrollo de técnicas como la reconstrucción tomográfica (RT), coadyuvado con la información bioquímica, el conocimiento del mundo microscópico está siendo revolucionado.

4.2.3.1. DÍMEROS *IN SITU*.

Los primeros estudios se remontan a más de 45 años, cuando la observación bajo ME de las PSM's de corazón de bovino en tinción negativa permitieron la

descripción de unas estructuras predominantes en forma de paletas u hongos [Figura 9], las cuales en estudios subsecuentes de remoción y reconstitución, donde se pierde y recupera la actividad de síntesis e hidrólisis de ATP, mostraron contener la parte catalítica de la enzima que fue denominada F_1 (Fernández-Moran, 1962; Kagawa y Racker, 1966).



Figura 9. Micrografía electrónica de las partículas submitocondriales de corazón de bovino en tinción negativa. En la imagen se observa la presencia de estructuras en forma de paleta u hongo (flecha negra) que estudios subsecuentes de remoción y reconstitución mostraron ser el sector F_1 de la F_1F_0 -ATP sintasa (Kagawa y Racker, 1966).

Las impresiones en bajo relieve de las crestas mitocondriales de *Paramecium multimicronucleatum*, obtenidas por congelamiento rápido y capturadas bajo ME [Figura 10A], permitieron describir una serie de estructuras esféricas dirigidas al espacio matricial (Allen y cols, 1989). Dada la morfología de la F_1F_0 -ATP sintasa desde una vista superior (F_1) se sugirió que su asociación dimérica provocaría la curvatura de la MIM y su unión polimérica generaría crestas tubulares con un diámetro de 50 nm [Figura 10C] (Allen, 1995). La observación de los oligómeros de la enzima, ha sido corroborada por varios reportes usando mitocondrias y/o PSM's de: *S. cerevisiae* (Dudkina y cols, 2006; Thomas y cols, 2008), *Polytomella* (Dudkina y cols, 2005), hígado de rata y corazón de bovino (Strauss y cols, 2008).

Adicionalmente, mediante el empleo de la MFA se ha analizado la formación de los oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae* desde la MIC (F_0 's) [Figura 10B]. Ésta tecnología detalló la posición espacial de los canales de protones y de 3 densidades circulares que corresponden a los DTM's de las otras subunidades que conforman los segundos dominios de los sectores F_0 's. Así mismo, se describió la existencia de dos tipos de dímeros cuyos puntos

más distantes de los anillos de Su.9 miden 15 nm [Figura 10D] y 10 nm [Figura 10F]. Se ha propuesto que el dímero con una mayor distancia corresponde al estado de síntesis de ATP y es capaz de unirse a otros dímeros para oligomerizar [Figuras 10B y 10E], mientras que el dímero más cerrado se forma durante la inhibición de la hidrólisis de ATP y no oligomeriza [Figuras 10B y 10F] (Buzhynskyy y cols, 2007).

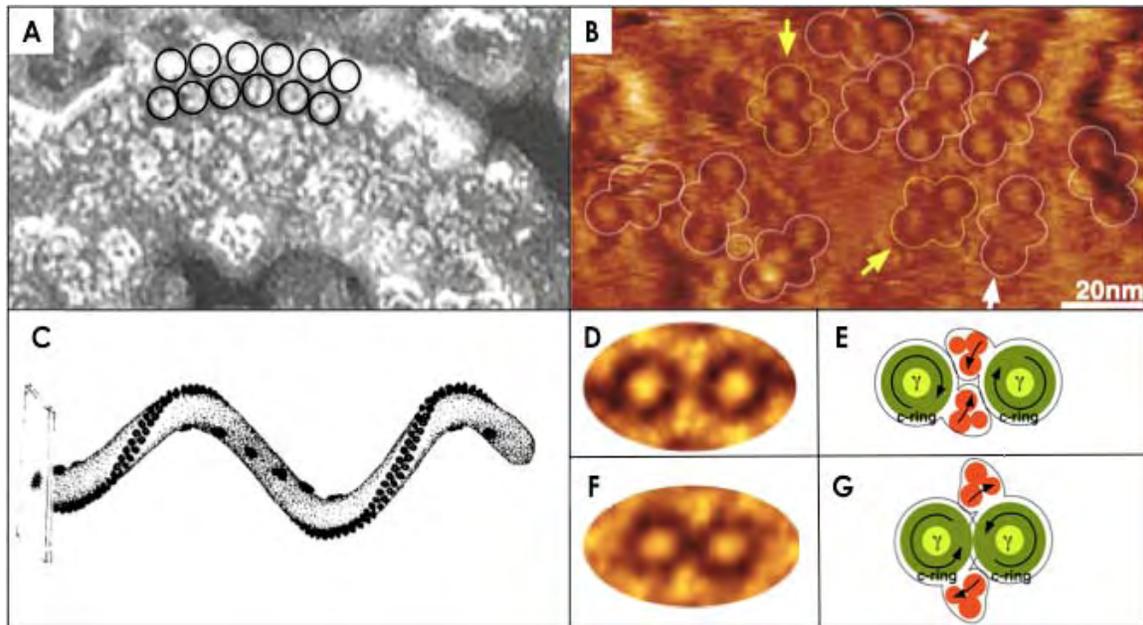


Figura 10. Observaciones microscópicas de los oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa. El análisis de las imágenes capturadas bajo ME usando las impresiones en bajo relieve obtenidas por congelamiento rápido, permitieron la descripción de cadenas formadas por F_1 's (círculos blancos) a lo largo de las curvaturas de las crestas mitocondriales de *Paramecium micronucleatum* (A); el modelo propone que la oligomerización de la F_1F_0 -ATP sintasa promueve la protrusión de la MIM provocando la formación de crestas tubulares con un diámetro de 50 nm (Allen y cols, 1989) (C). Estudios bajo MFA en *S. cerevisiae* (B), muestran un patrón similar para los F_0 's (anillos de Su.9 y 3 densidades que corresponden a los DTM's de las otras subunidades que conforman a los segundos dominios de dichos sectores). Se resolvieron dos tipos de dímeros cuyos puntos más distantes de los anillos de Su.9 están a 15 nm (D y delineado blanco en B) y a 10 nm (F y delineado amarillo en B); la disposición de las subunidades del sector F_0 depende de la actividad de síntesis (E) o hidrólisis (G) de ATP (Buzhynskyy y cols, 2007).

En la actualidad, se cuenta con la primera RT de una cresta tubular mitocondrial de hígado de rata con un diámetro de 34 nm [Figura 11A], el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa presente [Figuras 11B y 11C] tiene un ángulo de 70° , con una distancia entre F_1 - F_1 de 28 nm y entre los centros F_0 - F_0 de 13 nm. Por otro lado, en corazón de bovino [Figuras 11D y 11E] el ángulo oscila entre 55° y 95° . Funcionalmente se ha estimado que la curvatura de la MIC provoca el

incremento localizado del pH en 0.5 unidades, aumentando la eficiencia de la enzima para sintetizar ATP (Strauss y cols, 2008).

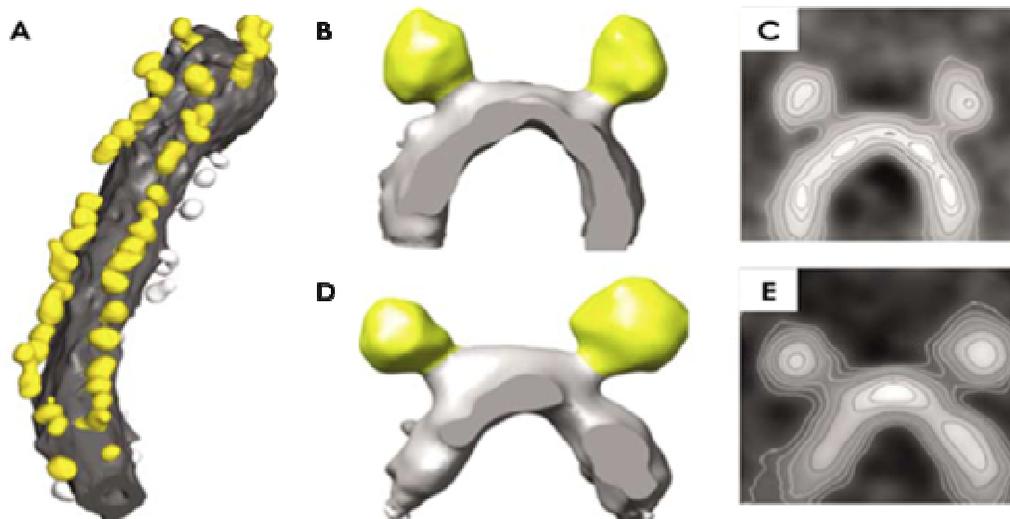


Figura 11. Reconstrucción tomográfica de crestas mitocondriales. A través de la serie de imágenes capturadas bajo crioelectromicroscopía, se realizó la RT de una cresta tubular con un diámetro de 34 nm localizada en una mitocondria de hígado de rata (A), sus dímeros (B y C) presentaron una apertura de 70° y una distancia de 28 nm y 13 nm entre F₁-F₁ y los centros F₀-F₀, respectivamente. Por otra parte, los dímeros de bovino (D y E) tuvieron una variación de apertura que oscila entre 55° y 95°. Las figuras B y D representan los volúmenes promedio de una serie de dímeros *in situ*, mientras que las figuras C y E son los mapas de contornos bidimensionales de los volúmenes anteriores. En amarillo la F₁, en gris la MIM y en blanco estructuras proteicas no definidas (Strauss y cols, 2008).

4.2.3.2. DÍMEROS AISLADOS.

El enriquecimiento de los solubilizados mitocondriales con digitonina por gradientes de glicerol o sacarosa ha permitido obtener muestras lo suficientemente puras para su observación directa bajo ME. Dímeros de la F₁F₀-ATP sintasa aislados de *B. taurus* (Minauro-Sanmiguel y cols, 2005), *Polytomella* (Dudkina y cols, 2005) y *S. cerevisiae* (Dudkina y cols, 2006; Thomas y cols, 2008) han sido reportados.

En *B. taurus* se resolvió por primera vez la estructura para el dímero de la enzima, definiéndose un ángulo de 40° entre los cuellos centrales de los monómeros [Figura 12A]; posteriormente, en *S. cerevisiae*, se observaron dos familias con ángulos de 35° [Figura 12B] y 90° [Figura 12C]; y en *Polytomella sp*, una sólo formación dimérica de 70° [Figura 12D]. Estudios recientes han

definido la existencia de al menos 6 tipos diméricos en *S. cerevisiae* (Thomas y cols, 2008). Se ha planteado que las diferentes aperturas depende de la forma en la que el detergente disocia a los oligómeros, definiendo sea los dímeros verdaderos (estructuras abiertas) ya los pseudo-dímeros (estructuras cerradas). Los cuellos periféricos de éstos últimos no son observables debido a que, probablemente, se localizan detrás de los cuellos centrales mientras que en el dímero verdadero son visibles en una vista lateral [Figuras 12B y 12C] (Dudkina y cols, 2006).

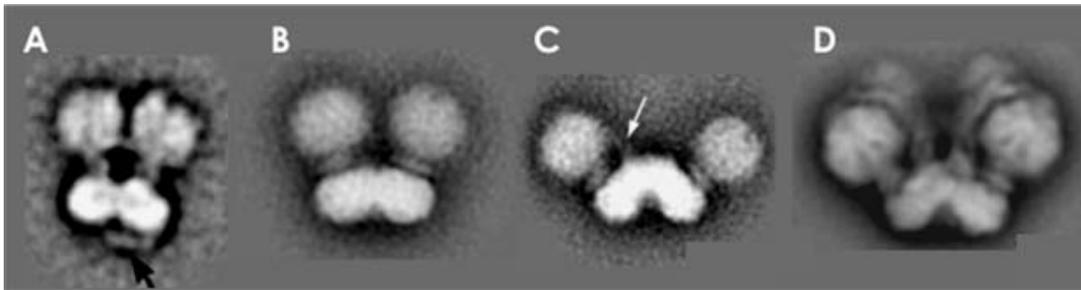


Figura 12. Dímeros aislados observados bajo microscopía electrónica. Los dímeros de diferentes especies han sido aislados a través de gradientes de glicerol o sacarosa: (A) *Bos taurus*, presentó un dímero único con una amplitud de 40°, se propone que el puente generado en las F₀'s (flecha negra) es debido a la dimerización de la Su.e mientras que el formado en las F₁'s, a la dimerización de IF₁ (Minauro-Sanmiguel y cols, 2005); (B y C) *S. cerevisiae*, se detalló la existencia de dos dímeros cuyos ángulos son de 35° y 90°, respectivamente, la flecha blanca en C indica el probable cuello periférico en la interfase de la estructura dimérica (Dudkina y cols, 2006); y (D) *Polytomella*, se describió un dímero de 70° (Dudkina y cols, 2005), las estructuras superiores corresponden a varias proteínas denominadas ASA's (Vázquez-Acevedo y cols, 2006).

En la imagen promedio de *B. taurus* se presentan dos puentes: uno que une a los F₁'s y un segundo a los F₀'s, se ha propuesto que éstos corresponden a la dimerización de la IF₁ y la Su.e, respectivamente (Minauro-Sanmiguel y cols, 2005). Dado que la proteína inhibidora promueve y estabiliza a la estructura dimérica de la F₁F₀-ATP sintasa en corazón de bovino y en hígado de rata (García y cols, 2006), la IF₁ forma una estructura cruzada en la interfase del dímero que explica tanto su papel inhibitorio como el dimerizante [Figura 13].

Por otro lado, la forma dimérica de la enzima de *Polytomella sp.* no es representativa de la mayoría de los organismos mitocondriados, dado que en éste dímero en particular no están presentes las proteínas que forman el cuello

periférico (OSCP, Su.d, Su.h y Su.d). En su lugar existen otras proteínas asociadas a la F_1F_0 -ATP sintasa denominadas ASA's (Vázquez-Acevedo y cols, 2006).

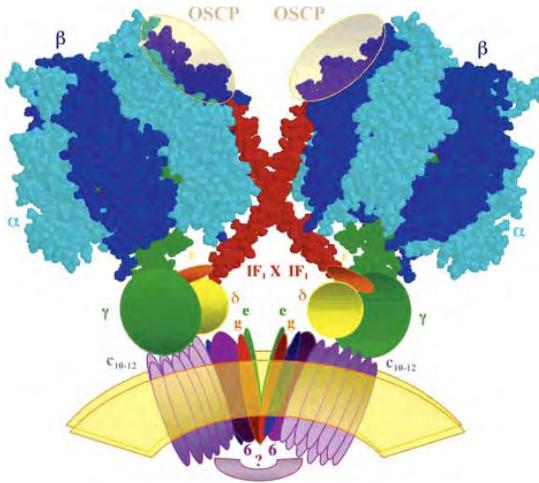


Figura 13. Modelo hipotético para el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de bovino. Dos enzimas monoméricas estarían en contacto a nivel de los F_0 's por la Su.e, Su.g y otras que participarían en la formación de un puente inferior. Las IF_1 's de cada monómero interaccionarían con el N-terminal unido a la interfase α/β del monómero contrario para crear un puente superior que se resolvió bajo ME [Figura 12A], muy probablemente, otras subunidades pertenecientes al cuello periférico (no mostrado) participan en el establecimiento de dicho puente (García y cols, 2006).

