

## LA $F_1F_0$ ATP SINTASA: UN COMPLEJO PROTEICO CON GRAN VERSATILIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

LENIN DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ Y MARIETTA TUENA DE GÓMEZ-PUYOU

*Depto. de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito de la Investigación, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. E-mail: mtuena@ifc.unam.mx*

### RESUMEN

El pirofosfato pudo haber sido la molécula acarreadora de energía precursora del ATP en la atmósfera primigenia. Durante la evolución, el ATP substituyó al pirofosfato mostrando una mayor versatilidad funcional. Paralelamente, los sistemas encargados de su síntesis o hidrólisis,  $H^+$  pirofosfatasa, ATPasas y la ATP sintasa mitocondrial, fueron mostrando mayor complejidad estructural y diversificado funcionalmente utilizando parte de sus componentes estructurales para realizar funciones diferentes de la síntesis o hidrólisis del ATP. Estos hallazgos han revolucionado el campo de la bioenergética tradicional y abierto nuevos caminos a la investigación de procesos normales y patológicos.

**Palabras Clave:** ATP sintasa, estructura, función, localizaciones ectópicas.

### ABSTRACT

In the primitive atmosphere, pyrophosphate could have been the energy carrier molecule that gave rise to ATP. During evolution, ATP substituted pyrophosphate because it showed a higher functional versatility. At the same time, the systems that carried out its synthesis or hydrolysis, such as the  $H^+$  pyrophosphatases, ATPases and mitochondrial ATP synthases showed a higher structural complexity and also diversified functionally by using a part of their structural components in order to perform functions different from those of ATP synthesis or hydrolysis. Such findings have revolutionized the field of traditional bioenergetics and opened new pathways to the research of pathological and normal processes.

**Key Words:** ATP synthase, structure, function, ectopic localization.

### INTRODUCCIÓN

**L**as propiedades geológicas, químicas y biológicas del pirofosfato (PiP) son consistentes con la hipótesis de que éste pudo ser la molécula acarreadora de energía en la atmósfera primigenia y un precursor del adenosín trifosfato (ATP). El PiP puede donar energía y fosforilar<sup>1</sup>.

La complejidad estructural del ATP le proporcionó mayor versatilidad funcional, ya que a su papel de acarreador de energía se sumaron el de ser donador de fosfato en la regulación por fosforilaciones, pudiendo además donar PiP o adenilar. El ATP actúa como molécula reguladora en numerosas reacciones enzimáticas sobre transportadores y receptores, y como sustrato en la síntesis del ADN.

En el metabolismo de los procariotes probablemente el PiP fue el acarreador de energía como un prenucleótido y el nucleótido ATP tomó su lugar como principal acarreador de energía en los eucariotes.

### EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS QUE UTILIZAN O TRANSFORMAN LA ENERGÍA

Existen numerosas enzimas que hidrolizan el ATP en la célula, sin embargo, el 90% de la síntesis en condiciones aerobias lo realiza la ATP sintasa.

La **ATP sintasa** es un complejo enzimático ampliamente distribuido en la naturaleza. Se localiza en la membrana plasmática de las bacterias, la tilacoidal de los cloroplastos y la membrana interna de las mitocondrias.

La estructura de los segmentos catalíticos muestra un alto grado

de conservación en la escala filogenética, 72% de identidad entre las subunidades de mayor peso molecular de las mitocondrias de bovino y la enzima de *Escherichia coli*.

A pesar de su alto grado de complejidad estructural la ATP sintasa de mitocondrias de bovino, es la mejor conocida en la actualidad<sup>2</sup>.

Está formada por dos segmentos definidos por su polaridad, un hidrofóbico o  $F_0$  integrado a la membrana y un segmento hidrofílico o  $F_1$ .

Siguiendo el mecanismo quimiosmótico propuesto por Peter Mitchel en 1961<sup>3</sup>, el complejo  $F_1F_0$  realiza dos reacciones acopladas: el  $F_0$ , el transporte de iones (protones o sodio) a través de una membrana y el segmento  $F_1$  une el ADP y el fosfato para formar el ATP. La energía de este proceso proviene de la formación de un gradiente electroquímico compuesto de iones

con carga ( $H^+$ ) proporcionado por la cadena de transporte de electrones que bombea los  $H^+$  hacia el compartimiento contrario al que se encuentra el complejo  $F_1$  que sintetiza el ATP. Este proceso se conoce como transducción de energía.

Evolutivamente, el complejo bacteriano presenta la composición más simple, ya que consta de sólo ocho subunidades diferentes, 3 de  $F_0$ : **a**, **b2** y **c**, 12 a 14 copias y 5 subunidades diferentes de  $F_1$ : **3a**, **3b**, **g**, **d** y **e**. En contraste el complejo  $F_0F_1$  de mitocondrias tiene 16 subunidades diferentes, las que componen al bacteriano y otras supernumerarias: en  $F_0$  subunidades **A6L**, **d**, **f**, **F6**, **e** y **g**. Al segmento  $F_1$  se añadieron **OSCP** (equivalente a la **d** bacteriana) y un regulador interno o proteína inhibidora (**IF<sub>1</sub>**) (Tabla I).

La biogénesis del complejo bacteriano se realiza en un solo operón (*atp o unc*) que genera un mensajero policistrónico<sup>4</sup>. En eucariotes el complejo tiene origen bigenómico, la mayor parte

Segmento	Subunidades			Estequiometría	Localización del gen
	Bovino <sup>1</sup> (p. m. kDa)	Levadura <sup>2</sup> (p. m. kDa)	Bacteria <sup>3</sup> (p. m. kDa)		
$F_1$	$\alpha$ (55)	$\alpha$ (54)	$\alpha$ (55)	3	Nuclear
	$\beta$ (51)	$\beta$ (51)	$\beta$ (50)	3	Nuclear
	$\gamma$ (30)	$\gamma$ (30)	$\gamma$ (32)	1	Nuclear
	$\delta$ (15)	x	$\epsilon$ (14)	1	Nuclear
	$\epsilon$ (5.6)	$\delta$ (14)		1	Nuclear
	OSCP (20)	$\epsilon$ (6.6)	$\delta$ (19)	1	Nuclear
	IF <sub>1</sub> (10)	OSCP (20)		1	Nuclear
$F_0$	A (24)	IF <sub>1</sub> (7.3)	a (30)	1	Mitocondrial
	b (FoI-PVP) (24)	6 (27)	b (17)	1-2	Nuclear
	c (7.6)	4 (23)	c (8.2)	10-14	Nuclear
		9 (7.7)			(bovino)
					Mitocondrial
					(levadura)
	A6L (7.9)	8 (5.8)		1	Mitocondrial
	d (18)	d (10)		1	Nuclear
	f (10)	f (10)		n. d. <sup>4</sup>	Nuclear
	F6 (8.9)	h (10)		n. d.	Nuclear
		9 kDa		n. d.	Nuclear
		15 kDa		n. d.	Nuclear
	e (8.1)	e (10)		n. d.	Nuclear
	g (11)	g (12)		n. d.	Nuclear
		i (6.6)		1	Nuclear
		k (7.5)		n. d.	Nuclear

