

# F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP SINTASA Y SUS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES\*

Araceli Cano-Estrada y Diego González-Halphen

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Correo E: ecano@email.ifc.unam.mx

## RESUMEN

La estructura de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa o F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa es muy importante para entender su funcionamiento, por lo que ha sido de gran interés estudiar las subunidades que la componen, la interacción entre ellas y su función dentro de la enzima. La estructura de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa varía de una especie a otra, encontrándose subunidades específicas de cada especie y siendo más compleja la estructura en los organismos más evolucionados; además estudios recientes han demostrado la presencia de subunidades novedosas dentro de la estructura de la ATP sintasa de algunas especies como las algas clorofíceas, el parásito *Trypanosoma brucei* y protistas como *Tetrahymena thermophila*. En este trabajo se pretende hacer una comparación de las subunidades que forman la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de diferentes especies, haciendo hincapié en sus diferencias estructurales.

## ABSTRACT

The structure of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase or ATP synthase plays an important role in understanding its function. It has been of interest to study the subunits, how they interact between them and what is their function in the enzyme. Many subunits have been conserved through out evolution, counterparts of them are found in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of different organisms, yet the number of subunits forming the enzyme complex varies from one species to another. Also there seem to be specific subunits in several species, and in general, the structure is more complex in eukaryotic organisms. Recent studies have demonstrated the presence of novel subunits that form part of the ATP synthase in chlorophyte algae species, in parasites like *Trypanosoma brucei*, and in protists like *Tetrahymena thermophila*. This paper seeks to make a comparison of the subunits that form the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from different species, stressing their structural differences.

La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa es un complejo enzimático encargado de proveer a la célula la energía necesaria para realizar todos sus procesos vitales mediante la síntesis de ATP, aunque también puede llevar a cabo la hidrólisis de éste, por lo que al complejo también se le nombra F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. El nombre se debe a que las subunidades pueden separarse en dos dominios estructurales llamados F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub> (1). El dominio F<sub>1</sub> está compuesto por subunidades solubles y es el dominio catalítico de la enzima, mientras que el F<sub>0</sub> es el dominio membranar. Ambos dominios están unidos por un tallo central y por un tallo periférico.

La síntesis de ATP está acoplada a un gradiente de potencial electroquímico de protones, que es generado por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria durante la oxidación de sustratos. Cuando los protones atraviesan la membrana por un conducto formado en el dominio F<sub>0</sub> (entre las subunidades *a* y *c*) provocan un giro de un anillo de proteolípidos formado por la subunidad *c* (Fig. 1). Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades *γ* y *ε*) en movimientos de 120°, provocando cambios conformacionales consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades *α* y *β*) e induciendo la unión de sustratos

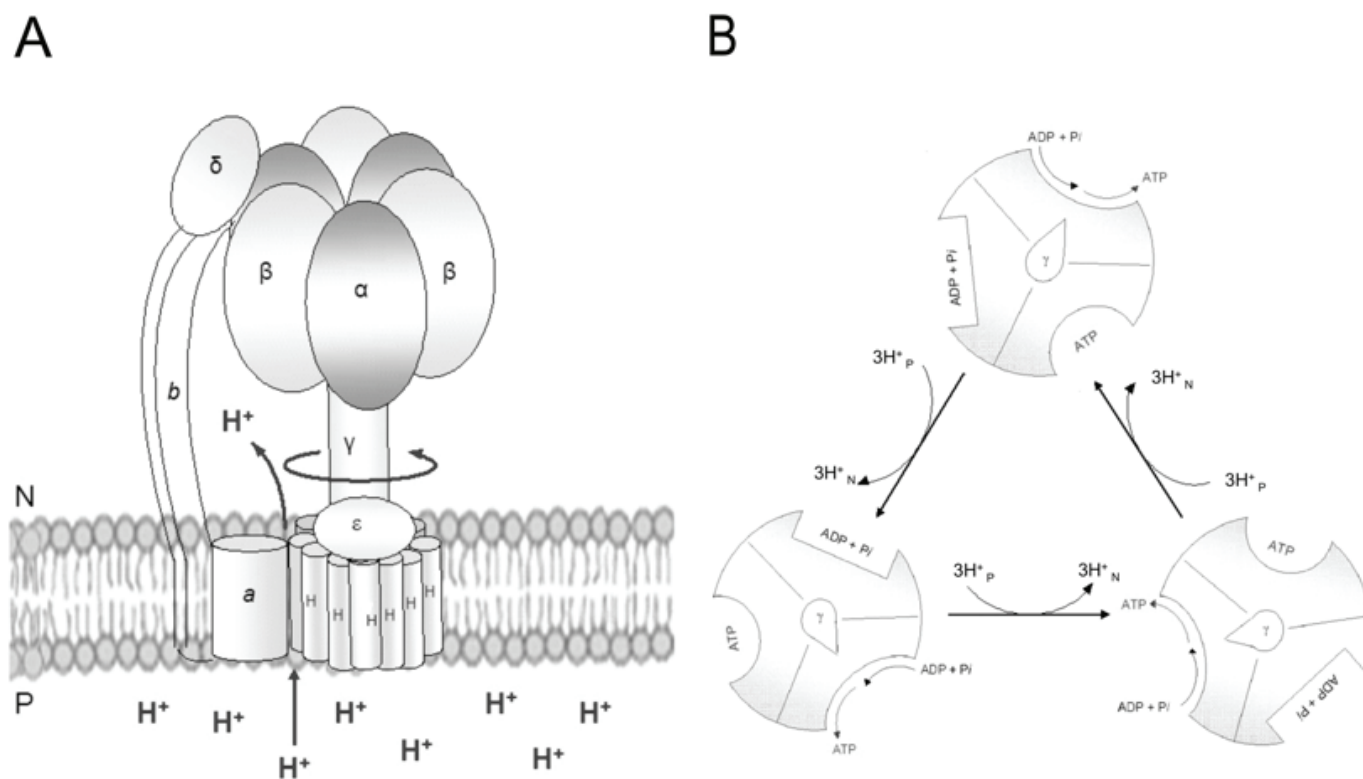
## PALABRAS

### CLAVE:

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa, estructura, subunidades, homología.

### KEY WORDS:

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, structure, subunits, homology.



**Figura 1.** El mecanismo catalítico de la ATP sintasa. (A) Los protones atraviesan la membrana del lado P hacia el lado N a favor de su gradiente electroquímico, por un conducto formado entre las subunidades a y c, provocando un giro de 120° en la subunidad  $\gamma$ , que a su vez produce cambios conformacionales en las subunidades catalíticas. (B) Las tres subunidades catalíticas  $\beta$  adquieren conformaciones diferentes durante la síntesis de ATP: abierta, semiabierta y cerrada. Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP, y a su vez se captan las moléculas de ADP y fosfato (2). Con estos sustratos, la subunidad  $\beta$  cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la reacción de formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades  $\beta$  de la ATP sintasa.