Hasta este punto, en el caso de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*: (1) se han presentado imágenes bidimensionales en vista lateral con baja resolución las cuales no describen correctamente a los dos cuellos periféricos en la interfase dimerizante; (2) se ha observado que la unión de los monómeros ocurre primordialmente en los F_0 's; (3) la alta densidad en los sectores F_0 's indica que las imágenes que se utilizaron para su promedio carecieron de uno o ambos sectores F_1 's y (4) existe una discrepancia entre el número de dímeros descritos en éste espécimen.

El presente trabajo pretende obtener una mejor preparación del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae* y con ello describir la estructura dimérica bajo ME con calidad y resolución superiores a las publicadas. De ser posible, se utilizarán las estructuras promedio en varias orientaciones para generar un modelo estructural en 3D teniendo como referencia a las estructuras cristalinas de la enzima mitocondrial que se han resuelto hasta la fecha.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Purificar el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*, para resolver su estructura bajo microscopía electrónica de transmisión y realizar su modelado estructural.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Purificar las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa silvestre W303-1A.
2. Detectar la presencia del dímero y monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa en solubilizados mitocondriales con digitonina mediante BN-PAGE. Así como, la presencia de algunas subunidades (α , β , Inh1, Su.e y Su.g) por 2D-SDS-PAGE y/o réplica de Western.
3. Observar las mitocondrias en células completas mediante microscopía electrónica de transmisión.
4. Enriquecer el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa solubilizado con digitonina mediante el uso de gradientes de glicerol.
5. Observar bajo microscopía electrónica de transmisión la presencia de los dímeros aislados.
6. Capturar un número de campos que permitan la selección de al menos 5000 imágenes de la más alta calidad de dímeros aislados.
7. Obtener las familias correspondientes a las partículas seleccionadas y describir la frecuencia de los dímeros presentes.
8. Generar el modelo 3D del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa con las familias de más alta frecuencia.

HIPÓTESIS.

1. La obtención de una preparación de mayor pureza y estabilidad de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de mitocondrias de *S. cerevisiae* debe permitir la captura bajo microscopía electrónica de un mayor número de partículas en estado nativo, cuyo análisis mejore la calidad y resolución de las imágenes reportadas en la literatura.
2. La generación de familias de mayor calidad en varias orientaciones debe facilitar el modelaje tridimensional del dímero de la enzima basado en una *referencia estructural* diseñada a partir de los datos cristalográficos disponibles de las diferentes subunidades que conforman a la F_1F_0 -ATP sintasa.

RESULTADOS.

1. La cantidad del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa extraído depende de la concentración de digitonina empleada.

Las mitocondrias de la cepa silvestre W303-1A se solubilizaron en presencia de diferentes concentraciones de detergente (0.5 - 6 mg de digitonina / mg de proteína) y los sobrenadantes de la ultracentrifugación se sometieron a BN-PAGE. La tinción del gel con azul de Coomassie [Figura 14A] y revelado por actividad de ATPasa [Figura 14B] permitieron definir la presencia de los monómeros y dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa, además de una serie de bandas superiores, observadas sólo por su actividad hidrolítica, que de forma general referimos como oligómeros de la enzima.

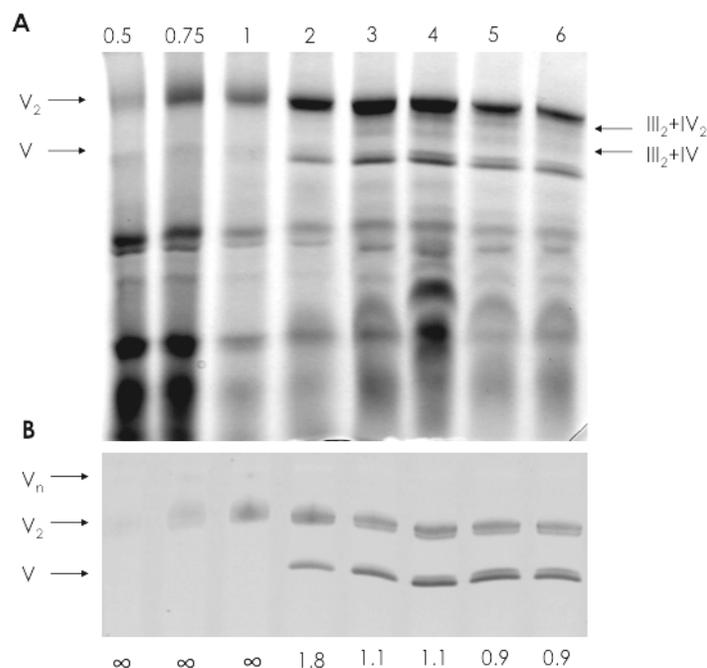


Figura 14. Curva de solubilización con digitonina para W303-1A. Las mitocondrias de la cepa silvestre W303-1A, se solubilizaron en presencia de diferentes concentraciones de digitonina: 90 μ g de cada muestra se sometieron a BN-PAGE del 4% al 11%. Los gels se revelaron por tinción de azul de Coomassie (A) o por actividad de ATPasa (B). Los números superiores indican los mg de digitonina por mg de proteína empleados durante la solubilización; y los inferiores, corresponden a la relación dímero/monómero de los datos densitométricos obtenidos para cada banda en el gel de actividad. V : monómero (~600 KDa), V_2 : dímero (~1200 KDa) y V_n : oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa. III_2+IV (~650 KDa) y III_2+IV_2 (~850 KDa): supercomplejos formados por dos ubiquinona:citocromo c oxidoreductasas y uno o dos citocromos c oxidasas, respectivamente. El gel de actividad se presenta en colores invertidos.

Densitométricamente, una disociación del 50% del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa ocurrió al elevarse 2.5 veces la concentración del detergente, ya que, la relación dímero/monómero se modificó de 1.8 a 0.9 al pasar de 2 a 5 mg de digitonina / mg de proteína [Figura 14B]. Concluyendo, existe una relación inversa entre la cantidad de dímero extraído de mitocondrias de levadura y la concentración de digitonina empleada.

2. Las mitocondrias de W303-1A presentan crestas tubulares.

Como control interno ratificamos la existencia de dímeros y monómeros activos de la F_1F_0 -ATP sintasa en el solubilizado de las mitocondrias de W303-1A [Figura 15A] así como la presencia de la Su.e, la Su.g y la Inh1 [Figura 15B] por réplica de Western. Los estudios de célula completa bajo ME revelaron que en la cepa silvestre sólo presenta crestas del tipo tubular a lo largo de sus mitocondrias [Figura 15C].

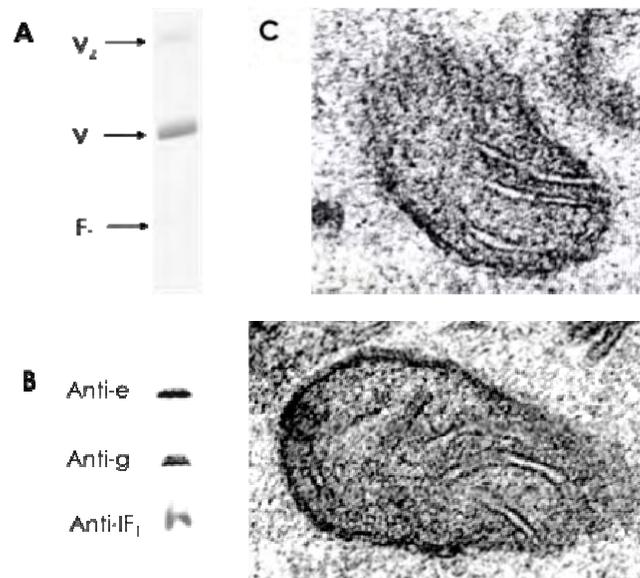


Figura 15. Morfología mitocondrial de W303-1A. Las mitocondrias de la cepa silvestre W303-1A fueron solubilizadas en presencia de 2 mg de digitonina por mg de proteína: 80 μ g de la muestra se sometieron a BN-PAGE del 4% al 11% y el gel se reveló por actividad de ATPasa (A). La presencia de la Su.e, la Su.g y la Inh1 se corroboró por réplica de Western mediante el uso de anticuerpos policlonales contra dichas subunidades (B). En 'Materiales y Métodos' se describe la técnica utilizada para la observación de las crestas en mitocondrias de la levadura bajo ME (C). F₁: fracción soluble, V: monómero, y V₂: dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa. El gel de actividad se presenta en colores invertidos.

De manera manual mediante el BOXER del programa EMAN (Ludtke y cols, 1999), se seleccionaron 9,960 dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa. La **Figura 17** presenta una sección aleatoria de un campo con el enmarcado de las partículas sin importar la orientación adquirida sobre la cubierta de carbono.

Realizando la clasificación por multireferencia (CMR) de las partículas, mediante el programa IMAGIC-5 (Van Heel y cols, 1996), se obtuvieron 100 familias diferentes. Todas fueron subclasificadas dependiendo de la orientación presentada (vista inferior, lateral o superior) y de la longitud de los puntos más distales de las F_1 's. De ésta forma, se generaron 13 subconjuntos de familias que oscilaron entre 22.1 nm y 40.3 nm. El histograma para W303-1A [**Figura 18**] mostró la existencia de más de dos dímeros, siendo el de mayor frecuencia el subconjunto con una distancia de 25.5- 26.6 nm.

5. Los cuellos periféricos, anillos de Su.9 y DTM's de las otras subunidades que conforman los segundos dominios de los sectores F_0 's se definen bidimensionalmente en el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa.

Considerando sólo los datos de las estructuras diméricas completas ($2F_0$'s y $2F_1$'s), la subclasificación permitió definir la presencia de 11 formas diméricas en vista lateral con diferentes aperturas que oscilaron entre 22.1 nm y 37.2 nm [**Figura 19**]; 7 formas en vista inferior con variación entre 22.4 nm y 34 nm [**Figura 20**]; y, finalmente, dos vistas superiores con una distancia de 22.1 nm y 25.2 nm [**Figura 21B**].

La presencia de los cuellos periféricos de cada monómero se pudo resolver en las imágenes bidimensionales del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en vista lateral [**Figura19**]. Adicionalmente, las familias en vista inferior mostraron la disposición de ambos anillos de Su.9 y dos densidades que correspondieron a los DTM's de las otras subunidades que conforman el segundo dominio de cada sector F_0 [**Figura20**].

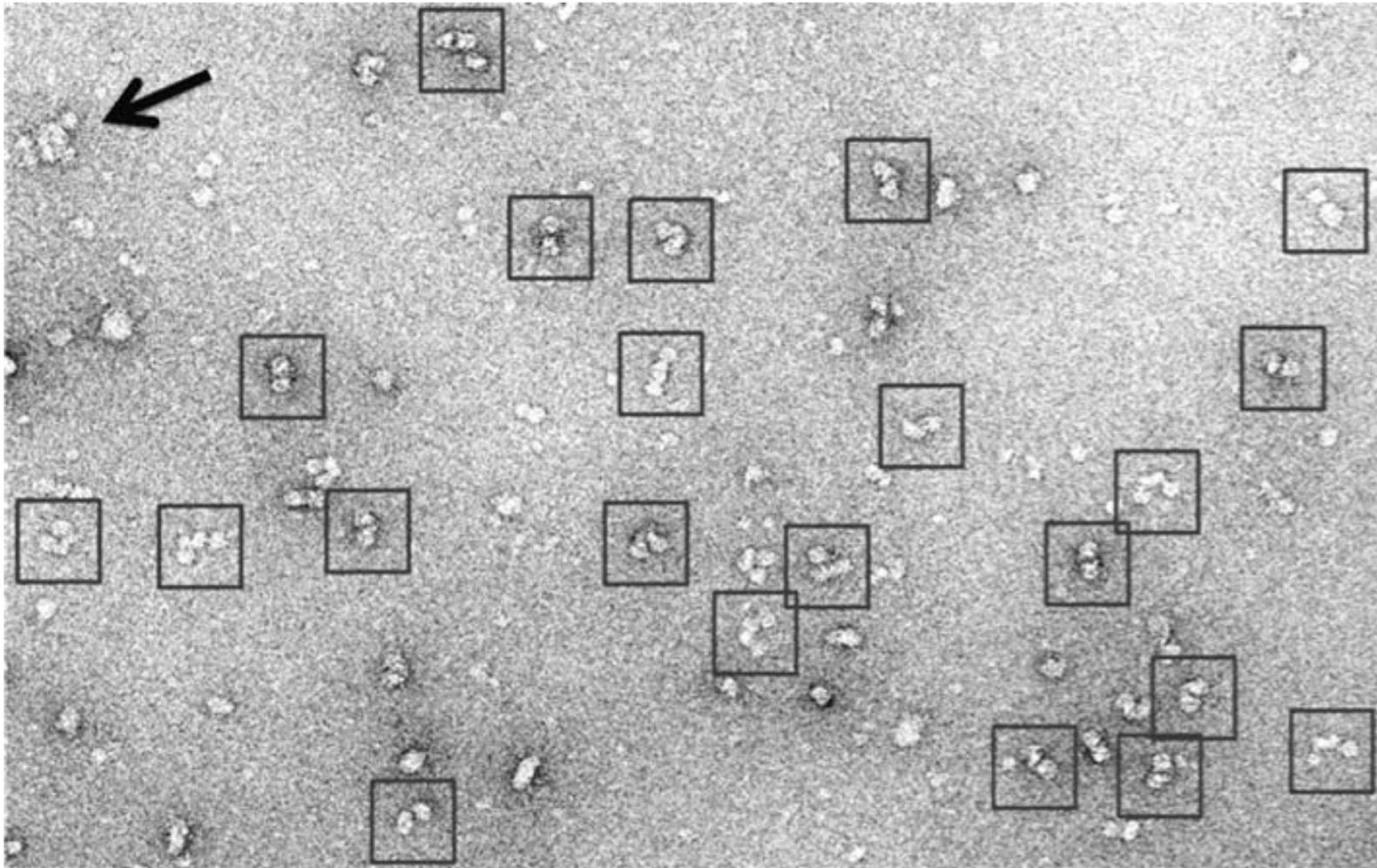


Figura 17. Campos de microscopia electrónica para W303-1A. La tinción con acetato de uranilo permitió la observación de las formas diméricas solubilizadas con digitonina y enriquecidas mediante el gradiente de glicerol. La selección manual aumentó la resolución de las familias diméricas (véase adelante) debido a la omisión de partículas con deficiencias en la tinción o empalmadas con otras partículas. La flecha indica la presencia de un tetrámero de la F_1F_0 -ATP sintasa. Magnificación 40,000X.