Tabla I. Composición de subunidades de los segmentos  $F_1$  y  $F_0$  de la ATP sintasa de diferentes organismos.

se codifica por el genoma nuclear y solamente **a** y **A6L** proceden del genoma mitocondrial (Tabla I).

La mayor parte del sitio catalítico reside en la subunidad **b** y existen trabajos que han tratado de medir catálisis en la subunidad **b** aislada y purificada, para estudiar el ciclo catalítico libre del resto de las subunidades del complejo. En nuestro laboratorio hemos estudiado las propiedades catalíticas de la subunidad **b** de una bacteria termofílica, sobreexpresada en *E. coli*, y encontramos una actividad de hidrólisis de ATP muy baja y de muy baja afinidad. Sorpresivamente y reminiscente de su estirpe evolutiva, exhibe una actividad de hidrólisis de pirofosfato con características que no comparten las pirofosfatasas hasta ahora descritas.

La literatura se ha enriquecido en la última década con las estructuras cristalográficas del complejo  $F_1$  de mitocondrias de corazón de bovino<sup>5</sup>, levadura, *E. coli*, cloroplasto, *thermophilus*<sup>6</sup> y de subunidades aisladas, así como, del complejo  $F_1F_0$  de mitocondrias de levadura<sup>7</sup> (Figura 1).

De una manera general la estructura muestra los dos segmentos: el  $F_1$  compuesto por la alternancia de las subunidades grandes: 3 **a** y 3 **b** formando un cilindro asimétrico inducido por la presencia de la subunidad **g** que forma un eje central en el interior del hexámero  $a_3b_3$ .

La cristalografía nos permitió el estudio detallado de los 3 sitios catalíticos, colocados en las interfases **ab**. Presentan asimetría por su diferente ocupación de nucleótidos, dos sitios poseen ADP o ATP y uno no contiene nucleótido. Existen otros 3 sitios de nucleótidos no catalíticos en las otras 3 interfases **ba**. En la estructura del complejo  $F_1F_0$  de levadura las subunidades **d** y **e** sirven de eje de unión junto con la **g** del segmento  $F_1$  con el  $F_0$ .

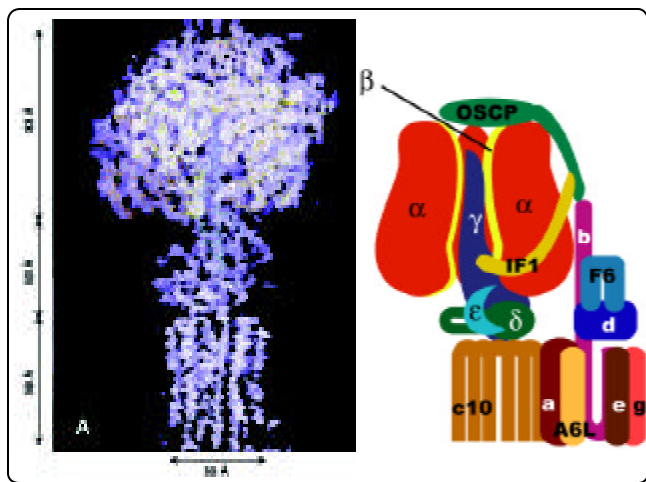


Figura 1. A) Imagen de la densidad electrónica de la  $F_1F_0$  ATP sintasa de mitocondria de levadura. B) Esquema topológico de las subunidades de la  $F_1F_0$  ATP sintasa de mitocondrias de bovino. Stock, et al.<sup>7</sup>

Recientemente se ha descrito un segundo eje periférico que une  $F_1$  con  $F_0$  compuesto por las subunidades **OSCP**, **b**, **d**, **A6L** ancladas por la **a** que se encuentra en el interior de la membrana<sup>8</sup>.

Respecto al segmento  $F_0$ , no existe estructura cristalográfica, y su composición es variable en las diferentes especies, el componente principal es la subunidad **c** que es un oligómero en forma de cilindro hueco al que se le adosa la subunidad **a** que se ancla al rotor (**gde**) y al eje lateral por la subunidad **b**<sup>9</sup>. Reconstituido a partir de subunidades puras (**ac**) transporta protones formando el canal de protones de la  $F_1F_0$ . El número de subunidades **c** varía entre 12 a 14 y de su eficiencia en el transporte de protones depende la capacidad de la enzima para sintetizar ATP. La estequiometría protón-ATP es de 3-4 por 1.

La estructura cristalográfica del segmento  $F_1F_0$  está perfectamente acorde al mecanismo catalítico de la enzima, propuesto por Paul Boyer<sup>10</sup> en él cada uno de los tres sitios catalíticos presenta, alternadamente, cambios conformacionales producidos por cambios de afinidad a nucleótidos dando una cinética de cooperatividad.

Este mecanismo cinético supone la acción de un catalizador rotatorio comprobado elegantemente por los experimentos de Noji y colaboradores en el Japón<sup>11</sup>.

El complejo  $F_1F_0$  es uno de los nanomotores rotatorios más espectaculares descritos hasta ahora, está formado mecánicamente por dos rotores, en  $F_1$ , **g**, **d** y giran acordes con el segundo rotor en  $F_0$ , formado por el polímero de subunidades **c**. La estabilidad de los rotores está asegurada por un estator: el hexámero de **ab** y los componentes del eje periférico **OSCP**, **b**, **d** y **A6L**, unidos a la subunidad **a** en el interior de la membrana.