(ADP + Pi), la síntesis de ATP y su liberación (2).

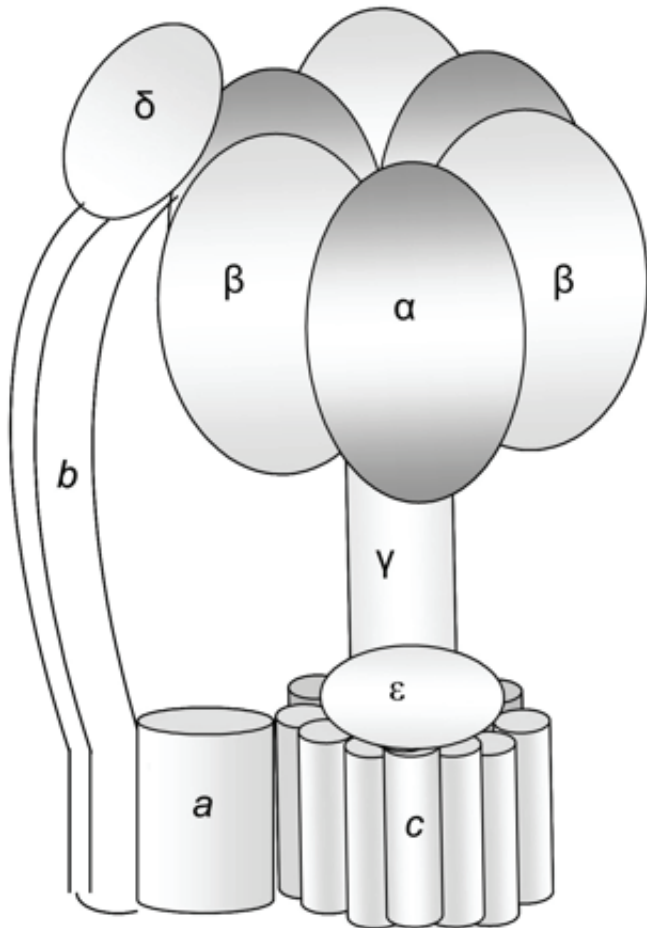
A la ATP sintasa se le representa como un motor molecular debido a su mecanismo catalítico, y por lo tanto consta de un rotor y de un estator. El rotor está compuesto por el tallo central de la enzima y el anillo de proteolípidos. Estas subunidades están involucradas en el movimiento de la enzima durante la catálisis, mientras que el estator lo forman las subunidades del tallo periférico, las cuales se mantienen estáticas durante la síntesis de ATP y a su vez mantienen fijas a las subunidades catalíticas (3).

Existe evidencia de que la ATP sintasa mitocondrial, dentro de su ambiente fisiológico, forma oligómeros. Se ha propuesto que este arreglo de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa induce la curvatura de las crestas mitocondriales, favoreciendo así la formación del gradiente electroquímico de protones (4). La ATP sintasa es una enzima altamente conservada, sobre todo en aquellas subunidades involucradas

en la catálisis; sin embargo, existen subunidades específicas según la especie. En este trabajo se presentan las diferentes subunidades que forman parte de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de las especies más estudiadas, haciendo una comparación entre ellas, señalando aquellas que están altamente conservadas y aquellas que son específicas de cada especie.

## LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias tienen la estructura más simple de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa; cuentan con las subunidades mínimas indispensables para que la enzima lleve a cabo la síntesis de ATP. El complejo más estudiado es el de la bacteria *Escherichia coli*. La enzima está compuesta por 8 diferentes subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , a, b y c (ver Tabla 1). El sector membranal F<sub>0</sub> está compuesto por las subunidades a, b, c, mientras que el sector hidrofílico F<sub>1</sub> lo componen las



**Figura 2.** La estructura de la ATP sintasa bacteriana. La componen las subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales forman un hetero hexámero soluble en el dominio  $F_1$  de la enzima. El tallo central, compuesto por las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ , interactúa con el anillo de subunidades  $c$ ; formando el rotor de la enzima. El estator está compuesto por un dímero de subunidades  $b$  que se unen al dominio  $F_0$  por la interacción con la subunidad  $a$  y al dominio  $F_1$  por la interacción con la subunidad  $\delta$ .

subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Fig. 2). Las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  son las subunidades catalíticas. La enzima posee tres subunidades  $a$  y tres subunidades  $\beta$  que interactúan alternadamente entre sí formando un hetero hexámero (Fig. 2).

La estructura cristalográfica del dominio  $F_1$ , en ausencia de la subunidad  $\delta$ , fue resuelta para la enzima de *E. coli* (5). Sus coordenadas atómicas fueron registrada en el PDB, por las siglas en inglés de Banco de Datos de Proteínas, con la clave de acceso: 1jnv. En esta conformación se observa que la subunidad  $\gamma$  penetra en la cavidad del hetero hexámero y tiene una estructura formada por hélices entrecruzadas. Se extiende 45 Å desde la base de las subunidades catalíticas hasta la superficie

de la membrana, donde entra en contacto con las subunidades  $\epsilon$  y  $c$  por medio de un dominio globular (6). Al conjunto de subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $c$  se le conoce como el rotor de la enzima. Se ha propuesto que la subunidad  $\epsilon$  es la proteína reguladora de la síntesis o hidrólisis del ATP en el complejo bacteriano, actuando como una palanca que controla la dirección de la rotación en respuesta a la concentración de nucleótidos o a la presencia del gradiente electroquímico de protones (7). El extremo carboxilo terminal (C-terminal) de la subunidad  $\epsilon$  tiene cambios conformacionales e interactúa simultáneamente con la subunidad  $\beta$  en el dominio  $F_1$  y con la subunidad  $c$  en el dominio  $F_0$ .

La subunidad  $c$  es una proteína hidrofóbica compuesta por dos estructuras de  $\alpha$  hélices anti-paralelas conectadas por una asa hidrofílica (8). Este arreglo forma un anillo compuesto por un total de 10 subunidades  $c$  en la ATPasa de *E. coli*, según estudios de entrecruzamientos (9).

La subunidad  $\alpha$  también se encuentra embebida en la membrana. No se conoce su estructura, pero su secuencia de aminoácidos predice 6 posibles cruces transmembranales. Se une al dominio  $F_1$  por el brazo periférico o estator de la enzima formado por la subunidad  $\delta$  y un dímero de subunidades  $b$  ( $b_2$ ) (Fig. 2). El brazo periférico de la enzima fue observado por primera vez gracias a estudios de crio-microscopía electrónica de la enzima de *E. coli* (10). La subunidad  $b$  forma principalmente al brazo; su estructura es la de una única hélice alargada, de la cual el extremo amino terminal (N-terminal) se inserta en la membrana y el resto se define como un dominio citoplasmático que dimeriza formando una estructura de hélice enrollada y donde el extremo C-terminal interactúa con la subunidad  $\delta$ , formando el complejo  $\delta b_2$  (11). Sin embargo, los detalles moleculares de esta interacción todavía no se conocen. En la parte más alta del complejo se encuentra la subunidad  $\delta$ , que presenta una estructura de seis  $\alpha$ -hélices hidrofílicas. Interactúa por medio de su extremo N-terminal con los primeros 22 aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  (12), de acuerdo a estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) (PDB 1ABV).

## LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE LA LEVADURA Y LOS MAMÍFEROS

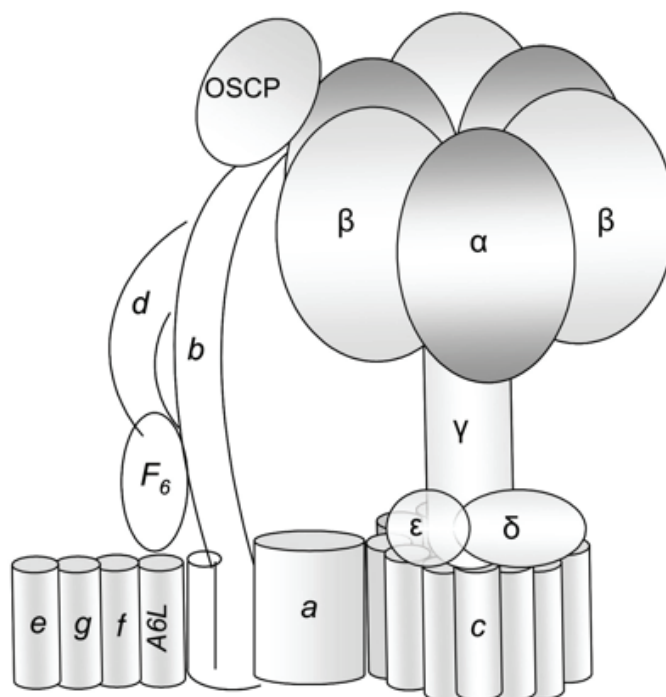
A diferencia de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa de las bacterias, el complejo enzimático de los eucariontes presenta una estructura más elaborada; sin embargo, conserva homólogos de las subunidades bacterianas (Tabla 1). Los complejos enzimáticos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de corazón de bovino han sido de los más estudiados.

La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa mitocondrial conserva las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $c$ ,  $a$  y cuenta con una subunidad  $\delta$ , que no presenta similitud con la  $\delta$  bacteriana, y que forma parte del tallo central de la enzima, interactuando con las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ , aunque la función que desempeñan estas subunidades dentro del complejo no es del todo clara. La proteína OSCP (proteína que confiere sensibilidad al inhibidor oligomicina) sustituye a la subunidad  $\delta$  en la parte más alta de la ATPasa mitocondrial. Presenta un plegamiento muy similar a su contraparte en bacterias, por lo que la interacción con la subunidad  $\alpha$  se conserva.

La estructura del tallo periférico es la que más difiere respecto a la enzima bacteriana (Tablas 1 y 2). El tallo periférico de la ATP sintasa mitocondrial está compuesto por una sola copia de las subunidades OSCP,  $b$ ,  $d$  y F<sub>6</sub> (Fig. 3), de acuerdo con experimentos de interacción *in vitro* con proteínas recombinantes de estas subunidades (13). La estructura del tallo periférico de la ATP sintasa de bovino fue resuelta a 2.8 Å (14) gracias a estudios de cristalografía (PDB 2CLY). En su conformación se observa que la subunidad  $b$ , conocida en *S. cerevisiae* como subunidad 4, es la principal formadora del tallo periférico y aunque su secuencia de aminoácidos no tiene una alta similitud con la secuencia de la subunidad  $b$  de las bacterias, las dos subunidades tienen una estructura muy parecida. Sin embargo, la región extrínseca de la proteína no dimeriza. Otra proteína que interactúa con la subunidad  $b$  formando parte del tallo periférico es la subunidad  $d$  (Fig. 3), con una estructura de cinco  $\alpha$ -hélices que no presentan ninguna región altamente hidrofóbica, por lo que no entran en contacto con la región membranal (14, 15). La subunidad homóloga en levadura es 16 aminoácidos más grande. La subunidad  $d$  interactúa con la subunidad  $b$  a través de tres  $\alpha$ -hélices entrecruzadas (14). F<sub>6</sub> es otra proteína que forma parte del brazo periférico (Fig. 3); su contraparte en *S. cerevisiae* es la subunidad  $h$ . Su conformación dentro del complejo es la de una proteína alargada donde una  $\alpha$ -hélice localizada en su extremo N-terminal se encuentra próxima a una  $\alpha$ -hélice en el extremo C-terminal de la subunidad OSCP, estabilizando la interacción entre la subunidad OSCP y la subunidad  $b$ , la cual es a través de  $\alpha$ -hélices.

Detalles moleculares de la interacción del tallo periférico con el dominio F<sub>1</sub> se observan en la estructura cristalográfica resuelta a 3.2 Å (15) (PDB 2WSS), aunque sólo algunas regiones de las subunidades que comprenden el tallo periférico pudieron ser resueltas.

Además de estas dos subunidades, la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de los eucariontes presenta las subunidades membranales  $e$ ,  $f$ ,  $g$  y A6L (Fig. 3). El homólogo de



**Figura 3.** La estructura de la ATP sintasa de los mamíferos. Es más compleja que la ATP sintasa bacteriana. Sin embargo, conserva las subunidades catalíticas, así como las subunidades que forman el rotor de la enzima. La mayor diferencia se encuentra en las subunidades que componen el estator de la enzima. Éste está compuesto por una subunidad  $b$ ,  $d$ , y F<sub>6</sub> y OSCP, ésta última es homóloga de la subunidad  $\delta$  en bacteria. Además, cuenta con subunidades membranales, llamadas supernumerarias, que se encargan de la dimerización de la enzima. La ATP sintasa de los mamíferos es muy parecida a la ATP sintasa de la levadura, excepto que ésta última cuenta con dos subunidades supernumerarias adicionales,  $k$  e  $i$ .