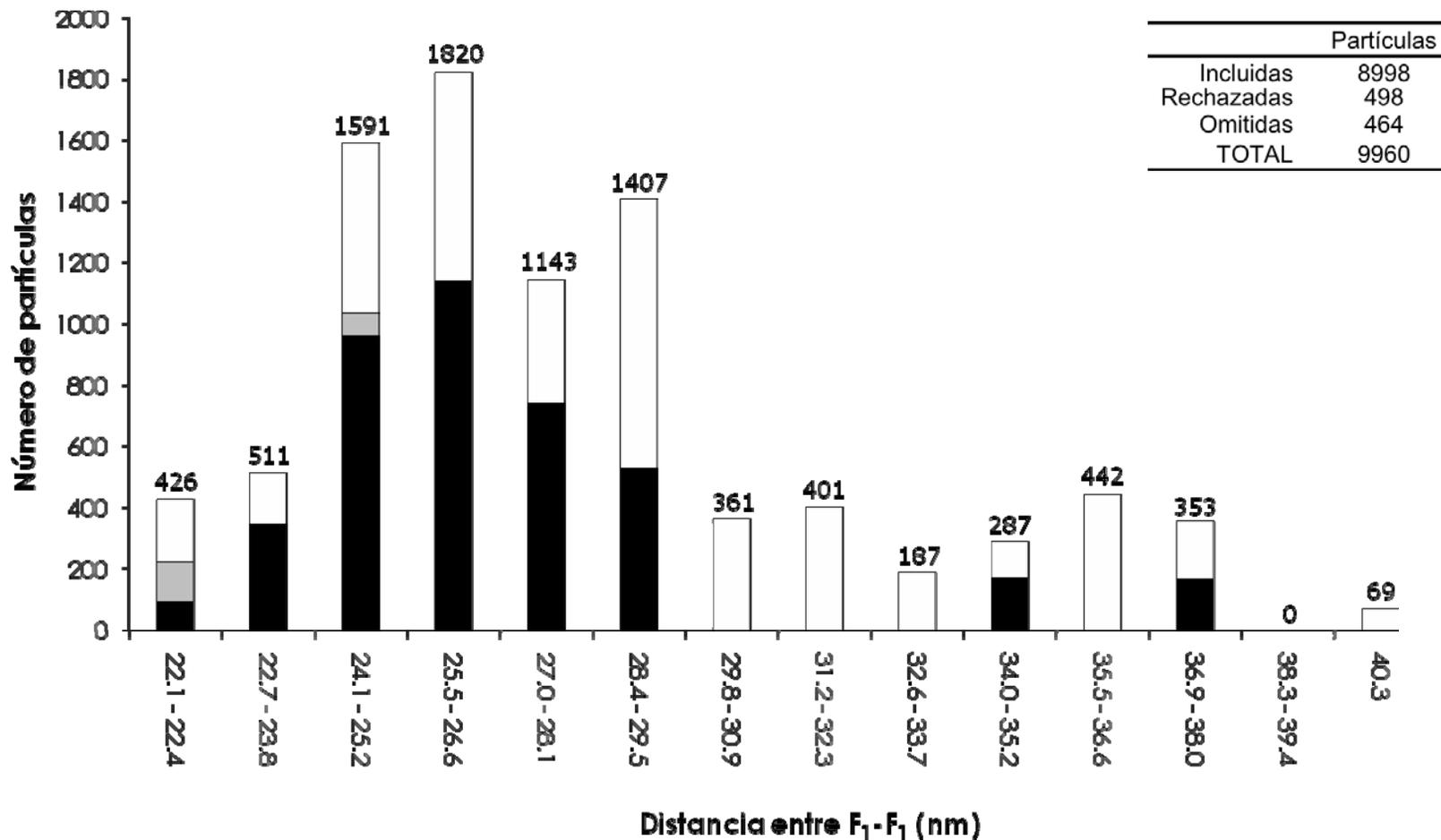


Figura 18. Histograma para los dímeros de W303-1A. Las familias de los dímeros de la F₁F₀-ATP sintasa correspondientes a la cepa silvestre W303-1A fueron subclasificadas manualmente de acuerdo a la longitud más distal entre sus sectores F₁'s. Las barras en negro, gris y blanco representan la orientación en vista inferior (4,126 partículas), superior (203 partículas) y lateral (4,669 partículas) con respecto a la cubierta de carbono, respectivamente. En el inserto, se muestra el número de partículas utilizadas, rechazadas y omitidas en el muestreo. Véase texto para mayores detalles.

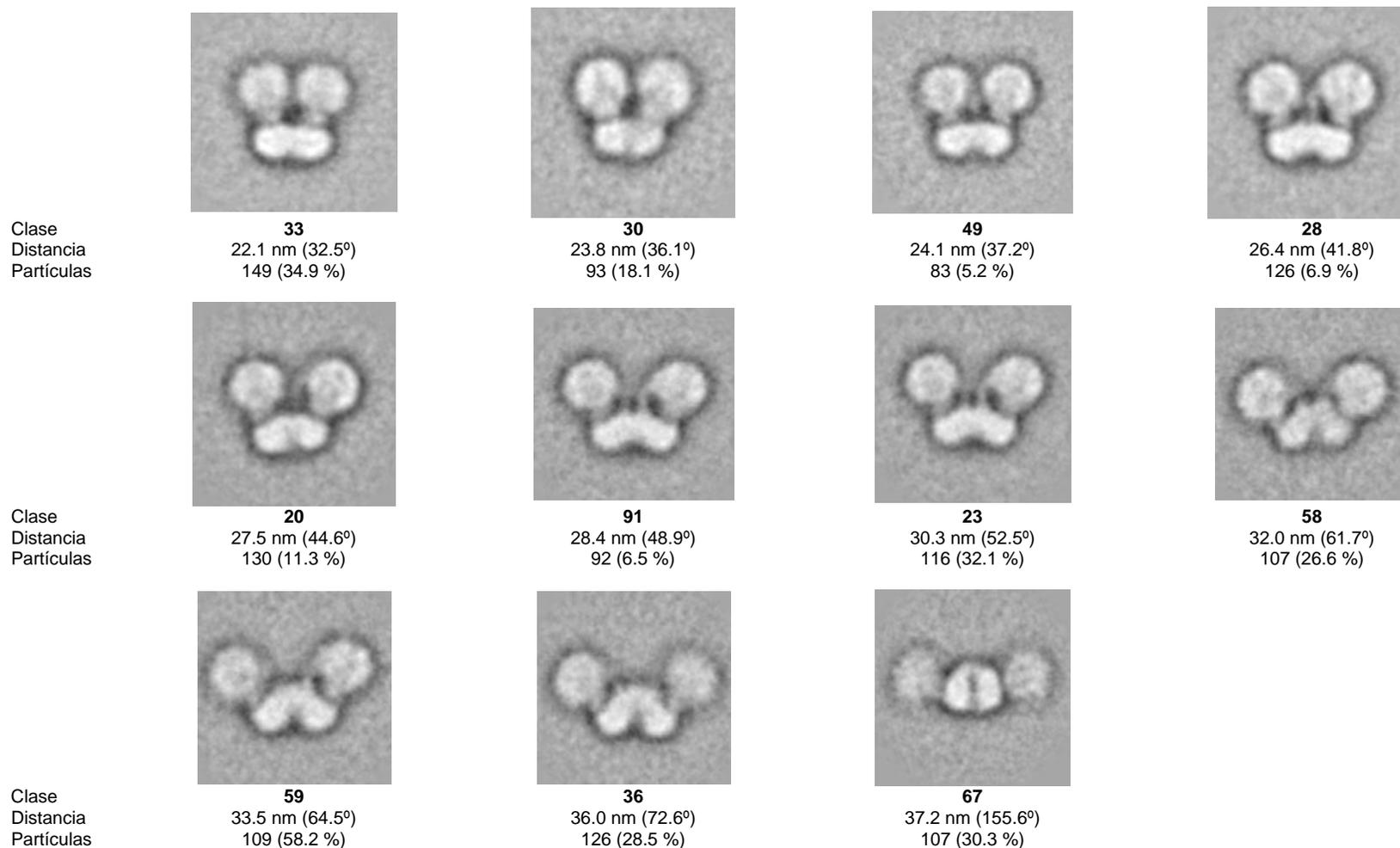


Figura 19. Familias de dímeros completos de la F_1F_0 -ATP sintasa de W303-1A en vista lateral. Las mejores imágenes de los dímeros completos ($2F_1$'s y $2F_0$'s) en vista lateral fueron extraídas de cada subclase. El número de familia correspondiente a la CMR, la distancia entre F_1 's, la cantidad de partículas que conforman a cada familia y el porcentaje respecto al número total de dímeros de cada subclase [Figura 18]; se presentan debajo de cada recuadro.

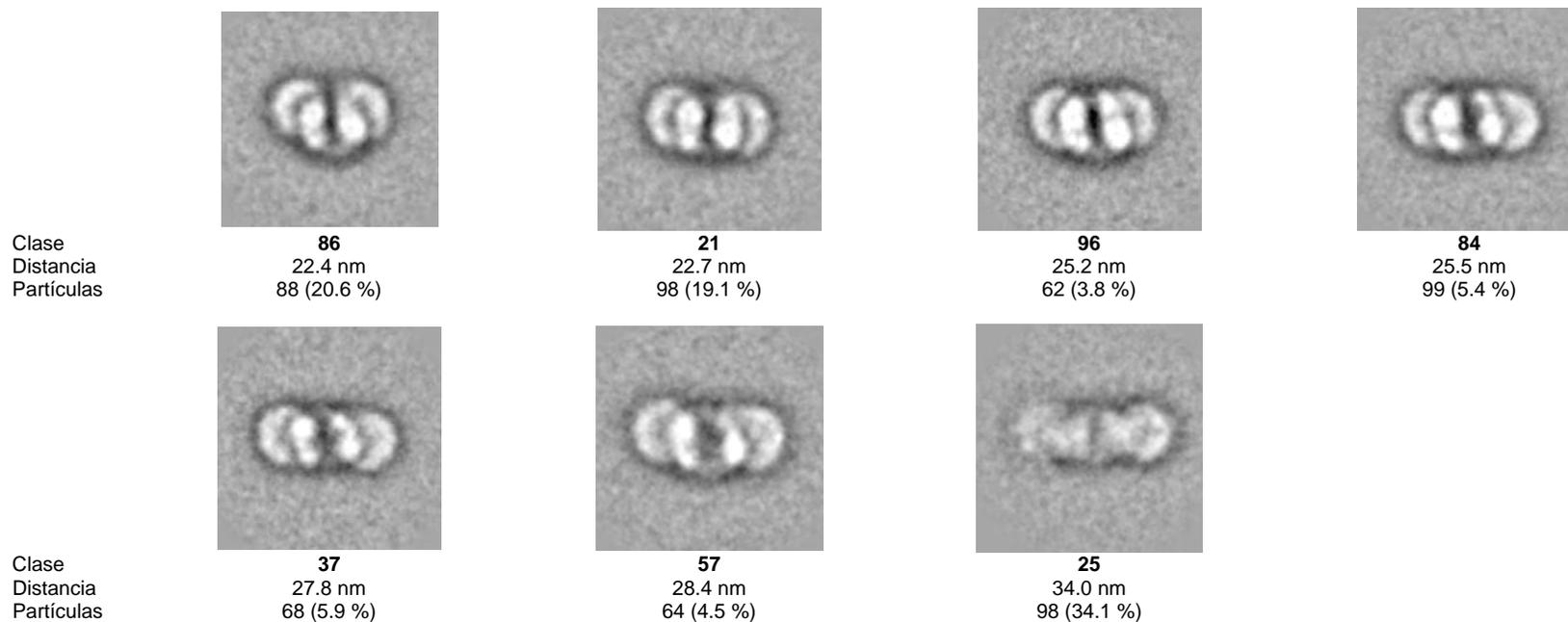


Figura 20. Familias de dímeros completos de la F_1F_0 -ATP sintasa de W303-1A en vista inferior. Las mejores imágenes de los dímeros completos ($2F_1$'s y $2F_0$'s) en vista inferior fueron extraídas de cada subclase. El número de familia correspondiente a la CMR, la distancia entre F_1 's, la cantidad de partículas que conforman a cada familia y el porcentaje respecto al número total de dímeros de cada subclase [Figura 18]; se presentan debajo de cada recuadro.

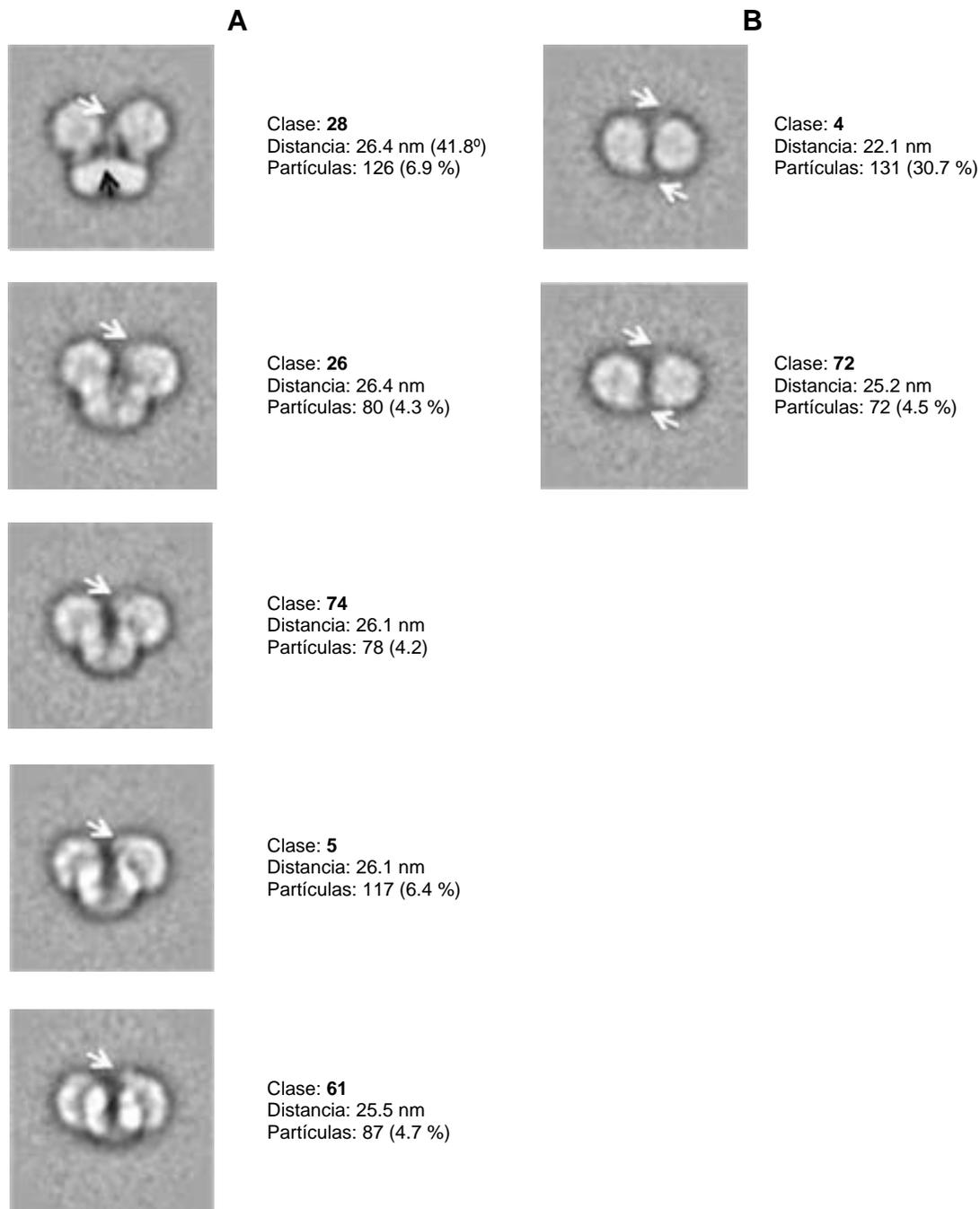


Figura 21. Localización de los cuellos periféricos en imágenes bidimensionales del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de W303-1A en diferentes orientaciones espaciales. Algunas familias generadas para la cepa silvestre presentaron densidades adicionales cerca del heterohexámero $\alpha_3\beta_3$ que correspondieron a los cuellos periféricos de la F_1F_0 -ATP sintasa. (A) Las diferentes orientaciones que adquirió la forma dimérica sobre la cubierta de carbono permitieron definir a dichas estructuras en primer y en segundo plano (flechas blancas y negras, respectivamente). (B) Éstas también fueron advertidas en las dos únicas vistas superiores obtenidas. El número de familia correspondiente a la CMR, la distancia entre F_1 's, la cantidad de partículas que conforman a cada familia y el porcentaje respecto al número total de dímeros de cada subclase [Figura 18]; se presentan a la derecha de cada recuadro.