La extraordinaria precisión entre el acoplamiento cinético y el mecánico del complejo  $F_1F_0$  le permite tener un máximo grado de eficiencia cercano al 100%<sup>12</sup>. Esto se debe a que el rotor en la subunidad **g** se mueve, sin fricción, en un túnel hidrofóbico formado por el hexámero **ab**, en el que durante la rotación, no se forman ni rompen uniones intermoleculares. La energía del proceso la proporciona la fijación del nucleótido en un sitio con alta afinidad, que cierra el sitio catalítico con un movimiento de bisagra y que se acopla simultáneamente a la rotación de la **g** la que no existen puntos muertos en los que el rotor pueda detenerse debido a que la torca mecánica es constante. Durante un ciclo de rotación de 360 grados se sintetizan 3 ATP con la rotación en el sentido de las manecillas del reloj o se hidrolizan en el sentido contrario.

La distribución de la energía de fijación de nucleótidos en el sitio catalítico de la **b** genera la torca que da origen a la rotación de la **g**, a su vez, la **b** almacena energía elástica que al revertir el movimiento de bisagra permite la salida de los productos y que el sitio catalítico regrese a su estado original vacío para iniciar un nuevo ciclo<sup>12</sup>.

Igual que cualquier proceso metabólico, la síntesis de ATP por la ATP sintasa está sujeta a una regulación estricta. Existen reguladores externos como la disponibilidad de sustratos ADP y  $P_i$ , por sus respectivos acarreadores mitocondriales y la generación del gradiente electroquímico provisto por la cadena de transporte de electrones y sus bombas de protones.

Existe un regulador endógeno de la ATP sintasa que es evolutivamente exclusivo de eucariotes es la llamada proteína inhibidora ( $IF_1$ ). Es una proteína de sólo 84 aminoácidos que previene la hidrólisis de ATP en condiciones de bajo potencial electroquímico. Se une a la  $F_1$  por su extremo amino en una interfase **ab** que contiene ADP, como lo muestra el cristal del complejo  $F_1I^{13}$ . Su extremo carboxilo sobresale del complejo y es capaz de interactuar con el extremo carboxilo de otro complejo  $F_1I$  y formar un dímero de  $F_1I$  a través de una hélice enrollada<sup>13</sup>. En la  $F_1$  existen hélices enrolladas en el rotor central formado por la subunidad **g** y en el dímero de la subunidad **b** que forma parte del eje externo. Este tipo de estructuras son elásticas, pueden doblarse y comprimirse, por lo que tienen la capacidad de realizar cambios conformacionales.

La trascendencia de la dimerización del complejo  $F_1I$  está lejos de ser explicada cabalmente, sin embargo, se podrían aducir numerosas razones por las cuales la formación de oligómeros resulta ventajosa, ya que, por lo general, aumenta la estabilidad del complejo, los sitios catalíticos se concentran y presentan diferente accesibilidades y especificidad, lo que abre nuevas posibilidades de regulación por el aumento de la complejidad estructural y por la aparición de una nueva interfase que propicie la aparición de nuevos efectores alostéricos.

Por otro lado, la dimerización puede ser un mecanismo que cense la concentración de proteína en una célula o en un organelo. Se ha propuesto que la oligomerización favorece la formación de superestructuras como las crestas mitocondriales, además de contribuir al enrollado y ensamblado de la proteína en la membrana. La habilidad de disociarse permitiendo la activación o inactivación del complejo, así como, la aparición de posibles interacciones con otras proteínas intrínsecas del complejo, como la reciente interacción con OSCP o ajenas a él.

En nuestro laboratorio, hemos estudiado la conversión del complejo dimérico inhibido por la proteína inhibidora ( $IF_1$ ) endógena en monomérico, que aún conserva la  $IF_1$ , antes de convertirse en una enzima catalíticamente activa y desplazarlo del sitio inhibitorio. Esto introdujo un nuevo paso regulatorio en el ciclo catalítico de la enzima<sup>14,15</sup>.

En el miocardio la  $IF_1$  tiene un papel muy importante durante la isquemia inhibiendo la hidrólisis de ATP que se produce durante este proceso patológico. La magnitud de la hidrólisis depende de la especie y de la velocidad de contracción del corazón, del contenido de  $IF_1$  y de su afinidad por la  $F_1$ . Existen tres grupos

entre los mamíferos con diferencias en la velocidad cardíaca y el contenido de  $IF_1$ . En el primer grupo se encuentran el conejo, cerdo, vaca y humano que tienen una frecuencia cardíaca menor de 250 contracciones por minuto y una estequiometría  $F_1-IF_1$  de 1. El segundo grupo lo forman, ratones y ratas con una frecuencia cardíaca de más de 250 contracciones por minuto y una relación  $F_1-IF_1$  menor de 1. En el tercer grupo se encuentra el cobayo con una frecuencia de contracción de 250 por minuto y una estequiometría  $F_1-IF_1$  de 1, pero que no inhibe la hidrólisis durante la isquemia. El  $IF_1$  inhibe un 50% la hidrólisis isquémica al unirse a la  $F_1$  y se libera la inhibición durante la reperusión. No se sabe qué grado de isquemia se necesita para transformar la enzima de sintética de ATP en hidrolítica<sup>16</sup>.

El campo está abierto y con estos nuevos hallazgos se ha despertado nuestro interés sobre otras características de esta proteína que ha sido estudiada por nosotros con anterioridad. Utilizando modelos computacionales de las estructuras del cristal del inhibidor soluble o resuelto por NMR del segmento dimerizante, se ha elaborado un modelo de la proteína en el que se describe una visagra que incluye los aminoácidos de los que depende la sensibilidad al pH de la inhibición y que comunica sus dos segmentos funcionales, el inhibitorio y el dimerizante. Con este modelo se pretende explicar algunos de los efectos cinéticos de la proteína y su trascendencia como regulador de la catálisis.