A6L en la levadura es la subunidad 8. El complejo enzimático de las levaduras también posee las subunidades  $i$  (algunas veces llamada subunidad  $j$ ) y  $k$  que también se anclan a la membrana (Fig. 3). Todas ellas son proteínas pequeñas, compuestas por 60 a 110 aminoácidos. La función de estas proteínas, denominadas supernumerarias, no es del todo clara; sin embargo, se ha demostrado que las subunidades A6L (o subunidad 8),  $f$ ,  $e$ ,  $i$  son necesarias para el ensamble del dominio F<sub>0</sub> y por lo tanto son indispensables para el funcionamiento de la enzima (16). Por otra parte, se ha probado que las subunidades  $e$  y  $g$  están involucradas en la dimerización de la enzima (17). El dominio GXXXG es importante para la dimerización y se localiza en la región membranal de la subunidad  $g$  (18). La subunidad  $k$  parece ser necesaria para la expresión de las subunidades  $g$  y  $e$  (19).



| TABLA1. SUBUNIDADES CONSERVADAS EN LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE DIFERENTES ESPECIES |                 |                      |                 |            |                      |                             |                 |                       |                   |                  |                 |                         |  |
|---|-----------------|----------------------|-----------------|------------|----------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------------|--|
| <i>E. coli</i>  |                 | <i>S. cerevisiae</i> |                 | Bovino     |                      | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                 | <i>C. reinhardtii</i> |                   | <i>T. brusei</i> |                 | <i>T. thermophila</i>   |  |
| Subunidad   | No. Acceso NCBI | Subunidad            | No. Acceso NCBI | Subunidad  | No. Acceso NCBI      | Subunidad                   | No. Acceso NCBI | Subunidad             | No. Acceso NCBI   | Subunidad        | No. Acceso NCBI | Subunidad               | No. Acceso NCBI                                |
| $\alpha$  | AAA24735        | $\alpha$             | P07251          | $\alpha$   | P19483               | $\alpha$                    | NP_085571       | $\alpha$              | EDP07337          | $\alpha$         | AAZ12804        | $\alpha$                | XP_001027692                                   |
| $\beta$   | AAA24737        | $\beta$              | P00830          | $\beta$    | P00829               | $\beta$                     | At5g08670/80/90 | $\beta$               | EDP04740          | $\beta$          | AAZ10173        | $\beta$                 | XP_001032631                                   |
| $\gamma$  | AAA24736        | $\gamma$             | P38077          | $\gamma$   | P05631               | $\gamma$                    | At2g330400      | $\gamma$              | ED097956          | $\gamma$         | EAN77450        | $\gamma$                | XP_001010761                                   |
| $\epsilon$  | AAA24738        | $\epsilon$           | P21306          | $\epsilon$ | P05632               | $\epsilon$                  | At1g51650       | $\epsilon$            | EDP06388          | $\epsilon$       | EAN77924        | -----                   | -----  |
| c   | AAA24732        | c                    | P61829          | c          | P32876/P07926/Q3ZC75 | c                           | NP_085561       | c                     | EDO97408/EDO97377 | c                | EAN77586        | c                       | NP_149381                                      |
| $\delta$  | AAA24734        | OSCP                 | P09457          | OSCP       | P13621               | OSCP                        | At5g13450       | OSCP                  | EDP01322          | OSCP             | EAN78209        | OSCP                    | XP_001025180                                   |
| a   | AAA24731        | a                    | P00854          | a          | P00847               | a                           | NP_085524       | a                     | EDP09230          | a                | AAA97428        | Ymf66                   | NP_149365                                      |
| b   | AAA24733        | Su 4                 | P05626          | b          | P13619               | Orf25                       | NP_085524       | -----                 | -----             | b                | AAZ11286        | putativas subunidades b | XP_001031468/<br>XP_001032687/<br>XP_001016306 |
| -----   | -----           | $\delta$             | Q12165          | $\delta$   | P05630               | $\delta$                    | At5g47030       | $\delta$              | EDO99236          | $\delta$         | AAZ12057        | $\delta$                | -----  |
| -----   | -----           | d                    | P30902          | d          | P13620               | d                           | At3g52300       | -----                 | -----             | -----            | -----           | putativa subunidad d    | XP_001013499                                   |
| -----   | -----           | h                    | Q12349          | F6         | P02721               | -----                       | -----           | -----                 | -----             | -----            | -----           | -----                   | -----  |
| -----   | -----           | Su 8                 | P00856          | A6L        | P03929               | orfB                        | NP_085508       | -----                 | -----             | -----            | -----           | -----                   | -----  |
| -----   | -----           | e                    | P81449          | e          | Q00361               | -----                       | -----           | -----                 | -----             | -----            | -----           | -----                   | -----  |
| -----   | -----           | f                    | Q06405          | f          | Q28851               | -----                       | -----           | -----                 | -----             | -----            | -----           | -----                   | -----  |
| -----   | -----           | g                    | Q12233          | g          | Q28852               | -----                       | -----           | -----                 | -----             | -----            | -----           | -----                   | -----  |
| -----   | -----           | Inh1                 | P01097          | IF1        | P01096               | -----                       | -----           | -----                 | -----             | -----            | -----           | -----                   | -----  |

| TABLA2. SUBUNIDADES NO CONSERVADAS DENTRO DE LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA DE DIFERENTES ESPECIES |                 |           |                 |                  |                 |                   |                 |                  |                 |                       |                 |
|---|-----------------|-----------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| <i>S. cerevisiae</i>  |                 | Bovino    |                 | Plantas          |                 | Algas clorofíceas |                 | <i>T. brusei</i> |                 | <i>T. thermophila</i> |                 |
| Subunidad   | No. Acceso NCBI | Subunidad | No. Acceso NCBI | Subunidad        | No. Acceso NCBI | Subunidad         | No. Acceso NCBI | Subunidad        | No. Acceso NCBI | Subunidad             | No. Acceso NCBI |
| i/j   | P81450          | Factor B  | P22027          | F <sub>A</sub> D | At2g21870       | ASA1              | EDP03873        | Tb927.5.2930     | AAZ11406        | 146185889             | XP_001032687    |
| k   | P81451          | MLQ       | PI4790          | -----            | -----           | ASA2              | EDP00850        | Tb11.02.4120     | EAN79587        | 229594811             | XP_001032843    |
| Stf1  | P01098          | AGP/DAPIT | Q3ZBI7          | -----            | -----           | ASA3              | EDO98373        | Tb10.6k15.0480   | EAN78377        | 146161614             | XP_001007749    |
| Stf2  | P16965/Q06177   | -----     | -----           | -----            | -----           | ASA4              | EDP08830        | Tb927.3.1690     | AAZ10204        | 118399953             | XP_001032300    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | ASA5              | EDP00370        | Tb11.47.0022     | EAN79106        | 118366175             | XP_001016306    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | ASA6              | EDP06853        | Tb927.7.840      | AAZ12149        | 118370910             | XP_001018655    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | ASA7              | EDP00858        | Tb11.03.0475     | EAN79040        | 229594147             | XP_001029413    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | ASA8              | EDP01930        | Tb927.2.3610     | AAQ15818        | 146180703             | XP_001021321    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | ASA9              | EDP02597        | Tb927.3.2880     | AAZ10322        | 118398278             | XP_001031468    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | -----             | -----           | Tb927.3.2180     | AAZ10253        | 118398135             | XP_001031397    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | -----             | -----           | Tb927.5.3090     | AAZ11422        | 146184052             | XP_001027673    |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | -----             | -----           | Tb927.4.3450     | AAZ10936        | -----                 | -----           |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | -----             | -----           | Tb927.8.3320     | AAZ13097        | -----                 | -----           |
| -----   | -----           | -----     | -----           | -----            | -----           | -----             | -----           | Tb10.70.7760     | EAN77482        | -----                 | -----           |