6. Posición tridimensional de los cuellos periféricos en el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa.

A través del análisis exhaustivo de las familias diméricas de mayor frecuencia en diferentes orientaciones espaciales se determinaron unas densidades cercanas a los heterohexámeros $\alpha_3\beta_3$ [Figura 21A] las cuales fueron corroboradas y definidas en las dos únicas vistas superiores obtenidas después de la CMR de las partículas de W303-1A [Figura 21B]. Por lo tanto, propusimos que dichas estructuras pertenecían a los cuellos periféricos de cada monómero, definiéndose el primer y el segundo plano en las vistas laterales.

Teniendo éstas observaciones como antecedentes y haciendo uso de los datos de cristalografía obtenidos por difracción de rayos X o por RMN de las subunidades o segmentos de la F_1F_0 -ATP sintasa; se diseñó un dímero compuesto por dos monómeros con un ángulo de 40° [Figura 22]. Nuestra *referencia estructural* imitó la disposición en vista lateral [Figura 19], inferior [Figura 20] y superior [Figura 21B] observadas bajo ME.

Para descartar un alto error de alineamiento se consideraron dos *referencias estructurales*: una incluyendo la adición de la estructura cristalina de d^{3-123} - F_6^{5-70} - b^{79-183} [Figura 22D] y otra donde los segmentos del cuello periférico estén ausentes [Figura 22F], en ambas estructuras monoméricas.

Las 9,960 partículas de W303-1A se “forzaron” a formar dos modelos 3D independientes [Figura 23]. Los resultados visualizados en CHIMERA (Pettersen y cols, 2004) fueron casi similares, excepto que al suprimir el cuello periférico en la *referencia estructural* se observó una mayor resolución de éste definiendo un segundo contacto con $\alpha_3\beta_3$ [Figura 23B].

El modelo 3D del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*, obtenido en este trabajo, determinó que los cuellos periféricos de ambos monómeros se encuentran localizados en la periferia lateral de la asociación de los dos sectores F_0 , es decir, aledaños al centro de la estructura dimérica y que dicha modelo presenta dos ejes axiales de simetría.

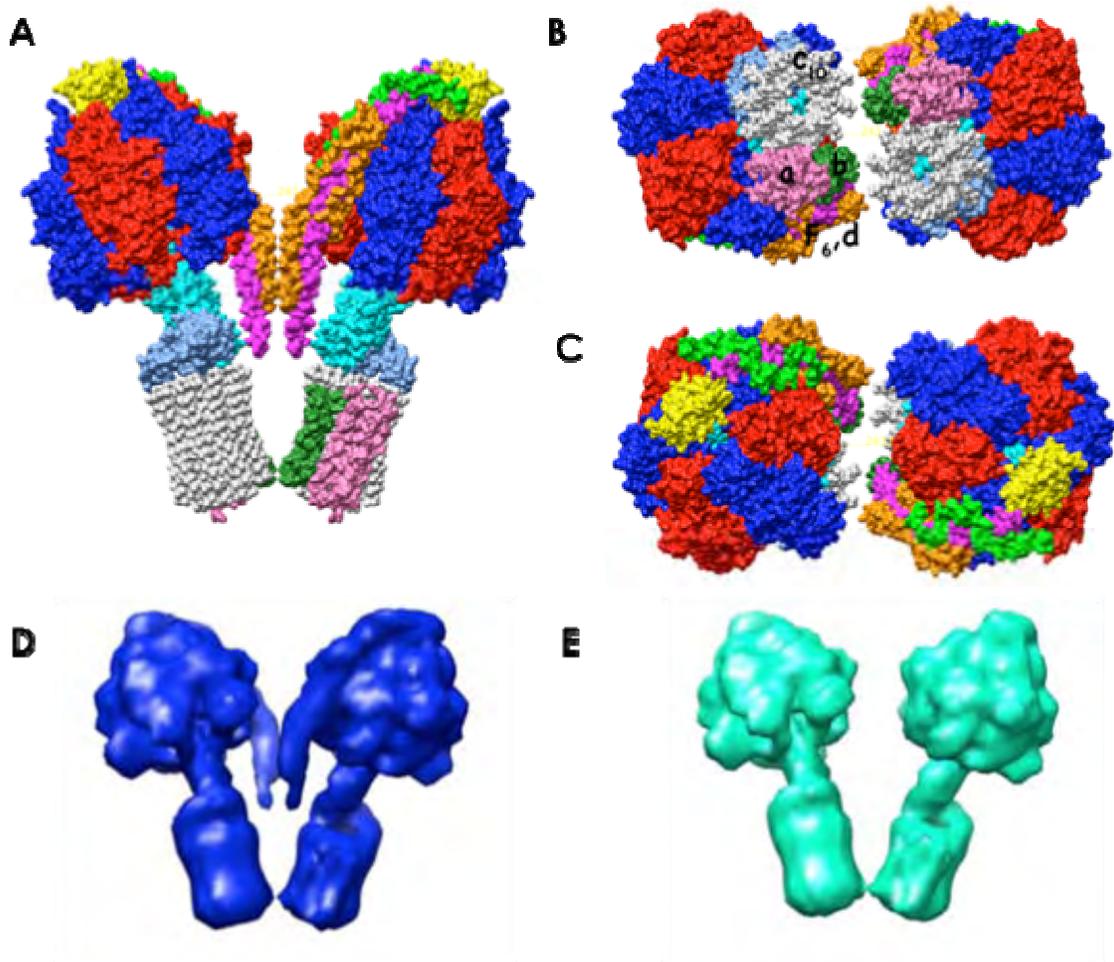


Figura 22. Referencias estructurales hipotéticas del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*.

Haciendo uso de los datos cristalográficos, obtenidos por difracción de rayos X o por RMN, de F_1 -c₁₀ (1qo1) de *S. cerevisiae*; OSCP¹⁻¹²⁰ (2bo5) y d³⁻¹²³ - F6⁵⁻⁷⁰ - b⁷⁹⁻¹⁸³ (2cly) de *B. taurus*; y 2 Su.b¹⁻³⁴ (1b9u) y Su.a⁹⁵⁻²⁶⁵ (1c17:M) de *E. coli*, se diseñó un dímero compuesto por dos monómeros con un ángulo de 40°. La vista lateral (A), inferior (B) y superior (C) de nuestra *referencia estructural* correspondió a las imágenes observadas bajo ME [Figuras 19, 20 y 21B, respectivamente]. Para los estudios consecutivos se consideraron dos diseños: con la presencia (D) o ausencia (E) de los segmentos d³⁻¹²³ - F6⁵⁻⁷⁰ - b⁷⁹⁻¹⁸³. Claves de esferas: rojo - α , azul rey - β , cian - γ , turquesa - δ , gris - Su.9, rosa - Su.a⁹⁵⁻²⁶⁵, verde fuerte - Su.b¹⁻³⁴ (DTM), púrpura - Su.b⁷⁹⁻¹⁸³, anaranjado - d³⁻¹²³, verde claro - F6⁵⁻⁷⁰ y amarillo - OSCP¹⁻¹²⁰.

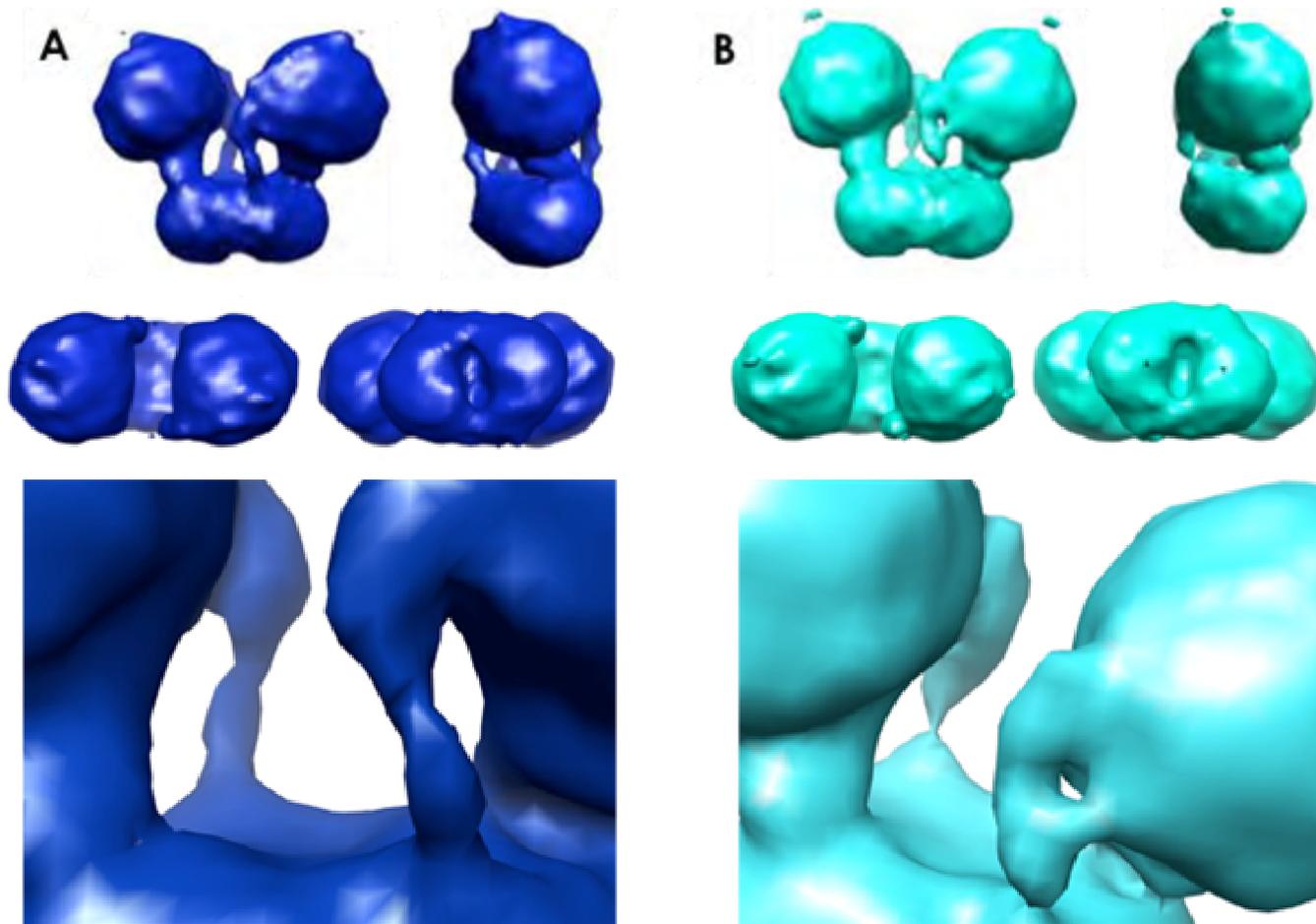


Figura 23. Modelos tridimensionales para el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*. Mediante el alineamiento de las 9,960 partículas del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de W303-1A; se generaron nuevas familias teniendo como patrones las imágenes proyectadas de las *referencias estructurales* [Figuras 22D y 22E]. Las imágenes de las nuevas familias de dímeros se “forzaron” a formar los dos correspondientes modelos 3D, siendo refinados después de ocho pases consecutivos por la misma serie de algoritmos (véase ‘Materiales y Métodos’). Los modelos en color azul rey (A) corresponden al uso de la *referencia estructural* con presencia de d^{3-123} - $F6^{5-70}$ - b^{79-183} , mientras que el modelo en cian(B) en ausencia de dichos segmentos. Véase texto para mayores detalles.

DISCUSIÓN.

1. La cantidad del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa extraído depende de la concentración de digitonina empleada.

La F_1F_0 -ATP sintasa, es capaz de formar homodímeros y homooligómeros activos (Krause y cols, 2005; Wittig y cols, 2006) que han sido estudiados *in situ* (Allen y cols, 1989; Buzhynskyy y cols, 2007; Strauss y cols, 2008), *in vivo* (Gavin y cols, 2005) y en forma aislada (Dudkina y cols, 2005; Minauro-Sanmiguel y cols, 2005; Dudkina y cols, 2006).

Existen dos interfases: una **intradimérica** que compromete a subunidades del sector F_0 de ambos monómeros (Su.e, Su.g y Su.6) para formar los dímeros de la enzima, y una **interdimérica** cuya unión ocurre en el sector F_0 (Su.i y el asa hidrofílica de la Su.b) y en el cuello periférico (Su.h) de dímeros contiguos para generar los correspondientes oligómeros (Giraud y cols, 2002; Fronzes y cols, 2006; Wittig y Schägger, 2008). Entre los detergentes más utilizados para la extracción de éstas asociaciones se encuentra la Digitonina y el Tritón X-100.

Para determinar la concentración de digitonina que se emplearía durante el desarrollo de este proyecto, fue importante realizar una curva de solubilización donde se varió la cantidad de digitonina en relación con los mg de proteína de las mitocondrias (0.5 – 6 mg de digitonina / mg de proteína).

El proceso de solubilización, que se describe en 'Materiales y Métodos', implicó la ultracentrifugación de las muestras con la finalidad de retirar los grandes fragmentos de la MIC y aquellas mitocondrias no solubilizadas; subsecuentemente, la concentración de proteína de los sobrenadantes fue determinada por el ensayo de Lowry previamente precipitando con ácido tricloroacético (TCA) para eliminar la interferencia ocasionada por los grupos aminos primarios del ácido aminocaproico (EACA) presente en el medio de solubilización. 90 μ g de cada muestra fueron sometidos a BN-PAGE y el gel fue

teñido con azul de Coomasie [**Figura 14A**] o incubado en un medio que contenía ATP-Mg²⁺ para seguir su actividad hidrolítica por la precipitación del Pb²⁺ presente (revelado por actividad de ATPasa) [**Figura 14B**]. Éste último método permite detectar oligómeros de la F₁F₀-ATP sintasa en bajas cantidades, dado a que el precipitado puede acumularse.