### ATPASAS DE ARQUEAS (A ATPASA), ATPASAS DE VACUOLA (V ATPASA) Y ATP SINTASAS (F ATPASA)

Las ATPasas tipo **A**, **V** y **F**, esta última ya descrita en la sección anterior, son sistemas enzimáticos fascinantes que se originaron a partir de un ancestro común y que tienen una distribución universal en todos los organismos. Son esenciales para la vida y tienen en común el acoplar el gradiente electroquímico de iones a través de la membrana para hidrolizar o sintetizar el ATP. Estructuralmente son complejos enzimáticos que trabajan como motores rotatorios moleculares. Su estructura y función se ha conservado durante la evolución. Están formados por dos dominios, hidrofóbico ( $A_0$ ,  $V_0$  y  $F_0$ ) e hidrofílico ( $A_1$ ,  $V_1$  y  $F_1$ ) conectados por un eje central y uno o dos laterales. Los polipéptidos de mayor peso molecular **a** y **b** en las de tipo **F** o **BA** respectivamente en las de tipo **V** o **A** se originaron por duplicación génica y conservan un muy alto grado de homología. A través de mutaciones y deleciones la subunidad **a** o **B** perdió la capacidad de catalizar, sin perder la de fijar nucleótidos.

Las ATPasas de tipo **A** se han obtenido de membrana plasmática de diversas arqueas como *Sulfolobus acidocalcareus* y *Methanosarcina mazei*. Están formadas por 9 subunidades diferentes. El segmento hidrofílico catalítico está compuesto por **3A**, **3B**, **C**, **D** y **E**. La **D** corresponde a la subunidad **g** de  $F_1$ . La subunidad **E** es semejante a la subunidad **d** de  $F_1$  y a las subunidades **G** y **H**, que no se les ha asignado función. El segmento hidrofóbico  $A_0$  contiene las subunidades **I** y **K**; **I** es

equivalente a una fusión de las subunidades **a** y **b**, y **K** es equivalente a **c**. Un polímero de subunidades **K** puede conducir protones o sodio. Estos complejos sintetizan ATP siguiendo el mismo mecanismo general de las de tipo **F** (**F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>**).

Las ATPasas tipo **V** se encuentran en la membrana plasmática de arqueobacterias, en la membrana de vacuolas de las levaduras, en la membrana del tonoplasto de plantas superiores, y en los mamíferos en las membranas de los lisosomas, endosomas, gránulos secretorios, gránulos de almacenamiento y en las vesículas de clatrina, en todas ellas funcionan solamente como ATPasas tomando parte en diversas funciones como la endocitosis de receptores, la acidificación en el túbulo renal, en la absorción de hueso, en la acumulación de neurotransmisores en vesículas y en la activación de hidrolasas ácidas, entre otras.

El pH de los compartimentos intracelulares de las células en los eucariotes es un parámetro finamente regulado por las **V** ATPasas, que afecta muchos procesos celulares como el transporte entre las diferentes membranas intracelulares, el procesamiento de prohormonas, el transporte de neurotransmisores y la entrada de virus a las células.

Está formada por dos segmentos **V<sub>0</sub>** hidrofóbico y **V<sub>1</sub>** hidrofílico y dos segmentos externos que conectan ambos segmentos. En total posee 13 subunidades distintas: **A3B3CDEFGH** en **V<sub>1</sub>** y **a, d, c, c'** y **c''**, en **V<sub>0</sub>**, **A3** y **B3** tienen sitios de fijación de nucleótidos y las subunidades del eje central son **C, D, E, F, G2** y **H**. Para la hidrólisis del ATP se requieren las subunidades **ABCG** y **E**. Tiene un cuello periférico de composición no precisada, probablemente **H**.

Esta enzima se regula de un modo peculiar, disociando el segmento **V<sub>1</sub>** del **V<sub>0</sub>** de manera reversible, inhibe o activa la hidrólisis y el bombeo de protones. Esta separación de segmentos le permite realizar funciones separadas para cada uno, actuando el **V<sub>0</sub>** como ATPasa unido a **V<sub>1</sub>** o como **V<sub>0</sub>** en la fusión de membranas formando parte de las uniones célula-célula (gap junctions). La composición del **V<sub>0</sub>** difiere de la del **F<sub>0</sub>** de la ATP sintasa, ya que está formado por 3 diferentes tipos de subunidades **c** originadas por duplicación génica. Existen subunidades **c** con dos y cuatro cruces transmembranales formando un oligómero asimétrico con baja eficiencia en el transporte de protones (12 protones en **F<sub>0</sub>** y 6 protones en **V<sub>0</sub>**) lo que podría ser la causa de que no pueda sintetizar ATP y sea sólo hidrolítica, funcionando como una eficiente bomba de protones para cumplir con la función de acidificar las vacuolas<sup>17</sup> (Tabla II).

Comparando a las ATPasas tipo **A, V** y **F** se puede suponer que durante la evolución a la **F** se le fueron añadiendo subunidades para regular su función, transporte y localización en diferentes compartimentos celulares, así como, para su ensamblado y estabilización.


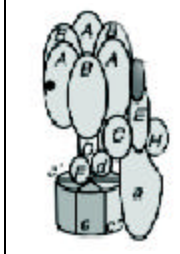

		
I	II	III
<b>A<sub>1</sub></b>	<b>V<sub>1</sub></b>	<b>F<sub>1</sub></b>
A	A	α
B	B	β
C	C	-
-	D	-
D	E	γ
E	-	δ
F	F	ε
-	G	-
-	H	-
G	-	-
H	-	-
<b>A<sub>0</sub></b>	<b>V<sub>0</sub></b>	<b>F<sub>0</sub></b>
I	a	a
-	b	b
K	c	c
-	c'	-
-	c''	-
-	d	d
-	-	F6
-	-	-
-	-	-

Tabla II. Composición de subunidades de los segmentos **A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>** (archea), **V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>** (vacuolar) y **F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>** (mitocondrial) y sus posibles equivalencias.

La evolución de estas enzimas estuvo determinada por la especialización de las funciones que comenzó como bomba de protones en el ancestro procariote que vivía en condiciones reductoras cambiando a sintasa en condiciones oxidantes (en presencia de oxígeno) y volviendo a ser bomba de protones, en la vacuola de los eucariotes. Estas funciones reversibles podrían tener que ver con la estequiometría protón-ATP y con la contribución de las subunidades pequeñas a la regulación que han mostrado un mayor grado de diversidad que las subunidades grandes (**a** y **b**).