Debido a su complejidad, la ATP sintasa mitocondrial cuenta con una subunidad adicional que se encarga de regular su actividad enzimática. En los mamíferos se le conoce como IF<sub>1</sub> y en la levadura como Inh1 (Tabla 1). El sitio responsable de la inhibición lo forman 6 aminoácidos, Phe17, Arg20, Glu21, Arg22, Glu25 y Phe28; esta región se une a la subunidad β formando el complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> (PDB 1OHH) (20). En la levadura, la proteína inhibidora se estabiliza con otras dos proteínas llamadas Stf1 y Stf2, por las siglas en inglés de factores de estabilización (Tabla 2), las cuales incrementan la acción inhibitoria sobre la ATP sintasa (21).

Recientemente se ha descrito la presencia de tres proteínas asociadas a la ATP sintasa de los mamíferos, que no son componentes del dominio catalítico ni del estator de la enzima, y se les ha denominado factor B, MLQ y AGP o también llamada DAPIT, por las siglas en inglés de proteína asociada con la diabetes en los tejidos sensibles a la insulina (Tabla 2). El factor B es importante para mantener el gradiente de potencial electroquímico de la membrana mitocondrial, ya que la carencia de este factor resulta en un desacoplamiento (22). El papel que desempeñan las otras dos proteínas aún no es claro, aunque podrían estar involucradas en el metabolismo energético celular, o bien en la organización supramolecular de complejos de la fosforilación oxidativa, en especial de los oligómeros de la ATP sintasa mitocondrial.

## LA ATP SINTASA DE LAS PLANTAS

En comparación con la estructura de la ATP sintasa de los mamíferos o la levadura, que han sido muy estudiadas, poco se sabe de la estructura de la ATP sintasa de las plantas. Se ha purificado el complejo enzimático de especies como papa, espinaca y *Arabidopsis thaliana*, identificando sus distintos componentes. El dominio F<sub>1</sub> de la enzima de las plantas se encuentra altamente conservado y está formado por las subunidades catalíticas α y β, así como las subunidades γ, δ y ε (Tabla 1). Las subunidades α, β y γ presentan una similitud alta con sus contrapartes en las bacterias y los mamíferos; por el contrario, las subunidades δ y ε tienen una similitud menor con sus contrapartes en bovino, aunque sus estructuras sean muy parecidas. Los genes que codifican para la subunidad a y c, las cuales forman parte de dominio F<sub>0</sub>, se han encontrado en el genoma de varias especies de plantas, incluyendo a *A. thaliana* (23, 24). También están presentes los genes que codifican para ortólogos de la subunidad OSCP y la subunidad d, componentes del tallo periférico. A la subunidad OSCP también se le denomina subunidad δ' debido a su similitud

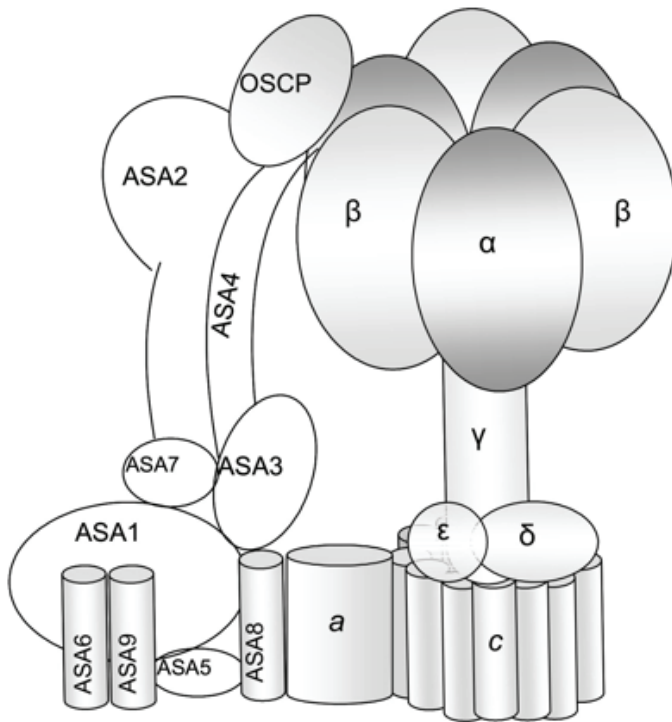
con la subunidad δ de las bacterias y los cloroplastos. Sin embargo, poco se conoce del resto de los componentes del dominio F<sub>0</sub> y del estator de las plantas, debido a la baja similitud que presentan las subunidades asociadas a estos dominios.

Otras subunidades que fueron identificadas como constituyentes de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de las plantas son las proteínas orfB, orf25 y FAd (24, 25) (Tabla 2). Aunque la similitud de la subunidad orfB con la subunidad A6L de los mamíferos o la subunidad 8 de la levadura es baja, se han propuesto que son homólogos. Por otra parte, estudios bioquímicos demostraron que orfB es parte del dominio F<sub>0</sub> de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de plantas e interactúan con la subunidad c y la subunidad orf25, lo cual apoya la hipótesis (24). La proteína orf25 es una proteína hidrofóbica y su gen se ha encontrado en los genomas de diferentes especies de plantas (26). Se ha propuesto que esta subunidad es la contraparte de la subunidad b de las bacterias, las levaduras y los mamíferos, debido a que ambas presentan la misma masa molecular y su extremo N-terminal es hidrofóbico. Sin embargo, a nivel de secuencia de aminoácidos la similitud entre estas subunidades es muy baja, aunque la subunidad b de los eucariontes y la subunidad b de las bacterias tampoco presentan una alta similitud. Parecería que más que una secuencia de aminoácidos conservada, lo esencial es la presencia de una estructura α-helicoidal alargada. La proteína F<sub>A</sub>d es de carácter hidrofílico y hasta el momento no se ha encontrado un homólogo de esta subunidad, por lo que representaría un nuevo componente del estator en la ATP sintasa de plantas.