La composición de los supercomplejos aislados por BN-PAGE se pudo resolver mediante 2D-SDS-PAGE (no mostrado). A través de la presencia de α (54.9 KDa) y β (51.3 KDa), se corroboró que las bandas que presentaron actividad correspondieron a los oligómeros ($V_n \gg 1,200$ KDa), los dímeros ($V_2 \sim 1,200$ KDa) y los monómeros ($V \sim 600$ KDa) de la F₁F₀-ATP sintasa [**Figura 14B**]. La baja cantidad de detergente utilizado, la cantidad de proteína cargada al gel en primera dimensión y el límite de resolución de la tinción por azul de Coomasie, no permitieron definir los componentes de las dos bandas presentes entre el dímero y el monómero de la F₁F₀-ATP sintasa en los geles nativos teñidos con azul de Coomasie [**Figura 14A**]. Sin embargo, en la literatura está descrito que la banda más cercana al dímero y al monómero corresponden a los supercomplejos III₂+IV (~650 KDa) y III₂+IV₂ (~850 KDa), respectivamente (Dudkina y cols, 2006; Heinemeyer y cols, 2007).

A pesar de haber cuantificado correctamente la cantidad de proteína en los sobrenadantes, el gel nativo teñido por azul de Coomasie [**Figura 14A**] mostró variaciones importantes entre las bandas aisladas exhibiendo que la cantidad y composición de las asociaciones entre las proteínas presentes en la mitocondria dependió de la concentración de digitonina empleada. En nuestro caso en particular, la banda correspondiente al dímero de la F₁F₀-ATP sintasa aislada con 0.75 mg de digitonina / mg de proteína fue más densa que la obtenida al usar 1 mg de digitonina / mg de proteína; se ha reportado que la densidad es mayoritaria debido a que específicamente al solubilizar con dicha concentración de digitonina el dímero de la F₁F₀-ATP sintasa comigra con otro supercomplejo (III+IV) (Saddar y cols, 2008).

Por lo tanto, las mediciones densitométricas se realizaron en el gel revelado por actividad de ATPasa [Figura 14B]. Así pues, al usar muy bajas concentraciones de digitonina la MIC se solubilizó en baja proporción y las uniones interdiméricas permanecieron, por lo que parte de los oligómeros y dímeros fueron detectados en diferentes cantidades (0.5 – 1 mg de digitonina / mg de proteína). Sin embargo, al cruzar el umbral de 2 mg de digitonina / mg de proteína se llegó al punto crítico donde el dímero se disoció a su forma monomérica. La ruptura del 50% del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa se observó al incrementarse 2.5 veces la concentración de digitonina (relación dímero/monómero 1.8 y 0.9 solubilizando las mitocondrias a 2 y 5 mg de digitonina / mg de proteína, respectivamente).

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo fue observar al dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa bajo ME, aseguramos la máxima extracción de la forma dimérica y la mínima presencia de oligómeros y monómeros al fijarla concentración a 2 mg de digitonina / mg de proteína para todas las solubilizaciones posteriores.

2. Las mitocondrias de W303-1A presentan crestas tubulares.

El correcto ensamblaje de las estructuras diméricas y oligoméricas de la F_1F_0 -ATP sintasa conlleva a la formación de crestas del tipo tubular (Allen y cols, 1989; Allen y cols, 1995; Strauss y cols, 2008) permitiendo a su vez que diferentes asociaciones entre los complejos I, III y IV aumenten su propia eficiencia en el transporte de los electrones y mantengan un potencial de membrana óptimo, favoreciendo la síntesis de ATP (Arnold y cols, 1998; Gavin y cols, 2005; Bornhövd y cols, 2006; Wittig y cols, 2006; Vonck y Schäfer, 2009).

En primer lugar, se realizaron las solubilizaciones correspondientes para detectar los dímeros y monómeros de la enzima en W303-1A [Figura 15A] como se ha reportado en la literatura (Paumard y cols, 2002; Soubannier y cols, 2002;

Arselin y cols, 2004;Gavin y cols, 2004; Dudkina y cols, 2006; Weimann y cols, 2008). A pesar de haber utilizado la cantidad adecuada de digitonina (2 mg de digitonina / mg de proteína), la actividad de ATPasa de los dímeros de la cepa silvestre fue menor que la presentada en la curva de solubilización [**Figura 14B**] debido a que las mitocondrias empleadas fueron descongeladas en varias ocasiones, lo que provocó que la actividad específica en el dímero disminuyera. Por ende, en análisis subsecuentes se aseguró que las mitocondrias almacenadas fuesen descongeladas en una sólo ocasión y descartadas, al menos para estudios donde interesó observar la actividad hidrolítica.

En segundo lugar, se corroboró la presencia de la Su.e, la Su.g y la Inh1 mediante el uso de anticuerpos policlonales en réplicas de Western [**Figura 15B**]. El anticuerpo hecho contra el segmento inhibitorio de la IF₁ de *Bos taurus* presentó reacción cruzada con la Inh1 de levadura (no mostrado), por lo que fue utilizado para demostrar su expresión.

Finalmente, habiéndose establecido por geles nativos y por réplica de Western el correcto fenotipo de la cepa, las mitocondrias dentro de las células fueron observadas bajo ME. Las células fueron tomadas de placas YPD con 24h de crecimiento y el tratamiento de las muestras empleó la Zimoliasa 20T para degradar parcialmente la pared celular y mejorar el paso de los reactivos de fijación y medios contraste, describiéndose una mejor morfología de la estructura de la MIC y de la MIL (Bauer y cols, 2001). En las observaciones se describieron crestas tubulares a través de toda la mitocondria de W303-1A [**Figura 15C**].

3. Los dímeros de la F₁F₀-ATP sintasa se purificaron mediante un gradiente de glicerol.

Para la observación bajo ME de partículas aisladas, se requieren muestras con alto grado de pureza conteniendo exclusivamente la estructura deseada. El corrimiento de los gradientes de glicerol o sacarosa conteniendo los

solubilizados de las mitocondrias con digitonina ha sido la técnica preferida para la observación del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa (Minauro-Sanmiguel y cols, 2005; Dudkina y cols, 2005; Dudkina y cols, 2006; Thomas y cols, 2008).

En estudios anteriores, el bajo enriquecimiento de la forma dimérica era descrito por la presencia de las subunidades de la enzima en 2D-SDS-PAGE o por escasa actividad de ATPasa en geles nativos (Minauro-Sanmiguel y cols, 2005; García y cols, 2006).

En este trabajo, mediante la modificación de los parámetros de corrimiento del gradiente de glicerol y del BN-PAGE, presentamos la notoria actividad de ATPasa en geles nativos de fracciones donde la forma dimérica es prácticamente la única [Figura 16, Fx 6]. Las observaciones bajo ME [Figura 17] mostraron la presencia exclusiva de dímeros aún en fracciones donde el monómero aparece [Figura 16, Fx's 7 y 8]. Debido a que la concentración de digitonina es casi constante dentro del gradiente (2.5 mM), la disociación del dímero probablemente se debe a la propia inestabilidad de la estructura al ser sometida al BN-PAGE (Schägger y cols, 1994) por lo que se contaron con tres fracciones para los siguientes ensayos.

4. Existen más de dos tipos de dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa en W303-1A.

Las preparaciones enriquecidas libres de detergente, permiten en crioelectromicroscopía capturar imágenes en donde la estructura adquiere diferentes orientaciones espaciales bajo una cubierta de moléculas de agua cristalizada en propano líquido (Wilkens, 2000; Rubinstein y cols, 2003).

A pesar de las constantes pruebas disminuyendo la cantidad de digitonina hasta su concentración micelar crítica (CMC = 250 μ M) en la Fx 6, la presencia mínima de detergente evitó la cristalización correcta del agua y conglomeró a las estructuras proteicas; descartando los resultados positivos en esa técnica (no mostrado).

Alternativamente, la fracción siguiente a la primera detección del dímero en el gradiente de glicerol [**Figura 16**, Fx 7] se contrastó con acetato de uranilo para su observación bajo ME. Se ha reportado que la F_1F_0 -ATP sintasa presenta una disposición preferencial en ésta técnica (Rubinstein y cols, 2003), sin embargo, mediante variaciones en la ionización de la gradilla de cobre, preparación de la cubierta de carbono y en la tinción de la muestra; nuestros campos presentaron a la estructura dimérica en diferentes orientaciones espaciales que a primera instancia se definieron como la vista lateral, inferior y superior del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa. De forma esporádica, se localizaron tetrámeros de la F_1F_0 -ATP sintasa [**Figura 17**, flecha negra], los cuales han sido confirmados en fracciones superiores de gradientes de glicerol para *B. taurus* y para *S. cerevisiae* (datos no incluidos).

9,960 dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa fueron seleccionados manualmente de los campos de ME mediante el BOXER del programa EMAN (Ludtke y cols, 1999) y se sometieron a una serie de algoritmos de CMR en el programa IMAGIC-5 (Van Heel y cols, 1996) obteniéndose 100 familias diferentes. El programa de alineamiento fue configurado para rechazar al 5% (= 498) de las partículas introducidas correspondiendo a aquellas cuyo porcentaje de similitud fuese muy bajo entre todas las familias generadas.

Los parámetros de subclasificación establecidos anteriormente (Minauro-Sanmiguel y cols, 2005; Dudkina y cols, 2005; Dudkina y cols, 2006; Buzhynskyy y cols, 2007; Thomas y cols, 2008) no pueden ser determinados en todas nuestras imágenes debido a que las vistas inferiores evitarían la determinación del ángulo de los cuellos centrales, mientras que la vista lateral impediría la cuantificación de la distancia entre los puntos más distales de los anillos de Su.9.

Por ende, determinamos la longitud entre las partes más distales de los sectores F_1 's (*la conversión de pixel a nm se realizó considerando el factor 28.4*, fijado durante el uso del microscopio electrónico) aumentando de ésta forma los

opciones de subclasificación. Aquellas familias diméricas en las que se pudo calcular el ángulo entre los cuellos centrales, el valor se detona a un lado de la longitud en nm de subclasificación (no todas las clases).

Cuando los dímeros presentaron la pérdida de un F_1 , la distancia se calculó considerando el eje central de simetría y duplicando este valor. Las 464 imágenes omitidas manualmente (4.65%) correspondieron a monómeros de la enzima, un dímero de F_0 's y dos dímeros cuya orientación espacial impidió definir la longitud entre las F_1 's [Figura 24].

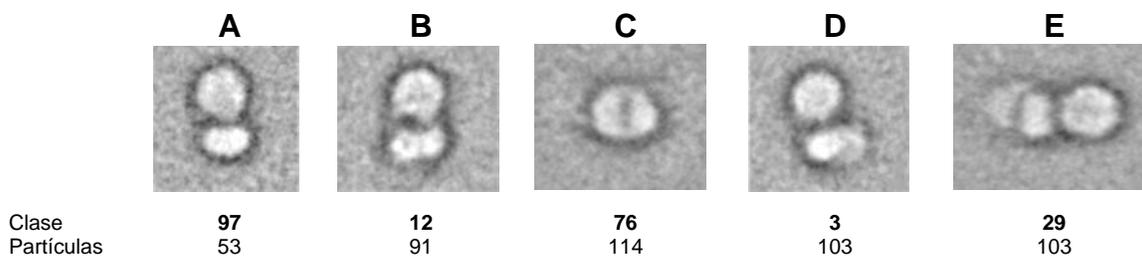


Figura 24. Imágenes omitidas en la subclasificación de las familias diméricas. De acuerdo a las dimensiones en nm de las imágenes omitidas durante la subclasificación de los dímeros se definió al monómero de la enzima en vista lateral (A y B), posiblemente un dímero de F_0 's en vista inferior (C) y dos dímeros con pérdida de un F_1 cuya orientación impidió determinar las distancias correspondientes (D y E). El porcentaje de monómeros presentes en la población total (9,960) correspondió al 1.44%.

El histograma de las formas diméricas (8,998) [Figura 18] definió 13 tipos de dímeros que oscilaron entre 22.1 nm a 40.3 nm, en discordancia con los datos reportados previamente (Dudkina y cols, 2006; Thomas y cols, 2008).

Los datos que se deducen de los histogramas son: (1) los dímeros en *S. cerevisiae* presentan dos picos pseudo-gaussianos que en general describen la presencia de dos aperturas [25.5 – 26.6 nm (Clase 28, 41.8° -cerrada-) y 35.5 – 36.6 nm (Clase 36, 72.6° -abierta-)]; (2) El dímero prioritario, al menos en nuestras condiciones de crecimiento y aislamiento, tiene una distancia entre F_1 's de 25.5 - 26.6 nm; (3) los dímeros de gran apertura son inestables, siendo quienes pierden uno o ambos sectores F_1 's [Figura 24]; y (4) la preferencia orientacional del dímero es uniendo los cuatros sectores a la cubierta de carbono (vista lateral).

5. Los cuellos periféricos, anillos de Su.9 y DTM's de las otras subunidades que conforman los segundos dominios de los sectores F_0 's se definen bidimensionalmente en el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa.

Los dímeros de la levadura publicados previamente [**Figuras 12B y 12C**] corresponden a las familias obtenidas después del alineamiento de las partículas capturadas por un sistema semiautomático de selección (Dudkina y cols, 2006); en ellos se distingue una alta densidad en los sectores F_0 's, lo que apunta a que un gran porcentaje de las estructuras diméricas perdieron uno o ambos F_1 's.

A través de nuestra curva de solubilización [**Figura 14**] demostramos que la disociación de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *S. cerevisiae* depende de la cantidad del detergente presente. Por lo que la concentración de digitonina en la extracción de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de la mitocondria (2 mg / mg de proteína), en el corrimiento en el gradiente de glicerol (2.5 mM) y en la preparación de la muestra para su observación bajo ME (250 μ M) fue minuciosamente optimizada en comparación a los reportes anteriores (Dudkina y cols, 2005; Minauro-Sanmiguel y cols, 2006; Dudkina y cols, 2006; Thomas y cols, 2008), evitando al máximo la disociación masiva de la forma dimérica ($\geq 1.44\%$).

Así mismo, la selección manual mediante el BOXER del programa EMAN (Ludtke y cols, 1999) conllevó a describir la estructura dimérica con calidad y resolución superiores; debido a que omitimos partículas con deficiencia en la tinción con acetato de uranilo y estructuras empalmadas que pudieran variar los centros de gravedad y de masa en las partículas seleccionadas [**Figura 17**].

Dentro de la subclasificación de nuestras familias de dímeros [**Figura 18**] nos dimos a la tarea de encontrar la mejor imagen en vista lateral e inferior para cada subconjunto, se definió la presencia de 11 formas diméricas con diferentes aperturas que oscilaron entre 22.1 nm y 37.2 nm en vista lateral [**Figura 19**]; 7 formas en vista inferior con variación entre 22.4 nm y 34 nm [**Figura 20**];

y, finalmente, dos vistas superiores con una distancia de 22.1 nm y 25.2 nm [Figura 21B].