**H<sup>+</sup> PiPASA MEMBRANAL**

Es una proteína integral de membrana con un peso molecular de 66 a 116 kilodaltones. Con 14 a 16 posibles pasos transmembranales, que no tiene grandes semejanzas con las ATPasas **A, V** y **F** ni con las ATPasas tipo **P** (la ATPasa de calcio

de membrana del retículo endoplásmico o SERCA y la Na-K ATPasa de membrana plasmática de eucariotes), sin embargo, tiene secuencias conservadas como en el equivalente del asa fijadora de los fosfatos en la subunidad  $F_1$ -b (asa P) en la que 4 de los aminoácidos del sitio del pirofosfato de la pirofosfatasa membranal de *Rodospirillum rubrum* son idénticos. Además existe semejanza entre el segmento 227-247 de la pirofosfatasa vacuolar y el alfa hélice de la subunidad del segmento  $F_0$  de la ATP sintasa. Se supone que en la evolución la subunidad de la ATP sintasa formó parte de uno de los cruces transmembranales de la pirofosfatasa.

Se localiza en la membrana plasmática de procariotes y en organelos intracelulares de eucariotes como vacuolas y ácidocalcisomas. En cromatóforos de *Rodospirillum rubrum*, sintetiza PiP en la luz durante el transporte de electrones que genera un gradiente electroquímico, igual que la ATP sintasa membranal. Puede mantener la energización de la membrana para transporte secundario de metabolitos, hidrolizar PiP generando un gradiente de protones que se utiliza para sintetizar ATP por la ATP sintasa y es importante en la osmoregulación de la bacteria. El PiP sintetizado en la luz se acumula en gránulos<sup>18</sup>.

### LOCALIZACIONES ECTÓPICAS

En las células de eucariotes es frecuente observar la utilización de módulos proteicos o segmentos de proteínas o subunidades de proteínas multiméricas que realizan distintas funciones. Esta multifuncionalidad puede variar dependiendo de su localización intracelular, su oligomerización con otras proteínas o la presencia de otros ligandos ya sea, expresada y conducida a otro compartimento celular o excretada al espacio extracelular. El ejemplo más conocido es el de una proteína mitocondrial que es parte de la cadena de transporte de electrones, el citocromoc, que al ser liberada al citoplasma es una señal molecular que participa en el proceso de la muerte celular por apoptosis. El caso de la ATP sintasa no ha sido la excepción, ya que se han descrito localizaciones ectópicas de sus subunidades (Tabla III).

#### a) de ATP

La detección de nucleótidos o nucleósidos de adenina en el espacio extracelular hace suponer que éste es sintetizado intracelularmente, ya sea en la matriz mitocondrial por la ATP sintasa o en el citoplasma por la glicólisis, las dos fuentes principales de generación de ATP. Su salida al espacio extracelular a través de la membrana plasmática podría ocurrir por algún poro o acarreador aún no descrito, o por fusión de vesículas cargadas de ATP, como se ha observado en el epitelio secretor de las glándulas salivales o de los ductos secretores del páncreas, aunque existe la remota posibilidad de que éste sea sintetizado *in situ* en otras membranas. Esta posibilidad implicaría la existencia de toda la compleja maquinaria proteica que hemos descrito en los párrafos precedentes suponiendo que la enzima llevaría a cabo la síntesis siguiendo el mismo mecanismo y

utilizando como fuente de energía un gradiente electroquímico. Todo esto plantea una serie de interrogantes que abren un enorme campo de investigación que se aboque a comprobar o descartar su existencia.

La presencia de ATP en el espacio extracelular se ha observado en el plasma sanguíneo durante la agregación plaquetaria o en el espacio intersináptico durante la neurotransmisión. El ATP en el espacio extracelular cumple diversas funciones fijándose, por ejemplo, a receptores específicos asociados a proteínas G, actuando como molécula de señalización en la comunicación intercelular o regulando canales iónicos con consecuencias fisiológicas tan variadas como la respuesta inflamatoria, la necrosis y la apoptosis celular o el transporte en los epitelios. El ATP secretado es rápidamente hidrolizado en ADP y fosfato, AMP o adenosina en la superficie celular por ecto ATPasas, apirinas, ADPasas, 5' nucleotidasas o fosfatasa alcalina probablemente localizadas en las llamadas balsas lipídicas.

Las balsas lipídicas son estructuras, presentes hasta ahora, sólo en la membrana plasmática y que tienen una composición de lípidos y proteínas determinadas como colesterol y glicosfingolípidos con abundancia de ácidos grasos de cadena larga, así como proteínas específicas como las caveolinas. Dada su rigidez, parecen flotar entre el resto de los lípidos de la membrana plasmática que tienen más fluidez. Se separan por su resistencia a los detergentes como el Tritón X100. Han sido implicadas en numerosas funciones como en la invasión por patógenos, la homeostasis de colesterol, la angiogénesis, la transducción de señales y en algunas enfermedades degenerativas. Contienen receptores membranales, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de necrosis tumoral, entre otros<sup>19</sup>.

### b) Localizaciones ectópicas de los complejos enzimáticos o de sus subunidades implicados en las transducciones energéticas

#### 1) Células normales

**Subunidad  $F_1$ -a como chaperona.** En células de animales y de plantas la subunidad  $F_1$ -a y las chaperonas mitocondriales comparten secuencias similares que permiten suponer una relación evolutiva entre ellas. Se ha observado que la  $F_1$ -b requiere de la  $F_1$ -a para conservar su estructura nativa actuando esta última como una chaperonina, a la que se le asocia una chaperonina mitocondrial, la hsp60, cuando está siendo sintetizada<sup>20</sup>.

**Subunidad F6 como vasoconstrictor.** Como una respuesta al estrés hemodinámico, las células endoteliales secretan a la luz de los capilares la subunidad F6 produciendo una vasoconstricción. Hasta la fecha, esta subunidad parece ser el único vasoconstrictor endógeno, ya que se ha observado que aumenta en animales hipertensos<sup>21</sup>.