## LAS ATP SINTASAS CON SUBUNIDADES ATÍPICAS

### *La ATP sintasa de las algas clorofíceas*

Las algas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. forman parte del linaje de las algas clorofíceas o algas verdes y son las más estudiadas. Estudios bioquímicos de la ATP sintasa de estas algas demostraron una composición de subunidades atípica. Se identificaron 17 polipéptidos que forman parte de la enzima (Fig. 4), de las cuales se encontraron homólogos de las subunidades α, β, γ, δ, OSCP, a y c (Tabla 1). Aunque las subunidades catalíticas presentan una alta similitud con el resto de las ATP sintasas, éstas presentan extensiones de aminoácidos. La extensión de la subunidad α consta de aproximadamente 20 aminoácidos y se localiza en el extremo N-terminal (27) mientras que la extensión de la subunidad β está compuesta por aproximadamente 60 aminoácidos y se localiza en el extremo C-terminal (28). No es clara la función



**Figura 4.** La estructura de la ATP sintasa de las algas clorofíceas. La ATP sintasa de algas clorofíceas está altamente conservada. Sin embargo, cuenta con nueve subunidades novedosas llamadas ASA, que no presentan homología con las proteínas que se muestran en las bases de datos. Estas subunidades sustituyen a las subunidades clásicas que forman el estator de la enzima. Se propone que ASA2, ASA4 y ASA7, junto con la subunidad OSCP, forman el brazo periférico, y que ASA6 está involucrada en la dimerización de la enzima, ASA5 y ASA8 se encuentran en la región membranal y ASA1 y ASA3 se encontrarían de manera periférica a la membrana.

de estas extensiones, aunque se ha propuesto que estos aminoácidos extra en la subunidad  $\beta$  podrían hacer el papel de la proteína reguladora dentro del complejo (29), ya que la proteína inhibidora clásica de la ATP sintasa de los eucariontes, la  $IF_1$ , no se encuentra en este complejo. Tampoco se identificaron homólogos de las subunidades clásicas que forman el estator de la ATP sintasa de los eucariontes, ni de aquellas implicadas en la dimerización del complejo (30, 31). Por el contrario, se encontró que la ATP sintasa de estas algas presentan 9 subunidades asociadas que no tienen similitud con otras proteínas de las bases de datos (Tabla 2). A estas subunidades se les nombró ASA, por las siglas en inglés de Proteína Asociada a la ATP Sintasa: ASA1 a ASA9 (Fig. 4). Estas proteínas presentan una masa molecular aparente que va desde los 60 kDa para ASA1 hasta los 9 kDa para

ASA9 (32). Basados en la secuencia de *C. reinhardtii*, las cuales presentan una similitud promedio del 50% con las secuencias de *Polytomella sp.*, se realizó un análisis de hidrofobicidad utilizando el servidor TMHMM v.2.0. El programa predice cruces transmembranales para la subunidad ASA8 y ASA9; las subunidades ASA5 y ASA6 son proteínas hidrofóbicas, pero no predicen cruces transmembranales, mientras que el resto de las subunidades ASA parecen ser completamente hidrofílicas (32, 33). Para las subunidades ASA1 y ASA4 se predice la presencia de estructura de hélices entrecruzadas, importantes para la interacción proteína-proteína.

La ATP sintasa de estas algas, a diferencia de las enzimas del resto de los organismos eucariontes, se purifica preferentemente como un dímero muy estable con una masa molecular aproximada de 1600 kDa (32, 34). Este complejo se observó por estudios de microscopía electrónica (33, 35) en los cuales destaca la presencia de brazos periféricos muy robustos, que contrastan con los de la enzima bacteriana o la mitocondrial clásica, en donde dicha estructura es poco densa.

La monomerización de la enzima se ha llevado a cabo observando cambios en la composición polipeptídica, disminuyendo la proporción de las subunidades ASA6 y ASA9 (36), sugiriendo que estas subunidades son responsables de la dimerización (Fig. 4). Utilizando agentes entrecruzadores, posteriormente se demostró que la subunidad ASA6 sí está involucrada en la formación del dímero de la enzima (29). Sin embargo, ninguna de las dos subunidades presenta el motivo GXXXG, por lo que se asume que otro dominio es el encargado de la dimerización del complejo en el linaje de las algas clorofíceas.

Se han propuesto diferentes modelos del arreglo topológico de las subunidades que componen a la ATP sintasa de las algas clorofíceas (32, 33, 36). Estos modelos concuerdan en que la subunidad ASA6 es la responsable de la dimerización y que se encuentra en la región membranal junto con la subunidad ASA9, ASA8; sin embargo, la disposición de las subunidades que estarían formando el brazo periférico de la enzima no es todavía muy clara. No obstante, estudios con agentes entrecruzadores y estudios de disociación de la enzima muestran una cercanía de las subunidades OSCP, ASA2, ASA4 y ASA7 (32,33), por lo que se ha propuesto que estas subunidades forman el brazo periférico de la  $F_1F_0$ -ATPasa de las algas clorofíceas (Fig. 4) en estequiometría de uno respecto a la subunidad  $\gamma$  (33).

Para conocer mejor la función que desempeñan las subunidades ASA dentro del complejo se realizó un estudio de silenciamiento del gen de la

subunidad ASA7 mediante RNA de interferencia (RNAi) en *C. reinhardtii*, encontrando que la enzima purificada es muy inestable y se disocia fácilmente liberando al sector F<sub>1</sub> (37); sin embargo, la pérdida de esta subunidad no tiene algún impacto en la bioenergética celular ni en la estructura de las crestas mitocondriales.

Es claro que la presencia de las subunidades ASA en la ATP sintasa de las algas clorofíceas le confieren una estructura más voluminosa y mucho más estable que la de las ATP sintasas del resto de los organismos eucariontes, aunque su posible función aún no es clara. Se ha planteado que su arreglo en dímero podría contribuir a mantener la estructura tubular de las crestas mitocondriales *in vivo* (38). Tampoco se conoce como es que las algas clorofíceas adquirieron estas subunidades atípicas a lo largo de la evolución ni en que momento lo hicieron.

#### La ATP sintasa de los Tripanosomátidos

Un reciente estudio sobre la ATP sintasa de *Trypanosoma brucei* reveló que la enzima contiene subunidades extra que no están presentes en la enzima de los mamíferos o de la levadura (39). Al realizar estudios bioquímicos para conocer la composición de la ATP sintasa de *T. brucei* se encontró que el complejo enzimático está compuesto por 22 subunidades, que presentan una masa molecular entre 8.6 y 55.7 kDa. Ocho de estas subunidades están conservadas, las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $c$ ,  $b$  y OSCP (Tabla 1). Las otras 14 subunidades restantes no presentan similitud con las subunidades clásicas que componen el estator de la ATPasa mitocondrial de otras especies (39) (Tabla 2). Puesto que no se encontraron homólogos de estas proteínas en las bases de datos ni dominios estructurales conservados, estas proteínas parecen ser únicas del orden Kinetoplastida, pues sólo comparten similitud con proteínas que pertenecen a este linaje. Estas 14 nuevas proteínas fueron registradas como proteínas hipotéticas en GeneBD, por sus siglas en inglés de Base de Datos de Genes (Tabla 2).

