

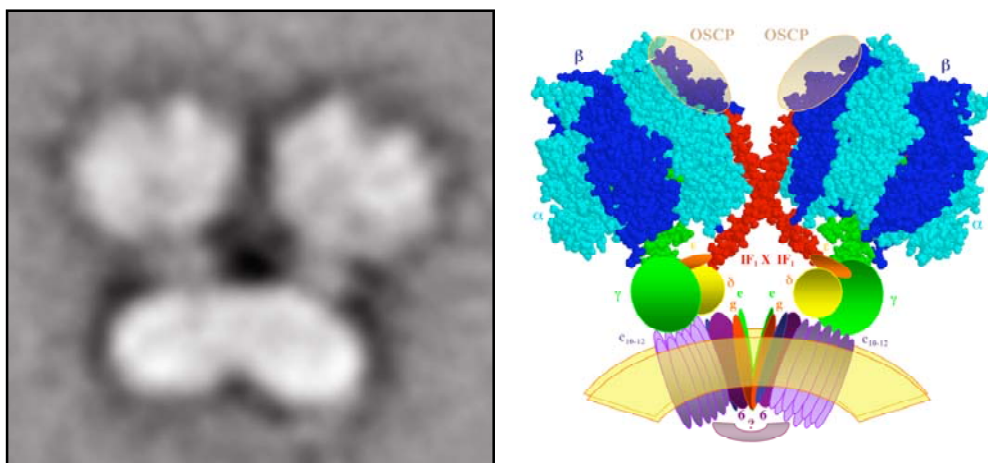
## "LOCALIZACIÓN Y MOVIMIENTOS DE LA PROTEÍNA INHIBIDORA EN LA ESTRUCTURA DEL DÍMERO DE LA F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP SINTASA MITOCONDRIAL".

**José de Jesús García Trejo.**

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano 1. Col Sección XVI, Tlalpan 14080 México, D.F. Tel: 5573-2911 ext 1517. Fax: 5573-0926. Email: jjgarcia\_trejo@yahoo.com.

La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa es el motor molecular más pequeño y eficiente de la naturaleza que cataliza la reacción de síntesis o hidrólisis de ATP en las membranas plasmáticas de las bacterias, en los tilacoides de los cloroplastos y en la membrana interna de las mitocondrias. El estator y el rotor de esta enzima conectan a la parte catalítica (F<sub>1</sub>) con el canal de protones (F<sub>0</sub>) del motor por medio de varias proteínas que forman un cuello lateral y otro central, respectivamente. Como todo motor molecular reversible, el rotor puede girar en ambos sentidos induciendo en la parte F<sub>1</sub> la hidrólisis o la síntesis de ATP, respectivamente. El giro del rotor en el sentido de la ATP sintasa consume energía de dos fuentes: 1) del gradiente electroquímico de protones los cuales son transportados por su canal F<sub>0</sub> del lado positivo al lado negativo de la membrana; y 2) de la energía de unión del Mg-ADP y del Pi, a la F<sub>1</sub>. Inversamente, la unión del complejo Mg-ATP y su hidrólisis en la F<sub>1</sub> impulsan la rotación del cuello central y el bombeo de protones por el canal F<sub>0</sub> hacia el lado positivo de la membrana. Dado que la actividad de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa es en general una pérdida de energía para las células, el giro del rotor en el sentido de la hidrólisis es controlado en bacterias y cloroplastos por diferentes proteínas del rotor que favorecen la rotación en el sentido de la síntesis (1). En el caso de la enzima mitocondrial, la proteína inhibidora (IF<sub>1</sub>) es la responsable de impedir la actividad de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa en las mitocondrias cuando el gradiente electroquímico de protones disminuye (por ejemplo durante la isquemia). Por medio de experimentos de entrecruzamiento reversible, nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que la IF<sub>1</sub> se localiza a una distancia ≤ de 12 Å de las subunidades del rotor γ y ε (2). Al modelar al complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> a partir de sus estructuras cristalográficas aisladas, propusimos que la parte inhibitoria y N-terminal de la IF<sub>1</sub> debe localizarse en una doble interfase entre subunidades del rotor (γ y ε) y una de las interfases catalíticas α/β. Esta localización implicó y nos llevó a proponer un nuevo modelo del mecanismo de inhibición de la IF<sub>1</sub> en el cual la parte N-terminal de la IF<sub>1</sub> debe bloquear el giro del rotor además de interferir con los cambios conformacionales de las interfases catalíticas α/β (2), como se había descrito anteriormente. Este modelo se confirmó posteriormente con la resolución del cristal del complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> reconstituido el cual cristalizó como un complejo dimérico (F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>)<sub>2</sub> (3). En paralelo, otros grupos han demostrado que la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa completa también dimeriza por medio de las subunidades e y g de F<sub>0</sub>, y además que estas subunidades y el dímero (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>)<sub>2</sub> que forman son esenciales para la biogénesis de las crestas de la membrana interna mitocondrial (4,5). Para obtener la primera estructura resuelta de este dímero de la ATP sintasa, nosotros aislamos al dímero (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>)<sub>2</sub> de mitocondrias de corazón de bovino por medio de gradientes de glicerol y analizamos su estructura por microscopía electrónica de alta resolución además del análisis, orientación, clasificación y promedio de todas las imágenes obtenidas por tinción negativa. La estructura del dímero de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa muestra una forma cónica gracias a la unión estrecha en los sectores F<sub>0</sub> y la ligera separación entre los sectores F<sub>1</sub>, lo cual forma un ángulo de 40° entre los ejes mayores de cada monómero (6). Tal y como lo propuso Allen (7), un dímero cónico es la base estructural de un polímero helicoidal que le da forma a las crestas mitocondriales. Además