De forma clara y por primera ocasión, se observa la disposición de los dos cuellos periféricos dentro de las estructuras diméricas, a medida que aumenta la apertura del dímero en vista lateral es más evidente su posición [Figura 19]. Concordantemente, fue posible detallar la presencia de ambos cuellos en las diferentes orientaciones espaciales que adquirieron las partículas sobre la superficie de carbono [Figura 21].

En la Figura 20, se observa la disposición de los dos anillos de Su.9 y la presencia de dos conjuntos o conglomerados que corresponden a los DTM's de las otras subunidades que conforman los segundos dominios de los sectores F_0 's (Su.6, Su.8, DTM's de la Su.b, Su.f, Su.i, Su.e y Su.g) desde una vista inferior.

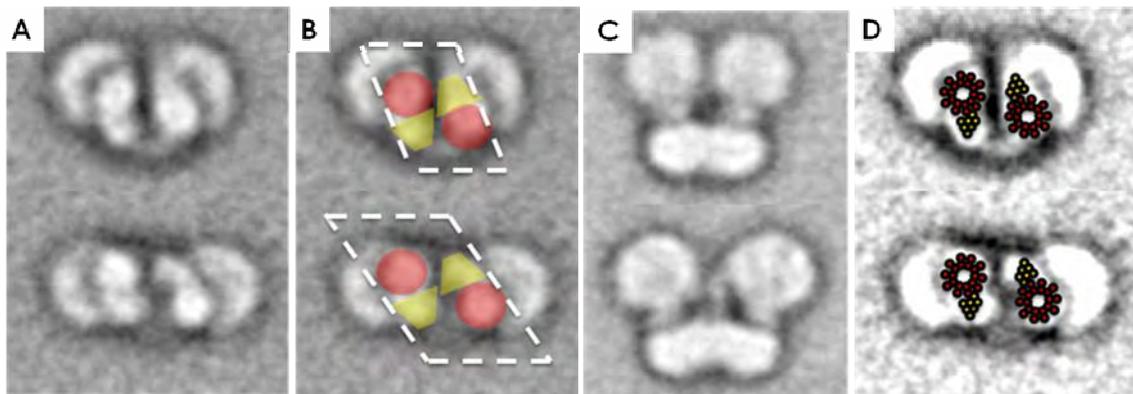


Figura 25. Análisis de las vistas inferiores y laterales de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*. Familias representativas del dímero completo de la enzima (2 F_1 's y 2 F_0 's) en vista inferior para el primer subconjunto observado (Arriba: clase 86, [refiérase a la Figura 20]) y la clase de mayor frecuencia (Abajo: clase 88, 26.4 nm, 63 partículas (3.4 %) de acuerdo al histograma de la Figura 18, fueron extraídas (A). Es posible distinguir la presencia de dos círculos (en rojo) y dos formas trapezoidales (en amarillo) que corresponden a los anillos de 10 subunidades 9 y los DTM's de las otras subunidades que conforman los segundos dominios de los sectores F_0 's, respectivamente. Así mismo, se resalta un cambio en el ángulo de la disposición espacial de todo el sector F_0 (paralelepípedos punteados) (B); que se relaciona con la variación de la apertura de las F_1 's en la vista lateral (Arriba clase 33 y abajo clase 28 [refiérase a la Figura 19]) y la correspondiente aparición de los cuellos periféricos (C). Considerando los puntos más distales de los anillos de Su.9 se determinó que la distancia entre éstos fue de 11.6 nm para la clase 86 y 14.7 nm para la clase 88. Los círculos insertados representan, hipotéticamente, a los DTM's de las subunidades cristalizadas de la enzima; en rojo, los anillos de Su.9 de *S. cerevisiae* y en amarillo, la Su.a y la Su.b de *E. coli*. Las áreas sin superposición probablemente contienen a las otras subunidades no cristalizadas (Su.e, Su.g, Su.i y Su.8) (D).

Relacionando los datos anteriores, es posible describir cambios en la disposición espacial de los sectores F_0 's que se relacionan con la variación de la apertura de las F_1 's y la consecuente aparición de los cuellos periféricos [**Figuras 25A, B y C**]. Considerando los cristales del anillo de 10 subunidades 9 de *S. cerevisiae*; y la Su.a y dos veces el DTM de la Su.b de *E. coli* (representando a la Su.6 y los dos DTM's de la única Su.b en levadura, respectivamente), el área que no se describe en la densidad observada correspondiente al segundo dominio del sector F_0 debe contener a las subunidades sin cristalizar conformadas por un sólo DTM: Su.e, Su.g, Su.i y Su.8 [Obsérvese las densidades sin superposición de los sectores F_0 's de la **Figura 25D**].

Del estudio minucioso de nuestras imágenes bidimensionales obtenidas bajo ME [**Figuras 19, 20, 21 y 25**] concluimos lo siguiente:

- a) La interacción principal del dímero de la enzima se establece en los sectores F_0 's.
- b) Se descarta la propuesta de que los cuellos periféricos en el dímero cerrado se localizan detrás del cuello central (Dudkina y cols, 2006).
- c) La distancia de los anillos de Su.9 del dímero de mayor frecuencia (14.7 nm) coincide con la obtenida bajo MFA (15 nm) (Buzhynskyy y cols, 2007).
- d) Se revoca la nomenclatura de 'dímeros verdaderos' y 'pseudo-dímeros' dependiendo del ángulo que presente (Dudkina y cols, 2006). Todas las estructuras diméricas presentan el mismo arreglo en los sectores F_0 's aunque con una ligera variación en su disposición espacial.
- e) Probablemente existe una correspondencia entre la disposición espacial de los segundos dominios de los sectores F_0 's con la aparición del cuello periférico en la vista lateral.
- f) A pesar que se ha determinado la presencia del AAN asociado al dímero y a los oligómeros de la enzima (Chen y cols, 2004; Wittig y

Schägger, 2008), las vistas inferiores sólo muestran la presencia de una pequeña densidad trapezoidal y un círculo que corresponden al segundo dominio y al anillo de Su.9 del sector F_0 de cada monómero, por lo que se descarta su presencia, al menos en este estudio.

Considerando todo lo anterior y las observaciones del dímero de bovino [Figura 12A], surgen las siguientes interrogantes: ¿Realmente el puente observado entre las F_1 's corresponde al puente de dos IF_1 o sólo se trata de una orientación en el que los cuellos periféricos dan esa apariencia? y ¿Por qué no es evidente la estructura bajo los F_0 's en levadura, si corresponde al dímero del C-terminal de la Su.e?.

Nuestros resultados sugieren que el puente observado en el dímero de *B. taurus* corresponde a una orientación de la estructura dimérica donde los cuellos periféricos dan esa apariencia [véase una orientación similar del dímero de levadura en la Figura 26]. La poca definición que se obtuvo en la imagen de bovino fue producto de deficiencias en el aislamiento del dímero y en la tinción negativa; y de manera importante, por la baja resolución del microscopio electrónico utilizado (comunicado directo del Dr. Wilkens y análisis personal de los campos almacenados). No descartamos el posible papel de la IF_1 y/o $Inh1$ en estabilización de la estructura dimérica, sin embargo, un puente producido por el cruce de dos proteínas inhibitoras dentro de la interfase de dimerización, es difícil de resolver mediante el contraste con acetato de uranilo. Ensayos usando la cepa $\Delta INH1/\Delta STF1$ para corroborar que el cruce entre los F_1 's corresponde a los cuellos periféricos y pruebas de reconstitución de la IF_1 de bovino en el dímero de dicha mutante han sido iniciadas (datos no incluidos).

Por otro lado, el puente bajo los F_0 's del dímero de bovino sólo ha sido descrito en éste espécimen y no aparece en nuestras estructuras diméricas [Figuras 19, 21 y 26] o en las reportadas en la literatura [Figuras 12A y 12B] (Dudkina y cols, 2006). El modelo de dimerización es ubicuo: el C-terminal de la

Su.e se encuentra dirigido al espacio intracresta conteniendo una secuencia que promueve la formación de estructuras entrecruzadas (residuos 27 - 57) que son las responsables directas de la dimerización de los monómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa (Everard-Gigot y cols, 2005). Por lo que cabe la posibilidad de que el puente observado en *B. taurus* sea producto de otra proteína o de errores del alineamiento por la presencia de fragmentos de la MIC. Hemos iniciado pruebas de IEM para localizar espacialmente a la Su.e y Su.g dentro de la estructura dimérica (datos no incluidos).

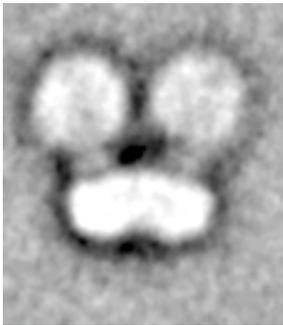


Figura 26. Dímero representativo de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* en vista lateral donde se observa un puente cruzado entre las F_1 's. Después de la CMR se detectó una familia (Clase 9, distancia 25.2 nm (37.1°), 129 partículas (8.1 %)) donde se distingue un puente cruzado entre las F_1 's, dado que se ha descrito que la Inh1 de levadura no forma estructuras diméricas estables por la corta longitud de sus C-terminales (Cabezón y cols, 2002) y por el análisis 3D -véase en el siguiente apartado- se determinó que dicho puente corresponde a una orientación de los cuellos periféricos [Compárese con la **Figura 12A**].

Haciendo un comparativo con lo realizado en la más reciente publicación del grupo de Dr. J. Velours (Thomas y cols, 2008), nuestro trabajo presenta una calidad superior en cuanto a: (a) grado de pureza, (b) contraste de la muestra con acetato de uranilo, (c) número de familias de dímeros de la enzima y (d) grado de resolución estructural.

Aún más, observando escrupulosamente la Figura 6A de su publicación (Thomas y cols, 2008) se puede delimitar al menos 10 dímeros en vista inferior que fueron pasados por alto; corroborándose la reproducibilidad de la orientación que describimos en este trabajo. Interesantemente, su histograma de frecuencias de dímeros muestra un sólo pico pseudo-gaussiano (aperturas entre 55° y 142°) en contraste con nuestros dos picos (aperturas entre 32.5° y $\sim 180^\circ$ -no mostrado-). Quizás las formas diméricas tienen relación con las condiciones del medio de cultivo empleado (YPLac), ya que se ha reportado que la cantidad de dímeros aislados tiene dependencia con el medio de cultivo (Schwaßmann y cols, 2007) siendo éste, quien posiblemente, ocasione la formación de crestas

tubulares (Mannella, 2006) por la polimerización de dímeros con aperturas mayores (Buzhynskyy y cols, 2007).

6. Posición tridimensional de los cuellos periféricos en el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa.

Otro objetivo del presente trabajo fue caracterizar estructuralmente el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*, por lo que el paso final fue el modelado tridimensional de dicha estructura.

Del análisis exhaustivo de las familias diméricas de mayor frecuencia (25.5 - 26.6 nm) en diferentes orientaciones espaciales advertimos unas densidades adicionales asociadas a los heterohexámeros $\alpha_3\beta_3$ [**Figura 21A**], éstas variaciones electrónicas fueron definidas en las dos únicas vistas superiores obtenidas bajo ME [**Figura 21B**] las cuales son observables con baja resolución en las vistas laterales [**Figura 19**, clases 4 y 72]; por lo que sugerimos que dichas densidades pertenecían a los cuellos periféricos de los monómeros que conforman a la estructura dimérica, detallándose el primer y el segundo plano de las vistas laterales.

Teniendo los antecedentes mencionados y empleando los datos cristalográficos obtenidos por difracción de rayos X o por RMN, realizamos el empalme correspondiente de los segmentos de F_1 - C_{10} (referencia en el Protein Databank 1qo1) de *S. cerevisiae*; OSCP¹⁻¹²⁰ (2bo5) y d^{3-123} - F_6^{5-70} - b^{79-183} (2cly) de *B. taurus*; y 2 Su.b¹⁻³⁴ (1b9u) y Su.a⁹⁵⁻²⁶⁵(1c17:M) de *E. coli*; para luego unir dos estructuras monoméricas y diseñar una *referencia estructural* de un dímero con apertura de 40° [**Figuras 22A**, **22B** y **22C**]. Dicha *referencia* imitó la disposición observada en las imágenes bidimensionales obtenidas bajo ME [**Figuras 19**, **20** y **21**].

Un error ocasional de los programas de alineamiento es fusionar imágenes no semejantes debido al exceso de ruido de fondo, un contraste heterogéneo de la partícula o porque en las selecciones además de la estructura

estudio, hay otras entidades que varían el centro de masa y de gravedad de la imagen. Por lo que dos *referencias estructurales* fueron generadas: una incluyendo la adición de la estructura cristalina de los segmentos del cuello periférico $d^{3-123} - F6^{5-70} - b^{79-183}$ [Figura 22D] y otra donde este ausente [Figura 22E], en ambas estructuras monoméricas.

Las 9,960 partículas de W303-1A se sometieron a dos alineamientos independientes, teniendo como patrones las imágenes bidimensionales proyectadas al hacer incidir un rayo imaginario sobre las dos *referencias estructurales*. Contando con las imágenes clasificadas en familias se “forzaron” a formar un modelo 3D haciendo uso de algoritmos de la Esfera de Euler (conversión de patrones bidimensionales a tridimensionales). Finalmente, se digitalizaron dos modelos 3D que fueron refinados después de ocho pases consecutivos por el mismo procedimiento [Figura 23]: es válido suponer que un gran porcentaje de las imágenes fueron excluidas por el programa pero al menos las 4 formas diméricas con mayor frecuencia en el histograma [Figura 18] se consideraron.

Los modelos visualizados en CHIMERA (Pettersen y cols, 2004) fueron muy similares en los sectores F_0 's, sin embargo, el modelo en el que se omitió $d^{3-123} - F6^{5-70} - b^{79-183}$ representa una versión mejorada dado que sin colocar el cuello periférico éste aparece en la misma posición que al usar la *referencia* con los correspondientes segmentos cristalizados. Además, se observó que la unión del cuello periférico con la parte superior del segundo dominio del sector F_0 es estrecha [cian de la Figura 23] en comparación con el otro modelo 3D generado [azul rey de la Figura 23], pero concuerda a lo reportado por Kane y cols (2006) [Figura 6]. La variación más importante fue que en el modelo 3D en el que se omitió $d-F6-b$ se observó dos asociaciones entre los cuellos periféricos y las F_1 's; ésta formación concuerda más fielmente con la estructura de las imágenes bidimensionales ya que en éste modelo se evitó “forzar” la resolución de dicha estructura.

La flexibilidad de la Su.b en el cuello periférico de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial está restringida por las interacciones “superiores” (OSCP, Su.d y Su.h) e “inferiores” (posiblemente involucrando los C-terminales de la Su.g, Su.f, Su.i y/o Su.8 -orientación no descrita-) que sujetan a la estructura formando un sólo ensamblaje (Kane y cols, 2006). Sin embargo, (a) los datos generados en el modelo 3D del dímero de la enzima [Figura 23], (b) la variación en el ángulo de la F6 cristalizada en forma aislada y formando parte del cuello periférico (Kane y cols, 2006), y (c) la detección de fracciones diméricas donde las dos F_1 's ($\alpha_3\beta_3$, γ , δ y ϵ) se desprenden con sus correspondientes OSCP y Su.h (Wittig y cols, 2008); deberán reconsiderar la probable flexibilidad no del cuello lateral sino de la Su.h y/o Su.d para establecer posibles asociaciones con $\alpha_3\beta_3$.