La subunidad  $b$  está presente en la ATPasa de *T. brucei*, aunque solamente su extremo N-terminal tiene similitud con la subunidad  $b$  de los eucariontes. Por otra parte, no se pudo identificar en la enzima a un homólogo de la subunidad  $a$ ; esto puede deberse a dificultades en las técnicas para la identificación de proteínas hidrofóbicas asociadas a la membrana, pero se asume que esta subunidad está presente y que interactúa con la subunidad  $c$ .

Cuando se llevó a cabo el silenciamiento de genes, mediante RNAi, de la subunidad  $\alpha$  y de dos nuevas proteínas, Tb10.70.7760, Tb927.5.2930, se

produjo la disociación del complejo, liberándose el dominio F<sub>1</sub>, por lo que se concluye que estas proteínas son esenciales para la organización estructural del complejo (39).

Se ha logrado purificar el dominio F<sub>1</sub>, el monómero y el dímero de la F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPasa de *T. brucei* con una masa molecular aparente de 450 kDa, 700 kDa y 1000 kDa respectivamente. En el monómero de la enzima se identificaron 16 subunidades, mientras que en la forma dimérica se identificaron dos proteínas adicionales (Tb927.2.3610 y Tb927.5.3090), las cuales podrían ser las responsables de la dimerización (40).

Sin duda, estas nuevas proteínas reemplazan la función de las subunidades que forman el estator de la enzima en el resto de las ATP sintasas mitocondriales, con excepción de la subunidad  $b$ , que es la única que se encuentra conservada en esta especie. Sin embargo, es necesario estudiar más acerca de la topología de esta ATP sintasa para tener clara la función de cada una de estas nuevas proteínas y conocer su arreglo para la formación de una estructura diferente.

#### La ATP sintasa de los ciliados

Recientemente se ha identificado una nueva estructura de la ATP sintasa en *Tetrahymena thermophila* (40). Este organismo ciliado pertenece al grupo protista que junto con los dinoflagelados y los apicomplejos forman el gran grupo de los alveolados. La purificación de la ATP sintasa de *T. thermophila* en geles azules nativos muestra una forma dimérica, tal como se comporta la ATP sintasa de las algas clorofíceas (32, 33, 34, 35). El complejo puro reveló la presencia de 22 subunidades (40). Se identificaron las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y OSCP, todas ellas formando parte del dominio F<sub>1</sub> de la enzima (Tabla 1). Del dominio membranar F<sub>0</sub> sólo fue identificada la subunidad  $c$ . Sorprendentemente, no se encontraron homólogos de las subunidades  $a$  que hasta el momento se encuentra muy conservada en todas las estructuras de la ATP sintasa, tampoco se identificó algún homólogo de la subunidad  $b$ , que es la subunidad principal del tallo periférico de la enzima (40). Para el resto de las subunidades asociadas a la ATP sintasa de *T. thermophila* no se encontró algún homólogo en las bases de datos, por lo que éstas se registraron como proteínas hipotéticas en NCBI, por sus siglas en inglés de Centro Nacional de Información Biotecnológica (Tabla 2). Estudios detallados de comparación de secuencias lograron identificar con una baja similitud al homólogo de la subunidad  $\delta$  (proteína hipotética 118355322) y de la subunidad  $d$  (proteína hipotética 118360532). También se



encontró que una nueva proteína nombrada Ymf66 podría sustituir a la muy conservada subunidad *a*, debido a que tienen características muy similares y también es codificada en el genoma mitocondrial (40). Esta proteína es integral de membrana y su estructura primaria predice 8 cruces transmembranales, donde el cuarto cruce conserva un residuo de arginina, esencial para la formación del canal para el paso de protones. Esta proteína Ymf66 sólo está conservada en organismos ciliados; en ningún otro organismo se encuentra un ortólogo de esta proteína, lo cual indicaría una divergencia de la subunidad *a* en este tipo de organismos. Por otra parte, también se identificaron de entre las 15 subunidades hipotéticas, a tres proteínas que podrían cumplir con la función de la subunidad *b* (146185889, 118398278 y 118366175). Esto se llevó a cabo con base en la predicción de la estructura secundaria (40).

Estudios de microscopía electrónica se llevaron a cabo (40) en donde se destacan dominios exclusivos de *T. thermophila*, sobre todo en la región membranal, donde se observa una gran densidad electrónica. Entre cada monómero también se aprecia densidad electrónica adicional que parece unirse al sector  $F_1$ . Este dominio podría estar involucrado en la dimerización de la enzima. Otra característica interesante que se observó en la ATP sintasa de *T. thermophila* es el arreglo en paralelo de sus monómeros, que contrasta con el arreglo angular que forman los monómeros de la ATP sintasa dimerica de otros organismos (40). Se propone que este arreglo en paralelo está asociado a la morfología en forma tubular de las crestas mitocondriales observadas en mitocondrias de los organismos ciliados y en general de los organismos alveolados.

Sin duda la ATPasa de *T. thermophila* presenta una estructura atípica, donde se involucran subunidades novedosas que hasta el momento no se tiene clara su función, aunque alguna de ellas puede sustituir la función de las subunidades clásicas involucradas en el estator de la enzima y ser exclusivas de esta especie.

## CONCLUSIONES

La estructura general de la  $F_1F_0$  ATP sintasa se ha conservado a lo largo de la evolución debido

al mecanismo catalítico que se lleva a cabo para sintetizar el ATP que la célula necesita para realizar sus procesos vitales. Tanto el dominio globular  $F_1$  y el dominio membranal  $F_0$  presentan ortólogos de las subunidades mínimas involucradas en la catálisis de la enzima en todas las especies (Tabla 1). La subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$  son las más conservadas. Todos los organismos cuentan con tres subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$  que se arreglan alternadamente para formar un hetero hexámero. Otras de la subunidades que están presentes en todos los organismos son aquellas que forman el rotor de la enzima, subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $c$  y  $\delta$ , aunque esta última sólo está presente en la  $F_1F_0$ -ATPasa mitocondrial. El brazo periférico de la enzima es la estructura del complejo que más difiere de una especie a otra, donde sólo se conservan las subunidades OSCP o  $\delta$ , en el caso de las bacterias, y *a*. La mayoría de los organismos eucariontes, desde las levaduras hasta las plantas y los mamíferos, cuentan con las mismas subunidades, aunque poco conservadas a nivel de secuencia pero más conservadas a nivel de estructura, lo cual indica que estas subunidades comparten la misma función dentro del estator del complejo. Pocas son las subunidades específicas de cada una de estas especies (Tabla 2), adquiridas generalmente para estabilizar al complejo y optimizar el metabolismo energético celular. Estudios recientes han descubierto nuevas subunidades asociadas a la ATP sintasa en los linajes de las algas clorofíceas, en los tripanosomátidos y en los ciliados que producen una estructura atípica de la enzima (Tabla 2). Todas estas nuevas subunidades están involucradas en la formación del estator de la enzima, aunque todavía no es clara la función que tiene cada una de ellas dentro del complejo enzimático. Podemos sugerir que fueron adquiridas para satisfacer las necesidades energéticas específicas de estas especies y son esenciales para el buen ensamble del complejo, estabilizando una forma dimerica necesaria para mantener la morfología de las crestas mitocondriales.