Normales				
Segmento	Tipo celular	Localización	Interacción	Función
<b>F1-ab</b>	Células endoteliales	Membrana plasmática	Receptor de angiotatina	Regulación de angiogénesis
<b>F1-a</b>	Hepatocitos	Membrana plasmática	Receptor de apolipoproteína A-I	Transporte de lípidos y colesterol
<b>F1-b</b>	Hepatocitos	Membrana plasmática	Receptor de enterostatina	Regulación de la saciedad
<b>F1-a</b>	Células animales y de plantas	Citoplasma	Con F1- $\beta$ y otras proteínas	Chaperonina
<b>F1-a</b>	Células endoteliales	Membrana plasmática	Fijación de citosina p43	Inhibición de la proliferación de células endoteliales
<b>Fo-F6</b>	Células endoteliales	Membrana plasmática y torrente sanguíneo	Células capilares	Vasoconstricción
<b>Vo-c</b>	Neuronas cerebrales	Membrana del sinaptosoma y membrana plasmática	Fusión de membrana sinaptosomal y citoplásmica	Liberación de acetilcolina
Patológicas				
Segmento	Tipo celular	Localización	Interacción	Función
<b>F1-a</b>	Neuronas cerebrales	Citoplasma.		Neurofibrillas en la enfermedad de Alzheimer
<b>F1-b</b>	Células tumorales	Membrana plasmática	Diferenciación de linfocitos citotóxicos	Inhibición de proliferación de células endoteliales y regulación de lisis de células tumorales
<b>F1-ab/Apo A-I</b>	Células tumorales	Membrana plasmática	Reconocimiento por células T	Antitumoral del sistema inmune
<b>Fo-c</b>	Cardiocitos, neuronas y retinocitos	Membrana plasmática	Formación de canales de Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup>	Lipofucinoses ceroides o enfermedad neurodegenerativa de Batten

Tabla III. Localización ectópica de subunidades de la ATP sintasa mitocondrial en condiciones normales y patológicas.

**El complejo  $V_0$ -c de la ATPasa vacuolar como parte del complejo de fusión membranar.** La subunidad de la ATPasa vacuolar se originó por duplicación y fusión génica a partir de un ancestro común que formó el canal de H<sup>+</sup> de la  $F_0$  mitocondrial, con la que tiene un 80% de identidad. La  $V_0$ -c se ha identificado en la membrana del sinaptosoma de neuronas tomando parte en la fusión de la membrana sinaptosomal con la membrana plasmática e induciendo la liberación de acetilcolina a través de la formación de poros<sup>22</sup>.

#### En hepatocitos

Recientemente se ha publicado el proteoma de la membrana plasmática de hepatocitos de rata a partir de la fracción llamada

de balsas lipídicas. En estas fracciones, que aún son muy controvertidas, debido a que su caracterización ha sido difícil dadas las propiedades dinámicas de los lípidos de la membrana plasmática. En el proteoma de las balsas lipídicas se encontraron numerosas proteínas mitocondriales, de la cadena de transporte de electrones y de la ATP sintasa sugiriendo la existencia del complejo  $F_1F_0$  en las balsas lipídicas de la membrana plasmática. En este trabajo sólo la existencia de las subunidades  $F_1$ -ab fueron confirmadas por otros métodos experimentales<sup>23</sup>.

**En membrana plasmática  $F_1$ -ab como receptor de apolipoproteína A-I.** En la membrana plasmática de hepatocitos se ha identificado inmunológicamente la presencia de las

subunidades  $F_1$ -ab que actúan como receptores de la apolipoproteína A-Ie inducen la endocitosis de las lipoproteínas de alta densidad y del colesterol. La membrana plasmática del hepatocito hidroliza ATP y la hidrólisis es inhibida por la proteína inhibidora ( $F_1I$ ), adicionada exógenamente la hidrólisis de ATP produce ADP que se requiere para la endocitosis, lo que ha hecho suponer a los autores que se encuentra el complejo ATPasa completo y funcional en la membrana plasmática<sup>24</sup>.

#### **En la membrana plasmática de hepatocitos y de neuronas de la amígdala cerebral la subunidad $F_1$ -b como receptor de enterostatina.**

La enterostatina es un pentapéptido con una secuencia de alanina-prolina-glicina-prolina-alanina. Es producido por el corte proteolítico del amino terminal de la enzima procolipasa y que es liberado en el intestino delgado, en la mucosa gástrica y en ciertas regiones del cerebro como la amígdala. La enterostatina se fija en la subunidad  $F_1$ -b e induce sensación de saciedad en ratas sometidas a dietas elevadas en grasas. Los autores sugieren que una dieta alta en grasas podría ocasionar la localización ectópica de la  $F_1$ -b en la membrana plasmática y actuar como receptor de enterostatina<sup>25</sup>.

#### **En adipocitos**

En adipocitos humanos y en fibroblastos inducidos a diferenciarse en adipocitos se encontró un aumento en la biogénesis mitocondrial y la localización ectópica del complejo de ATP sintasa en las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Se identificaron las subunidades  $F_1$ -ab por inmunolocalización y se midió síntesis de ATP sensible a inhibidores mitocondriales como la oligomicina y a desacoplantes. Los autores afirman que la enzima de la membrana plasmática tiene la función de generar ATP extracelular para cumplir funciones como regulador de receptores y como molécula de señalización<sup>26</sup>.

#### **En células endoteliales**

La mayor parte de las localizaciones ectópicas de los complejos de la ATP sintasa se han descrito en células endoteliales: estas células que recubren los vasos sanguíneos, mantienen la homeostasis vascular, toman parte importante en la angiogénesis y están sometidas a cambios hemodinámicos que contraen o dilatan los capilares y que regulan muchas de sus funciones.

Las células endoteliales han cobrado una gran importancia durante algunos procesos patológicos, como en el desarrollo de tumores y su capacidad de producir metástasis. Son las células implicadas en la angiogénesis que es un proceso consistente en la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales y que es finamente regulada por factores inductores e inhibidores. Existe un factor que estimula el crecimiento de las células endoteliales (VEGF, vascular endothelial growth factor) y la angiostatina, por el contrario, inhibe su crecimiento. La angiogénesis se estimula durante procesos patológicos como la

trombosis y la fibrinólisis, en la coagulación, la inflamación y en los procesos tumorales, favoreciendo la formación de metástasis. Las células endoteliales se unen entre sí a través de uniones fuertes por las proteínas ocludinas, con uniones adherentes por las cadherinas y a través de las uniones tipo gap. Durante la inflamación se liberan citocinas, como el TNF (factor de necrosis tumoral) por las células fagocíticas mononucleares y factores de adhesión que inducen apoptosis. Por otro lado, las células endoteliales de los vasos cerebrales interactúan con los astrocitos y forman la barrera hematoencefálica<sup>27</sup>.

**Las subunidades  $F_1$ -ab como receptor de angiostatina.** En cultivos primarios de células endoteliales del cordón umbilical de humanos se han realizado los más importantes hallazgos de las localizaciones ectópicas de la ATP sintasa o de sus subunidades.