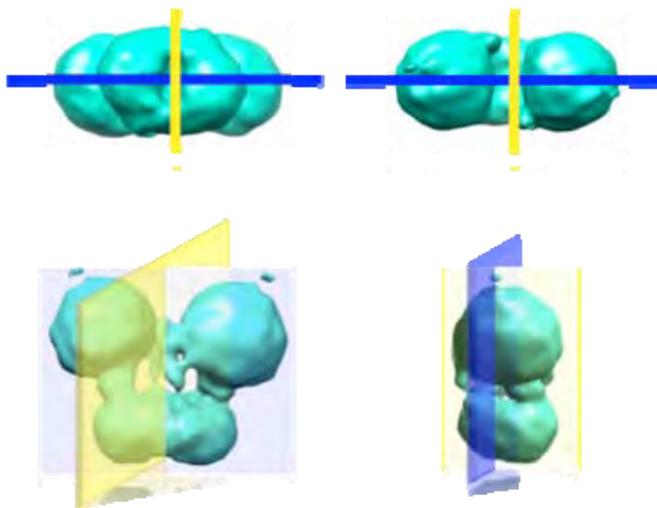


Figura 27. El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae* presenta dos ejes axiales de simetría. Los monómeros de la enzima se localizan uno especularmente del otro, posicionando a sus cuellos periféricos aledaños a la interfase de la asociación de los sectores F_0 's (interdimérica). La vista inferior, superior, y lateral a 0° y a 90° , permiten describir dos ejes axiales de simetría.

En los dos modelos 3D del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*, los monómeros de la enzima se localizan especularmente uno respecto al otro describiéndose la presencia de dos ejes axiales de simetría [Figura 27]. Los cuellos periféricos de ambos monómeros se encuentran aledaños a la interfase de asociación de los dos sectores F_0 (formada por las Su.e, Su.g y Su.6) en la estructura dimérica, mientras que las anillos de Su.9 se encuentran en las partes distales de dicha asociación membranal [Figura 28].

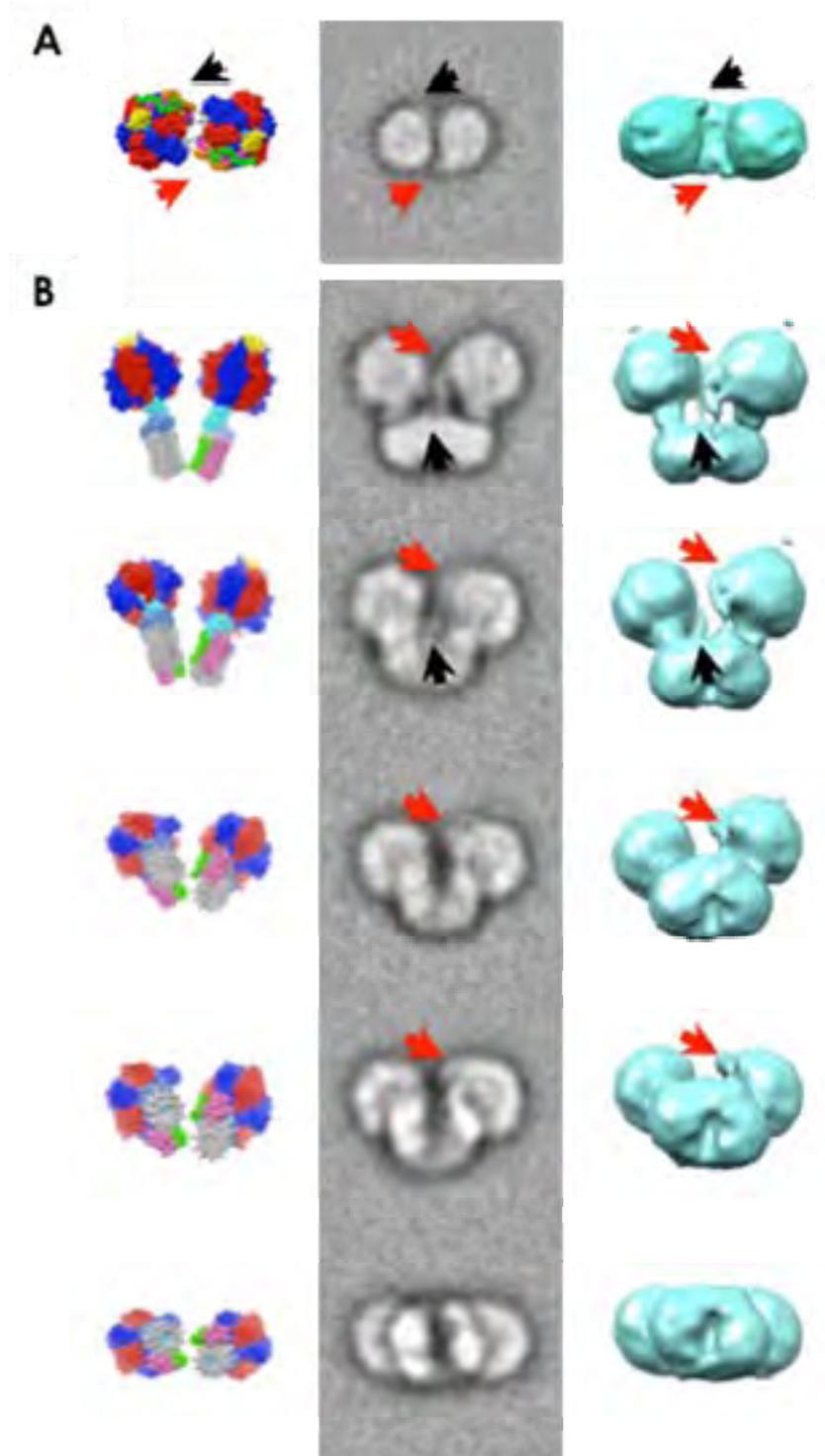


Figura 28. Disposición de subunidades en el sector F_0 y de los cuellos periféricos del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae*. Las imágenes de familias representativas obtenidas bajo ME [Figura 21] (centro), de la *referencia estructural* generada con o sin la presencia de los segmentos d^{3-123} - F_6^{5-70} - b^{79-183} (izquierda) y del correspondiente modelo 3D generado para el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de W303-1A (derecha), son mostradas en vista superior (A) o girados perpendicularmente (B) explicando la posición de los anillos de Su.9 y los segundos dominios de los sectores F_0 's; y del cuello periférico en primer o segundo plano (flechas rojas y negras, respectivamente). Las claves de las esferas de las *referencias estructurales* se describen en la Figura 22.

Con base en:(1) la observación bidimensional de los cuellos periféricos, los anillos de Su.9 y de los segundos dominios de los sectores F_0 's [**Figuras 19 y 20**],y (2) nuestros modelos diméricos tridimensionales [**Figura 23**]; y considerando (3) las observaciones en MFA de los anillos de Su.9 insertos en la MIC de *S. cerevisiae* (Buzhynskyy y cols, 2007), (4) la RT del dímero de hígado de rata y bovino (Strauss y cols, 2008), y (5) las variaciones de las distancias entre las F_1 's de los oligómeros en PSM's de levadura (Thomas y cols, 2008):

Proponemos la dinámica intrínseca del segundo dominio del sector F_0 y del cuello periférico como un sólo ensamblaje continuo dentro de los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa, lo que conlleva, a la existencia de una sólo formación dimérica que fluctúa entre conformaciones abiertas y cerradas.

La dinámica aleatoria del dímero de la enzima la hemos refutado mediante corrimientos de los solubilizados mitocondriales con digitonina empleando la metodología del GraFix diseñado por Kastner y cols (2008) y modificando nuestros propios métodos de enriquecimiento (datos no incluidos).

La generación de datos por crioelectromicroscopía permitirán el modelaje 3D del dímero de la enzima con una mayor apertura (datos insuficientes), y mediante IEM usando como epítopes a las Su.e y Su.g (datos no incluidos) o por introducción de segmentos como la biotina a dichas subunidades, se podrá determinar su localización exacta.

CONCLUSIONES.

1. El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa se forma por la unión de dos monómeros en disposición especular uno respecto al otro, contando con dos ejes axiales de simetría.
2. Las vistas inferiores de las imágenes bidimensionales de las estructuras diméricas de la F_1F_0 -ATP sintasa muestran la disposición del anillo de 10 subunidades σ y del conglomerado de los dominios transmembranales de las otras subunidades que conforma el segundo dominio del sector F_0 de cada monómero.
3. De acuerdo con nuestro modelo tridimensional, los cuellos periféricos en el dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *S. cerevisiae* con ángulo de 40° se localizan aledaños al centro de la asociación de los dos sectores F_0 's.
4. Proponemos la dinámica intrínseca del cuello periférico y del segundo dominio del sector F_0 como un ensamblaje continuo, lo que conlleva a la existencia de una sola formación dimérica que fluctúa entre conformaciones abiertas y cerradas modificando sus distancias entre F_1 's y la disposición de las subunidades en los sectores F_0 's.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales. La digitonina, marca Fluka, no se recristalizó para su utilización. Los reactivos para BN-PAGE y 2D-SDS-PAGE fueron adquiridos de BioRad. El azul de Coomassie es marca Serva. Todos los demás reactivos utilizados tienen grado analítico y se obtuvieron de Sigma.

Extracción de mitocondrias. La cepa silvestre W303-1A (Mat α ; leu2, trp1, ura3, his3, ade2) fue un generoso obsequio de la Dra. Rosemary Stuart (Department of Biological Science, Marquette University, Milwaukee, WI, USA). Las células se crecieron en un fermentador de 10 L usando YPD suplementado con adenina y uracilo: 80 mg / L y 20 mg/L, respectivamente. Las células se cosecharon durante el inicio de la fase exponencial de la segunda parte del crecimiento diáuxico a 2,668 X g/ 5 min/ 4°C, se lavaron con agua en dos ocasiones y se resuspendieron en buffer de extracción (Manitol 0.6 M, MES 5 mM / pH 6.8 TEA, BSA 1 g/L). La ruptura se realizó en un homogeneizador tipo Bead Beater con perlas de vidrio de 0.5 mm durante un total de 2 min manteniendo una temperatura menor a 14°C. La separación de las mitocondrias por centrifugación diferencial se realizó como se describe en Peña y cols(1977): el homogenizado inicial se sometió a 500 X g/ 5 min/ 4°C y el sobrenadante resultante a 7,100 X g / 10 min / 4°C, el precipitado consecutivo se resuspendió en el buffer de extracción y se centrifugó a 2,400 X g / 5 min / 4°C y el nuevo sobrenadante a 11,300 X g/10 min / 4°C, las mitocondrias se resuspendieron en el mismo buffer y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Solubilización del dímero de la F₁F₀-ATP sintasa. Las mitocondrias fueron diluidas a 15 mg / mL en buffer de solubilización (EACA 750 mM, Bis-Tris50 mM, pH 7) y se extrajeron usando la cantidad de digitonina indicada (Stock en DMSO). Las muestras fueron centrifugadas a 88,000 X g/ 45 min / 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. La concentración de proteína se determinó por

el ensayo de Lowry-TCA (Peterson, 1977) para eliminar la interferencia causada por los componentes del medio de extracción.

Revelado de actividad ATPasa en geles nativos. El BN-PAGE se realizó de acuerdo a Schagger y Von Jagow (1991). Se cargaron 80 μ g ó 90 μ g por carril del solubilizado con digitonina (montados en minigeles) y fueron corridos a 7 mA durante 4h a 4°C. El gel fue incubado toda la noche en medio de actividad (Glicina 50 mM, ATP 10 mM, MgCl₂ 10 mM, (CH₃COO)₂Pb 0.15%, pH 8.5). Un tratamiento similar se realizó utilizando las fracciones obtenidas del gradiente donde 40 μ L de la muestra se mezclaron con 10 μ L del buffer SC (buffer de solubilización adicionado con 0.2 mg de azul de Coomassie / mL).

Segunda dimensión desnaturalizante. La banda de interés, presente en el gel nativo, se cortó y se incubó en medio desnaturalizante (DTT 5 mM, SDS 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente. Se enjuagó en dos ocasiones con SDS 0.1% durante 15 min cada una, la banda se polimerizó en el gel concentrador Laemmli al 4% mientras que el separador se preparó al 15% de acrilamida. El gel resultante se fijó con tinción de azul de Coomassie.

Réplica de Western. Para observar la Su.e y Su.g se utilizaron 20 μ g de mitocondrias mientras que para Inh1, 60 μ g. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE 15% Von Jagow y se transfirieron a membrana de PDVF de 0.25 μ m en buffer de transferencia (CAPS 10 mM, Metanol 10%, pH 11) a 100 mA durante 2h a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas con leche 5%. Los anticuerpos anti-e y anti-g (generosos obsequios de la Dra. Rosemary Stuart) y anti-bIF₁ fueron usados a una dilución 1:1,500 y fueron observados por quimioluminiscencia y capturados en placas fotográficas o usando el escáner digital Typhoon.

Observación de las mitocondrias de *S. cerevisiae*. La preparación de las muestras se realizó como se describe en Bauer y cols(2001). Las cepas crecidas

en placas de YPD fueron lavadas con PBS frío (pH 7.2) y resuspendidas en el medio de fijación (Glutaraldehído 2%, Cacodilato 100 mM/ pH 7.2, CaCl_2 1 mM) durante 30 min a 4°C. Se lavaron con buffer cacodilato (0.1 mM) antes y después de someter al medio enzimático (Tris 50 mM / pH 7.5, MgCl_2 5 mM, Sorbitol 1.4 M, 2-mercaptoetanol 0.5 %, Zimoliasa 20T 0.15 mg / mL). Las muestras fueron incubadas toda la noche con OsO_4 0.5%. El montaje en agarosa 2.5% se tiñó con acetato de uranilo al 1%, se deshidrató progresivamente con etanol(50% - 100%) y se infiltró en Epon. Los ultramicrocortes se observaron usando un microscopio electrónico JEOL. Éstos estudios fueron realizados en el laboratorio del Dr. Alfonso Cárabez Trejo en el Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México.

Enriquecimiento en Gradientes de Glicerol. 4 mg del solubilizado de mitocondrias con digitonina se cargaron en un gradiente discontinuo de glicerol (Glicerol 15% - 40%, MES 2 mM pH 7, EDTA 2 mM, ADP 2 mM, digitonina 2.5 mM) y se centrifugaron a 120,000 X g / 16h / 4°C. Fraccionándose de la parte inferior a la superior en alícuotas aproximadas de 500 μL , las muestras se sometieron a BN-PAGE y se revelaron por actividad de ATPasa.