de esto, encontramos dos novedosos puentes proteicos que unen a los sectores  $F_1-F_1$  y a las partes  $F_0-F_0$ , respectivamente (6). Es posible que éste último se forme con las partes extramembranales de las subunidades dimerizantes (e.g, etc.), las cuales contienen dominios de dimerización y se extienden hacia el espacio intermembranal. Por otro lado, de acuerdo con nuestros resultados de reconstitución y sobre expresión de la  $IF_1$  que inducen la formación del dímero  $(F_1F_0)_2$  (8), es posible que el puente entre  $F_1-F_1$  se forme al menos en parte con la proteína inhibidora la cual debe adoptar una estructura doblada y cruzada para acomodarse dentro de la estrecha interfase  $F_1-F_1$  del dímero, la cual a su vez muestra una estructura cruzada (Ver Fig.1). Por otro lado, por medio de proteólisis limitada hemos demostrado que durante la formación del gradiente de protones se expone el extremo inhibitorio N-terminal, y se oculta el extremo C-terminal de la  $IF_1$ , lo cual implica que durante la síntesis de ATP, la  $IF_1$  separa su extremo N-terminal de su sitio de unión inhibitorio para permitir el giro del rotor, mientras permanece unida a la enzima por su extremo C-terminal. En resumen, nuestros modelos estructurales de la proteína inhibidora en la enzima completa dimerica y monomérica explican el papel de esta proteína en el control de la rotación y en la dimerización de la  $F_1F_0$ -ATPasa mitocondrial. Estos fenómenos de control y dimerización de la ATP sintasa hacen más eficientes tanto el mecanismo rotacional de la enzima (al prevenir el giro inercial del complejo  $F_1F_0$  completo durante la síntesis o hidrólisis de ATP), como la fosforilación oxidativa en general al darle su forma de crestas a la membrana interna mitocondrial.



**Figura 1. Estructura del dímero de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa mitocondrial.** A) Estructura del dímero de la ATP sintasa de corazón de bovino resuelta por ME (6). B) Modelo del dímero mostrando la posible localización de la proteína inhibidora (rojo) (8).

#### Referencias

1. García, J. J., Minauro-Sanmiguel, F., and Bravo, C. (2002) *Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6*. Ed. García, J.J. Research Signpost, Trivandrum
2. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) *J Bioenerg Biomembr* 34(6), 433-443
3. Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) *Nat Struct Biol* 10(9), 744-750
4. Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002) *Embo J* 21(3), 221-230
5. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., and Schagger, H. (1998) *Embo J* 17(24), 7170-7178
6. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and Garcia, J. J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35), 12356-12358
7. Allen, R. D. (1995) *Protoplasma* 189, 1-8
8. García, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P., and Rodríguez-Zavala, J.S. (2006) *Biochemistry In the press*.