Las subunidades  $F_1$ -ab se han identificado como el receptor de angiostatina. La angiostatina es un péptido derivado del plasminógeno cuya función es inhibir la angiogénesis. Las células endoteliales hidrolizan y sintetizan una cantidad muy marginal de ATP que se inhibe por angiostatina. Esto sugiere la existencia del complejo  $F_1F_0$  completo en la membrana plasmática, sin embargo, aún no se han identificado más que las subunidades  $F_1$ -ab. La cantidad de ATP sintetizado es sensible a inhibidores de  $F_1$  y a desacoplantes, lo cual sugeriría que utiliza un gradiente electroquímico, que en ausencia de un generador como la cadena de transporte de electrones mitocondrial no se conoce todavía<sup>28</sup>.

**La subunidad  $F_1$ -a como receptor de la citosina p43.** En membranas plasmáticas derivadas de células endoteliales procedentes de la aorta de bovino se encontró que el extremo carboxilo de la citosina p43 que induce junto con el TNF una respuesta inflamatoria y apoptosis, produce una respuesta antiangiogénica al unirse a su receptor en la membrana plasmática identificado como  $F_1$ -a<sup>29</sup>.

**La síntesis de ATP extracelular por la ATP sintasa regula la angiogénesis.** Se midió síntesis extracelular de ATP en células endoteliales del cordón umbilical de humanos. Los valores de ATP son altos y sensibles a inhibidores de  $F_1$  y de  $F_1F_0$ , así como a desacoplantes. Sugiriendo la existencia del complejo  $F_1F_0$  completo y que el mecanismo de síntesis sea a través de un potencial electroquímico. La inhibición de la síntesis de ATP por la enzima de membrana plasmática, inhibió la proliferación de las células del cordón umbilical. Los autores sugieren que estos inhibidores de la síntesis podrían ser usados como fármacos anticancerígenos<sup>30</sup>.

**Localización en la membrana plasmática de la subunidad reguladora de la  $F_1F_0$  ATP sintasa ( $F_1I$ ).** Recientemente nuestro grupo de trabajo se ha abocado a identificar las subunidades de  $F_1F_0$  ATP sintasa en la membrana plasmática de las células del endotelio vascular del cordón umbilical. Las células endoteliales intactas contienen además de las subunidades  $F_1$ -ab, ya



identificadas por otros grupos, la proteína  $F_1F_0$  cuya función en la membrana plasmática parece no estar relacionada con la función reguladora que ejerce en la mitocondria<sup>31</sup>.

El grupo de Pizzo encontró en las células fijadas del cordón umbilical de humanos la presencia de la proteína inhibidora de la  $F_1$  ( $IF_1$ ). Sus datos parecen indicar que su presencia no tiene relación clara con la angiogénesis<sup>32</sup>.

## 2) Localizaciones ectópicas en condiciones patológicas

### La subunidad $F_1$ -a como componente estructural de las neurofibrillas amiloideas en la enfermedad de Alzheimer

Se ha encontrado en las neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer que en las neurofibrillas amiloideas se encuentra como un componente importante la subunidad  $F_1$ -a<sup>33</sup>.

### La subunidad $F_0$ -c forma poros en la membrana plasmática de células excitables produciendo la enfermedad lipofuscinosis ceroides neural o enfermedad de Batten

La subunidad  $F_0$ -c de la ATP sintasa se ha encontrado en la membrana plasmática de células del miocardio, neuronas cerebrales y neuronas de retina formando poros de 10 componentes que inducen el paso indiscriminado de iones sodio y calcio, factores que producen una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la presencia de cuerpos de inclusión en el tejido cerebral. El aumento de los canales y el cambio de composición de los iones intracelulares producen alteraciones y muerte de las células afectadas<sup>34</sup>.

### Las células tumorales tienen subunidades $F_1$ -a y b en la membrana plasmática que es reconocida por los linfocitos T citotóxicos

La localización de las subunidades  $F_1$ -a y b en la superficie de la membrana plasmática de las células de diferentes líneas tumorales, permite que los linfocitos T citotóxicos las reconozcan y ejerzan su actividad citolítica. La expresión de las subunidades  $F_1$ -a y b se hace en forma disociada sugiriendo un polimorfismo de la estructura, sin embargo, es improbable que se localicen en forma aislada en la membrana plasmática, ya que no contienen dominios transmembranales que les permitan anclarse<sup>35,36</sup>.

## CONCLUSIONES

Es indudable que a medida que hemos enriquecido nuestros conocimientos sobre la estructura y las funciones de la ATP sintasa mitocondrial y sus parientes más cercanas las ATPasas de arqueobacterias y de vacuolas, así como de su pariente más lejano, la  $H^+$  pirofosfatasa membrana; el campo de la bioenergética se ha ampliado y diversificado; por otro lado, las localizaciones ectópicas del complejo  $F_1F_0$  mitocondrial a la membrana plasmática han abierto nuevos horizontes a la bioenergética tradicional que inciden en áreas de regulación de procesos como la angiogénesis o la apoptosis en las que las mitocondrias y sus componentes ejercen un papel desencadenante y regulador o sus

insospechadas relaciones con el metabolismo de lípidos, la fusión de membranas y la endocitosis.

Sus funciones de receptores de moléculas tan diferentes como la angiotatina, la enterostatina, la apolipoproteína A-I o la citosina p43. Su papel en procesos patológicos como la inflamación y la angiogénesis tumoral, la enfermedad de Alzheimer o de Batten, nos pondrían en alerta para tratar de comprobar cuáles de estos numerosos y diferentes efectos son reales o nos encontramos en presencia de sofisticados artefactos metodológicos que es necesario aclarar.

Estos hallazgos, de ser reales, revolucionan el campo de la bioenergética y amplían de una manera insospechada sus alcances, tratando de explicar desde el origen de estos segmentos enzimáticos y sus funciones en el intrincado metabolismo celular, así como la posible cura de enfermedades como el cáncer y otras de etiología hasta ahora desconocidas.

Sea cual fuere el resultado de estos nuevos hallazgos hay que reconocer que hacen del campo de la investigación a todos los niveles un reto excitante difícil de superar por cualquier otra actividad humana.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT el financiamiento del proyecto "Expresión y función de la  $F_1F_0$  ATP sintasa en la membrana plasmática de células endoteliales asociadas a la angiogénesis".