Tinción negativa para dímeros aislados. Las muestras fueron diluidas 10X (MES 2 mM, EDTA 2 mM, ADP 2 mM, pH 7) y fueron aplicadas en las gradillas de cobre con cubierta de carbono ionizada: se lavaron en una ocasión con agua, fueron teñidas con acetato de uranilo al 1% por 1 min y secadas al aire. Las gradillas fueron observadas en microscopio electrónico de transmisión JEM-2100 (JEOL) operado a 200 KV. Las imágenes fueron grabadas en modo de baja dosis con la cámara CCD de 4096X4096 pixeles (TVIPS F415MP) en montaje de 6X6 a una magnificación óptica electrónica de 40,000X. La medida de pixeles fue calibrada para ser 2.84Å.

Análisis de imágenes. Las partículas fueron seleccionadas manualmente de los campos CCD usando el BOXER (192X192 pixeles) del programa EMAN (Ludtke

y cols, 1999). Las imágenes fueron filtradas a 0.05 \AA^{-1} en ctfit: todo el análisis subsecuente se realizó en el programa IMAGIC-5 (Van Heel y cols, 1996) corriendo en la estación de trabajo Octane. Las imágenes fueron normalizadas y filtradas para remover bajas o altas frecuencias espaciales y una máscara circular fue aplicada. Los datos fueron analizados por el procedimiento de alineamiento por clasificación obteniendo una serie inicial de referencias que fueron usadas en el primer paso del alineamiento por multireferencia, el cual se repitió hasta que ninguna mejoría se observó en las sumas de clases.

Reconstrucción tridimensional. El tratamiento se realizó como se describe en Zhang y cols (2008). Para iniciar la reconstrucción tridimensional, proyecciones de la *referencia estructural* propuesta [por empalme de dos monómeros en 40° obtenidos con o sin la presencia de d-F6-b obtenidas de F₁-C₁₀ (1qo1) de *S. cerevisiae*; OSCP¹⁻¹²⁰ (2bo5) y d³⁻¹²³-F6⁵⁻⁷⁰-b⁷⁹⁻¹⁸³ (2cly) de *B. taurus*; y 2 Su.b¹⁻³⁴ (1b9u) y Su.a⁹⁵⁻²⁶⁵ (1c17:M) de *E. coli*] fueron usadas como referencias para alinear el conjunto de 9,960 imágenes del dímero de la F₁F₀-ATP sintasa de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. El modelo resultante fue filtrado para remover el ruido (densidad que no corresponde al volumen principal del modelo). Las proyecciones fueron normalizadas para ser usadas en un nuevo alineamiento por multireferencia. Las imágenes alineadas fueron promediadas y usadas como proyecciones de entrada para un nuevo modelo 3D. Este proceso fue repetitivo incrementando el número de proyecciones y las imágenes promediadas para cada referencia hasta que no se observó mejoría. El modelo final fue filtrado a 0.05 \AA^{-1} , correspondiendo al primer cero en la función de transferencia de contraste. La serie de algoritmos anteriores, fue realizada en su totalidad por el Dr. Stephan Wilkens (SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, U.S.A.)

La áreas de los modelos 3D finales fueron visualizadas usando el programa CHIMERA (Pettersen y cols, 2004).

REFERENCIAS.

Allen R.D, Schroeder C.C and Fok A.K. An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol* (1989) **108**: 2233 – 2240.

Allen R.D. Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma* (1995) **189**: 1 – 8.

Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart R.A and Schägger H. Yeast mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase exists as a dimer: Identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* (1998) **17**: 7170 – 7178.

Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart R.A and Schägger H. ATP synthase of yeast mitochondria: Isolation of subunit *j* and disruption of the ATP18 gene. *J Biol Chem* (1999) **274**: 36 – 40.

Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud M.F, Dautant A, Brèthes D and Velours J. The modulation in subunits *e* and *g* amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* (2004) **279**: 40392 – 40399.

Bauer C, Herzog V and Bauer M.F. Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Microsc Microanal* (2001) **7**: 530 – 534.

Belogradov G.I, Tomich J.M and Hatefi Y. Membrane topography and near neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits *e*, *f* and *g*. *J Biol Chem* (1996) **271**: 20340 – 20345

Bisetto E, Picotti P, Giorgio V, Alverdi V, Mavelli I and Lippe G. Functional and stoichiometric analysis of subunit *e* in bovine heart mitochondrial F_0F_1 ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* (2008) **40**: 257 – 267.

Boekema E.J and Braun H.P. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* (2007) **282**: 1 – 4.

Bornhövd C, Vogel F, Neupert W and Reichert A.S. Mitochondrial membrane potential is dependent of the oligomeric state of F_1F_0 -ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem* (2006) **281**: 13990 – 13998.

Buzhynskyy N, Sens P, Prima V, Sturgis J.N and Scheuring S. Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes. *Biophys J* (2007) **93**: 2870 – 2876.

Cabezón E, Arechaga I, Butler P.J.G and Walker J.E. Dimerization of bovine F_1 -ATPase by binding the inhibitory protein, IF₁. *J Biol Chem* (2000) **275**: 28353 – 28355.

Cabezón E, Butler P.J.G, Runswick M.J, Carbajo R.J and Walker J.E. Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem* (2002) **277**: 41334 – 41341.

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

Devenish R.J, Prescott M, Roucou X and Nagley P. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta* (2000) **1458**: 428 – 442.

Dienhart M, Pfeiffer K, Schägger H and Stuart R.A. Formation of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem* (2002) **277**: 39289 – 39295.

Domínguez-Ramírez L, Mendoza-Hernández G, Cárabez-Trejo A, Gómez-Puyou A and Tuena de Gómez-Puyou M. Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F₁-Inhibitor protein complexes. *FEBS Lett* (2001) **507**: 191 – 194.

Domínguez-Ramírez L, Gómez-Puyou A and Tuena de Gómez-Puyou M. A hinge of the endogeneous ATP synthase inhibitor protein: The link between inhibitory and anchoring domain. *Proteins* (2006) **65**: 999 – 1007.

Dudkina N.V, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema E.J and Braun H.P. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett* (2005) **579**: 5769 – 5772.

Dudkina N.V, Sunderhaus S, Braun H.P and Boekema E.J. Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* (2006) **580**: 3427 – 3432.

Duvezin-Caubet S, Rak M, Lefebvre-Legendre L, Tetaud E, Bonnefoy N and Di Rago J.P. A 'petite-obligate' mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: Functional mtDNA is lethal in cells lacking the δ subunit of mitochondrial F₁-ATPase. *J Biol Chem* (2006) **281**: 16305 – 16313.

Everard-Gigot V, Dunn C.D, Dolan B.M, Brunner S, Jensen R.E and Stuart R.A. Functional analysis of subunit e of the F₁F₀-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryotic cell* (2005) **4**: 346 – 355.

Feniouk B.A, Suzuki T and Yoshida M. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of F₁F₀-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1757**: 326 – 338.

Fernández-Moran H. Cell-membrane ultrastructure: Low temperature electron microscopy and X-ray diffracton studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulation* (1962) **26**: 1039 – 1065.

Frey T.G and Mannella C.A. The internal structure of mitochondria. Trends Biochem Sci (2000) **25**:319 – 324.

Frey T.G, Renken C.W and Perkins G.A. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. Biochim Biophys Acta (2002) **1555**: 196 – 203.

Fronzes R, Weimann T, Vaillier J, Velours J and Brethes D. The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of *e* and *g* subunits. Biochemistry (2006) **45**: 6715 – 6723.

García J.J, Morales-Ríos E, Cortés-Hernández P and Rodríguez-Zavala J.S. The inhibitory protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. Biochemistry (2006) **45**: 12695 – 12703.

Gavin P.D, Prescott M, Luff S.E and Devenish R.J. Cross-linking ATP synthase complexes *in vivo* eliminates mitochondrial cristae. J Cell Sci (2004) **117**: 2333 – 2343.

Gavin P.D, Prescott M and Devenish R.J. Yeast F₁F₀-ATP synthase complex interactions *in vivo* can occur in the absence of the dimer specific subunit *e*. J Bioenerg Biomembr (2005) **37**: 55 – 66.

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

Giraud M.F, Paumard P, Soubannier V, Vaillier J, Arselin G, Salin B, Schaeffer J, Brèthes D, Di Rago J.P and Velours J. Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?. Biochim Biophys Acta (2002) **1555**: 174 – 180.

Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT and Ernster L. Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor. Biochim Biophys Acta (1979) **547**: 252 – 257.

Hashimoto T, Yoshida Y and Tagawa K. Regulatory proteins of F₁F₀-ATPase: Role of ATPase inhibitor. J Bioenerg Biomembr (1990a) **22**: 27 – 38.

Hashimoto T, Yoshida Y and Tagawa K. Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F₁F₀-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. J Biochem (1990b) **108**: 17 – 20.

Heinemeyer J, Braun H.P, Boekema E.J and Kouril R. A structural model of the cytochrome *c* reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. J Biol Chem (2007) **282**: 12240 – 12248.

Kagawa Y and Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: X. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. J Biol Chem (1966) **241**: 2475 – 2482.

Kane V, Silvester J.A, Fearnley I.M, Leslie A.G.W and Walker J.E. On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. EMBO J (2006) **25**: 2911 – 2918.

Kastner B, Fischer N, Mariola M, Sander B, Dube P, Boehringer D, Hartmuth K, Deckert J, Hauer F, Wolf E, Uchtenhagen H, Urlaub H, Herzog F, Peters J.M, Poerschke D, Lührmann R and Stark H. GraFix: Sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat Methods* (2008) **5**: 53 – 55.

Krause F, Reifschneider N.H, Goto S and Dencher N.A. Active oligomeric ATP synthase in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **329**: 583 – 590.

Lau W.C, Baker L.A and Rubinstein J.L. Cryo-EM structure of the yeast synthase. *J Mol Biol* (2008) **382**: 1256 – 1264.

Lefebvre-Legendre L, Salin B, Schaëffer J, Brèthes D, Dautant A, Ackerman S.H and Di Rago J.P. Failure to assemble the $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of the ATP synthase leads to accumulation of the α and β subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* (2005) **280**: 18386 – 18392.

Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta Edición. Editorial Omega (2006).

Ludtke S.J, Baldwin P.R, and Chiu W. EMAN: Semiautomated software for high resolution single particle reconstructions. *J Struct Biol* (1999) **128**: 82 – 97.

Mannella C.A. Introduction: Our changing view of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* (2000) **32**: 1 – 4.

Mannella C.A, Pfeiffer D.R, Bradshaw P.C, Moraru I.I, Slepchenko B, Loew L.M, Hsieh C, Buttle K and Marko M. Topology of the mitochondrial inner membrane: Dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* (2001) **52**: 93 – 100.

Mannella C.A. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1762**: 140 – 147.

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

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* (1961) **191**: 144 – 148.

Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller D.M, Brèthes D, Di Rago J.P and Velours J. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* (2002) **21**: 221 – 230.

Peña A, Piña M.Z, Escamilla E and Piña E. A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett* (1977) **80**: 209 – 213.

Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more applicable. *Anal Biochem* (1977) **83**: 346 – 356.

Pettersen E.F, Goddard T.D, Huang C.C, Couch G.S, Greenblatt D.M, Meng E.C and Ferrin T.E. UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* (2004) **24**: 1605 – 1612.

Rubinstein J.L, Walker J.E and Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J* (2003) **22**: 6182 – 6192.

Rubinstein J.L, Kane V, Runswick M.J and Walker J.E. ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: Location of subunit *h* in the peripheral stalk region. *J Mol Biol* (2005) **345**: 513 – 520.

Saddar S, Dienhart M.K and Stuart R.A. The F_1F_0 -ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome bc_1 -cytochrome oxidase supercomplexes and its association with TIM23 machinery. *J Biol Chem* (2008) **283**: 6677 – 6686.

Sambongi Y, Iko Y, Tanabe M, Omote H, Iwamoto-Kihara A, Ueda I, Yanagida T, Wada Y and Futai M. Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): Direct observation. *Science* (1999) **286**: 1722 – 1724.

Schägger H and Von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* (1991) **199**: 223 – 231.

Schägger H, Cramer W.A and Von Jagow G. 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* (1994) **217**: 220 – 230.

Schwaßmann H.J., Rexroth S, Seelert H and Dencher N.A. Metabolic controls dimerization of the chloroplast F_0F_1 -ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* (2007) **581**: 1391 – 1396.

Soubannier V, Vaillier J, Paumard P, Couлары B, Schaeffer J and Velours J. In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(*b*), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J Biol Chem* (2002) **277**: 10739 – 10745.

Spannagel C, Vaillier J, Arselin G, Graves P.V, Grandier-Vazeille X and Velours J. 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* (1998) **1414**: 260 – 264.

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

Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie A.G.W and Walker J.E. The rotatory mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* (2000) **10**: 672 – 679.

Strauss M, Hofhaus G, Schröder R.R and Kühlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* (2008) **27**: 1154 – 1160.

Thomas D, Bron P, Weimann T, Dautant A, Giraud M.F, Paumard P, Salin B, Cavalier A, Velours J and Brèthes D. Supramolecular organization of the yeast F_1F_0 -ATP synthase. *Biol Cell* (2008) **100**: 591 – 601.

Van Heel M, Harauz G and Orlova E.V. A new generation of the IMAGIC image processing system. *J Struct Biol* (1996) **116**: 17 – 24.

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

Velours J and Arselin G. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* (2000) **32**: 383 – 390.

Velours J, Paumard P, Soubannier V, Spannagel C, Vaillier J, Arselin G and Graves P.V. Organisation of the yeast ATP synthase F_0 : A study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. *Biochim Biophys Acta* (2000) **1458**: 443 – 456.

Vogel F, Bornhövd C, Neupert W and Reichert A.S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* (2006) **175**: 237 – 247.

Vonck J and Schäfer E. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* (2009) **1793**: 117 – 124.

Walker J.E and Kane V. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1757**: 286 – 296.

Weimann T, Vaillier J, Salin B and Velours J. The intermembrane space loop of subunit *b*(4) is a major determinant of the stability of yeast oligomeric ATP synthases. *Biochemistry* (2008) **47**: 3556 – 3563.

Wilkens S and Capaldi R.A. ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* (1998) **373**: 29.

Wilkens S. F_1F_0 -ATP synthase – stalking mind and imagination. *J Bioenerg Biomembr* (2000) **32**: 333 – 339.

Wilkens S, Zhou J, Nakayama R, Dunn S.D and Capaldi R.A. Localization of the δ subunit in the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase by immuno electron microscopy: The δ subunit binds on top of the F₁. J Mol Biol (2000) **295**: 387 – 391.

Wittig I, Carrozzo R, Santorelli F.M and Schagger H. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochim Biophys Acta (2006) **1757**: 1066 – 1072.

Wittig I and Schagger H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. Biochim Biophys Acta (2008) **1777**: 592 – 598.

Wittig I, Velours J, Stuart R and Schagger H. Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. Mol Cell Proteomics (2008) **7**: 995 – 1004.

Zanotti F, Raho G, Gaballo A and Papa S. Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF₁ of bovine heart mitochondrial ATP synthase. J Bioenerg Biomembr (2004) **36**: 447 – 457.

Zhang Z, Zheng Y, Mazon H, Milgrom E, Kitagawa N, Kish-Trier E, Heck A.J.R, Kane P.M and Wilkens S. Structure of the yeast vacuolar ATPase. J Biol Chem (2008) **283**: 35983 – 35995.