No cabe duda que las últimas décadas dedicadas al estudio de esta interesante enzima han aportado información muy valiosa para el conocimiento de su estructura y su funcionamiento, pero aún falta mucho por estudiar y comprender sobre este motor molecular.



## REFERENCIAS

1. Alfonzo M, Kandrach MA, Racker E (1981) Isolation, characterization, and reconstitution of a solubilized fraction containing the hydrophobic sector of the mitochondrial proton pump. *J Bioenerg Biomembr* 13:375-391.
2. Itoh H, Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 427:465-468.
3. Weber J, Senior AE (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *FEBS Lett* 545:61-70.
4. Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27:1154-1160.
5. Hausrath AC, Grüber G, Matthews BW, Capaldi RA (1999) Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia coli* F(1) ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13697-13702.
6. Rodgers AJW, Wilce MCJ (2000) Structure of the  $\gamma$ - $\epsilon$  complex of ATP synthase. *Nat Struct Biol* 7:1051-1054.
7. Tsunoda SP, Rodgers AJW, Aggeler R, Wilce MJC, Yoshida M, Capaldi RA (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6560-6564.
8. Fillingame RH, Jiang W, Dmitriev OY (2000) The oligomeric subunit C rotor in the F<sub>0</sub> sector of ATP synthase: unresolved questions in our understanding of function. *J Bioenerg Biomembr* 32:433-439.
9. Jiang W, Hermolin J, Fillingame RH (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4966-4971.
10. Wilkens S, Capaldi RA (1998) ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* 393:29.
11. Dmitriev O, Jones PC, Jiang W, Fillingame RH (1999) Structure of the membrane domain of subunit b of the *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 274:15598-15604.
12. Wilkens S, Borchardt D, Weber J, Senior AE (2005) Structural Characterization of the interaction of the  $\delta$  and  $\alpha$  subunits of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 44:11786-11794.
13. Collinson IR, van Raaij MJ, Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM, Orriss GL, Miroux B, Walker JE (1994) ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of stalk complex in the presence of F<sub>1</sub>-ATPase and in its absence. *J Mol Biol* 242:408-421.
14. Dickson VK, Silvester JA, Fearnley IM, Leslie AGW, Walker JE (2006) On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J* 25:2911-2918.
15. Rees DM, Leslie AG, Walker JE (2009) The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21597-21601.
16. Vaillier J, Arselin G, Graves PV, Camougrand N, Velours J (1999) Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene ATP18. *J Biol Chem* 274:543-8.
17. Paumard P, Vaillier J, Couly B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21:221-230.
18. Sabbar S, Stuart RA (2005) The yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase. Analysis of the molecular organization of subunit g and the importance of a conserved GXXXG motif. *J Biol Chem* 280:24435-24442.
19. Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H (1998) Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17:7170-7178.
20. Cabezón E, Montgomery MG, Leslie AGW and Walker JE (2003) The structure of bovine F<sub>1</sub>-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* 10:744-750.
21. Ichikawa N, Yoshida Y, Hashimoto T, Ogasawara N, Yoshikawa H, Imamoto F and Tagawa K (1990) Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast. *J Biol Chem* 265:6274-6278.
22. Belogrudov GI, Hatefi Y (2002) Factor B and the mitochondrial ATP synthase complex. *J Biol Chem* 277:6097-6103.
23. Brugière S, Kowalski S, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Miras S, Salvi D, Ravel S, d'Hérin P, Garin J, Bourguignon J, Joyard J, Rolland N (2004) The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions. *Phytochemistry* 65:1693-1707.

24. Heazlewood JL, Whelan J, Millar AH (2003) The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are  $F_0$  components in the plant  $F_1F_0$  ATP synthase. *FEBS Lett* 540:201-205.
25. Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y, Burger G (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res* 26:865-878.
26. Tang HV, Pring DR, Muza FR and Yan B (1996) Sorghum mitochondrial orf25 and a related chimeric configuration of a male-sterile cytoplasm. *Curr Gen* 29:265-274.
27. Nurani G, and Franzén LG (1996) Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Mol Biol* 6:1105-1116.
28. Franzén LG, Falk G (1992) Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol Biol* 19:771-780.
29. Villavicencio-Queijeiro A, Vázquez-Acevedo M, Cano-Estrada A, Zarco-Zavala M, Tuena de Gómez M, Mignaco JA, Freire MM, Scofano Helena M, Foguel D, Cardol P, Remacle C, González-Halphen D (2009) The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *polytomella sp.* is dimeric. *J Bioenerg Biomembr* 41:1-13.
30. Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D (2002) The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the  $F_1F_0$ -ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 277:6051-6058.
31. Cardol P, Gonzalez-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C (2005) The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol* 137:447-459.
32. Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, González-Halphen D (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr* 38:271-282.
33. Cano Estrada A, Vazquez-Acevedo M, Villavicencio-Queijeiro A, Figueroa-Martinez F, Miranda-Astudillo H, Cordeiro Y, Mignaca JA, Foguel D, Cardol P, Lapaille M, Remacle C, Wilkens S, and Gonzalez-Halphen D (2010) Subunits-Subunits interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella sp.* *Biochim Biophys Acta* 1797:1439-1448.
34. Van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D (2003) Identification of 21 novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*: A proteomic approach. *Plant Physiol* 132:318-330.
35. Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005) Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett* 579: 5769-5772.
36. Van Lis R, Mendoza-Hernández G, Groth G, Atteia A (2007) New insights into the unique structure of the  $F_0F_1$ -ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella sp.* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 144:1190-1199.
37. Lapaille M, Escobar-Ramirez A, Degand H, Baurain D, Rodriguez-Salinas E, Coosemans N, Boutry M, González-Halphen D, Remacle C, Cardol P (2010) Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial  $F_1F_0$  ATP synthase and role of ASA7 protein in stability and aligomycin resistance of the enzyme. *Mol Biol Evol* 27:1630-1644.
38. Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* 580:3427-3432.
39. Zíková A, Schnaufer A, Dalley RA, Panigrahi AK, Stuart KD (2009) The  $F_0F_1$ -ATP Synthase complex contains novel subunits and is essential for Procytic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens* 5:1-15.
40. Balabaskaran NP, Dudkina NV, Kane LA, van Eyk JE, Boekema EJ, Mather MW, Vaidya AB (2010) Highly divergent mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila*. *Plos Biol* 7:e1000418.