## REFERENCIAS

1. Baltscheffsky, H. Energy conversion leading the origin and early evolution of life: did inorganic Pyrophosphate precede Adenosine Triphosphate. in *Origen and Evolution of Biological Energy Conversion*. Edited by H. Baltscheffsky. Wiley-VCH. 1996. Chapter 1. pp. 1-9
2. Yoshida, M., Muneyuki, E. & Isabori, T. ATP synthase. A marvelous rotatory engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 669-677 (2001).
3. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature* **191**, 144-148 (1961).
4. Gay N.J. & Walker, J.E. The atp operon: nucleotide sequence of the region encoding the alpha subunit of *Escherichia coli* ATP synthase. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2187-2194 (1981).
5. Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. Structure at 2.8 Å resolution of  $F_1$  ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628 (1994).
6. Shirakihara, Y. *et al.* The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of  $F_1$ -ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer. *Structure* **5**, 567 (1995).
7. Stock, D., Leslie, A.G. & Walker, J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705 (1999).
8. Karrasch, S. & Walker, J.E. Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **290**, 379-384 (1999).
9. Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L. &

- Fillingame, R.H. Solution structure of the transmembrane H<sup>+</sup>-transporting subunit c of the  $F_1F_0$  ATP synthase. *Biochemistry* **37**, 8817 (1998).
10. Boyer, P.D. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* **512**, 29-32 (2002).
  11. Noji, H. *et al.* Rotation of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **260**, 597-599 (1999).
  12. Oster, G. & Wang, H. Why is the mechanical efficiency of F<sub>1</sub>-ATPase so high. *J. Bienerg. and Biomemb.* **32**, 459-469 (2000).
  13. Cabezon, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G. & Walker, J.E. Dimerization of bovine F<sub>1</sub> ATPase by binding the inhibitor protein, IF<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* **37**, 28353-28355.
  14. Domínguez-Ramírez, L., Mendoza-Hernández, G., Carabez Trejo, A., Gómez-Puyou, A. & Tuena de Gómez-Puyou, M. Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F<sub>1</sub> inhibitor complexes. *FEBS Lett.* **507**, 191-194 (2001).
  15. Domínguez-Ramírez, L. *et al.* Interconversion between dimers and monomers of endogenous mitochondrial F<sub>1</sub>-inhibitor protein complexes and the release of the inhibitor protein. Spectroscopic characteristics of the complexes. *J. Bioenerg. Biomemb.* **36**, 503-513 (2004).
  16. Green, D.W. & Grover, G.J. The IF<sub>1</sub> inhibitor protein of the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* **1458**, 343-355 (2000).
  17. Muller, V. & Gruber, G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters CML S. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 474-494 (2003).
  18. Schultz, A. & Baltscheffsky, M. Properties of mutated *Rhodospirillum rubrum* H<sup>+</sup>-pyrophosphatase expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1607**, 141-151 (2003).
  19. Mayor, S. & Rao, M. Rafts: Scale depend, active lipid organization at the cell surface. *Traffic* **5**, 231-240 (2004).
  20. Avni, A., Avital, S. & Grommet-Elhanan, Z. (1991) Reactivation of the chloroplast CF<sub>1</sub> ATPase beta subunit by trace amounts of CF<sub>1</sub> alpha suggest a chaperonin like activity of CF<sub>1</sub> alpha. *J. Biol. Chem.* **266**, 7317-7320.
  21. Osanai, T. *et al.* Mitochondrial coupling factor 6 as a potent endogenous vasoconstrictor. *J. Clin. Invest.* **108**, 1023-1030 (2001).
  22. Morel, N., Dunant, Y. & Israel, M. Neurotransmitter release through the V<sub>0</sub> sector of the V ATPase. *J. Neurochem.* **79**, 485-488 (2001).
  23. Bae, J.T. *et al.* Lipid raft proteoma reveals ATP synthase complex in cell surface. *Proteomics* **4**, 1-13 (2004).
  24. Martínez, O.L. *et al.* Ectopic beta chain of ATP synthase is a apolipoprotein A-1 receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* **421**, 76-79 (2003).
  25. Park, M.J. *et al.* The F<sub>1</sub> ATPase beta subunit is the putative enterostatin receptor. *Peptides* **25**, 2127-2133 (2004).
  26. Kim, B.W., Choo, H.J., Lee, J.W., Kim & Ko, Y.G. Extracellular ATP is generated by ATP synthase in adipocyte lipid rafts. *Experimental and Molecular Medicine* **36**, 476-485 (2004).
  27. Huang Zy Bao, S.D. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* **10**, 463-470 (2004).
  28. Moer, L.T. *et al.* Endothelial cell surface F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *PNAS* **98**, 6656-6661 (2001).
  29. Chang, S.J., Park, J.S., Kim, S. & Kang, C.Y. Interaction of the c terminal domain of p43 and the alpha subunit of ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **277**, 8388-8394 (2002).
  30. Araraki, N. *et al.* Possible role of cell surface H<sup>+</sup> ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Molecular Cancer Research* **1**, 931-939 (2003).
  31. Cortés-Hernández, P. *et al.* The inhibitor protein of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **330**, 844-849 (2005).
  32. Burwick, N.R. *et al.* An inhibitor of the F<sub>1</sub> subunit of ATP synthase (IF<sub>1</sub>) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J. of Biol. Chem.* en prensa (2004)
  33. Sergeant, N. *et al.* Association of ATP synthase alpha chain with de neurofibrillary degeneration in Alzheimer disease. *Neuroscience* **117**, 293-303 (2003).
  34. McGeoch, J.E.M. & Palmer, D.N. Ion pores made of mitochondrial ATP synthase c subunit in the neuronal plasma membrana and Batten disease. *Molecular Genetics and Metabolism* **66**, 387-392 (1999).
  35. Ballbh, D. *et al.* A novel ligand in lymphocyte mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H<sup>+</sup> transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines. *J Exp. Med.* **180**, 273-281 (1994).
  36. Scotet, E. *et al.* Tumor recognition following Vgamma9V delta2 T cell receptor interactions with a surface F<sub>1</sub>-ATPase related structure and Apolipoprotein A-I. *Immunity* **22**, 71-80 (2005).