

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA ATP SINTASA DE LAS ARQUEAS AERÓBICAS

Héctor Vicente Miranda-Astudillo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-600,
C.P.04510, Coyoacán, México, D.F. E-mail: hmiranda@email.ifc.unam.mx

RESUMEN

Desde el descubrimiento de las arqueas ha llamado la atención su capacidad para sobrevivir en ambientes difíciles. A través de los años, las arqueas han pasado de ser rarezas extremófilas a ser consideradas organismos de importancia universal que han sido utilizados para elucidar preguntas biológicas fundamentales. La filogenia del dominio Arquea se encuentra en constante cambio y cuenta hasta la fecha con 5 ramas principales: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota y Nanoarchaeota. En el presente trabajo se enlistan las principales características estructurales de los complejos respiratorios de los géneros de arqueas aeróbicas más estudiados. Se presenta una comparación morfológica de la ATP sintasa de estos organismos con el resto de la familia de las ATPasas rotatorias (F- y V-ATPasas); así como un análisis topológico de este complejo enzimático (A_1A_o -ATP sintasa) tomando como base la función de cada una de las subunidades que lo conforman.

Palabras Clave: ATPasas rotatorias, A_1A_o -ATP sintasa, cadena respiratoria, dominio Arquea.

ABSTRACT

Ever since Archaea were discovered, their ability to thrive in extreme environments has attracted much attention. Over the years, archaea have gone from microbial extremophilic oddities to organisms of universal importance and have been used to elucidate fundamental biological questions. The phylogeny of the Archaea domain is in constant evolution; to this day it is composed by five main branches: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota and Nanoarchaeota. In the present study, we list the main structural features of the respiratory complexes of the most studied genera of aerobic archaea. We present a morphological comparison of the ATP synthase of these organisms with the rest of the family of rotary ATPases (F- and V-ATPas) as well as a topological analysis of this enzymatic complex (A_1A_o -ATP synthase) based on the function of each of the subunits that comprise it.

Key Words: Rotary ATPases, A_1A_o -ATP synthase, respiratory chain, Archaea domain.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las arqueas su capacidad para sobrevivir en ambientes difíciles con temperaturas elevadas, pHs extremos o altas concentraciones de sales ha llamado la atención. Aun cuando comparten muchas características básicas de su maquinaria genética y metabólica con las bacterias¹, se ha propuesto que la organización estructural y metabólica de las

arqueas corresponde a organismos ancestrales, ya que poseen propiedades esenciales distintas de las bacterias y eucariotas, que las ubican filogenéticamente más cerca de la raíz hipotética del árbol de la vida². A través de los años, las arqueas han pasado de rarezas extremófilas a organismos de importancia universal pues han sido utilizadas para elucidar preguntas biológicas fundamentales³.

Nota: Artículo recibido el 29 de agosto de 2012 y aceptado el 01 de octubre de 2012.

A la fecha, el árbol filogenético de las arqueas se separa en dos grandes ramas: la Crenarchaeota y la Euryarchaeota; y tres

menores: Thaumarchaeota, Korarchaeota y Nanoarchaeota⁴ (Figura 1)⁵, esta última representada únicamente por la especie *Nanoarchaeum equitans*, la cual crece adherida a la superficie de otra arquea del género *Ignicoccus*⁶. Aún no se ha logrado cultivar algún miembro de la rama Korarchaeota y este grupo de organismos sólo ha sido identificado por estudios metagenómicos⁷. El grupo Thaumarchaeota está formado solamente por la especie mesófila *Cenarchaeum symbiosum*⁸. Por su parte, el grupo Crenarchaeota está constituido en su mayoría por organismos hipertermófilos que se consideran modelos de la vida temprana en la Tierra. Finalmente, la rama Euryarchaeota es filogenéticamente muy diversa e incluye metanógenos anaeróbicos estrictos, halófilos extremos y acidófilos extremos como los *Thermoplasmatales*⁵.

Las arqueas son un grupo muy heterogéneo con respecto a su metabolismo energético. Dentro de las reacciones asociadas con la obtención de energía en este grupo de organismos, se encuentran: respiración aeróbica y anaeróbica (que utilizan oxígeno y azufre/nitratos, respectivamente), fermentación, fotorrespiración anaeróbica (que utiliza bacteriorodopsina como bomba de protones activada por luz), reacciones de transferencia de metilos para generación de gradientes de sodio e hidrogenasas reductoras de protones⁹. En este sentido, debe remarcarse que la conservación de energía para la mayoría de las formas existentes de vida recién en el principio universal de transducción quimiosmótica¹⁰, que en términos filogenéticos evolucionó de forma temprana. En las arqueas la síntesis de ATP se encuentra acorde con la teoría quimiosmótica, basada en gradientes de iones a través de membranas. La Figura 2a ilustra los procesos para la generación de gradientes iónicos mediante bombas primarias y su utilización en la síntesis de ATP en arqueas.

En las siguientes secciones, se revisan las propiedades estructurales de los complejos membranales respiratorios involucrados en la síntesis de ATP en las arqueas aeróbicas, principalmente la ATP sintasa de arqueas (A_1A_o -ATP sintasa). Con respecto al resto de la bioenergética de estos organismos existen revisiones excelentes^{5,9,11,12}, por lo que esos aspectos no se abordarán en este trabajo.

COMPONENTES DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

El paradigma derivado de los estudios de la cadena respiratoria mitocondrial y de bacterias sugiere la presencia de cuatro complejos principales para una generación óptima de energía. En este esquema, el complejo I actúa como una NADH deshidrogenasa (NDH) en el punto más bajo de su potencial, mientras que el complejo II sirve como una succinato deshidrogenasa (SDH); ambos son reductores de quinonas (Q). Las quinonas reducidas son reoxidadas por el complejo III, llamado complejo *bc1*, el cual transfiere los electrones a un acceptor proteico de potencial mayor en la fase acuosa, el citocromo *c* (cyt *c*), que finalmente transfiere los electrones a una oxidasa

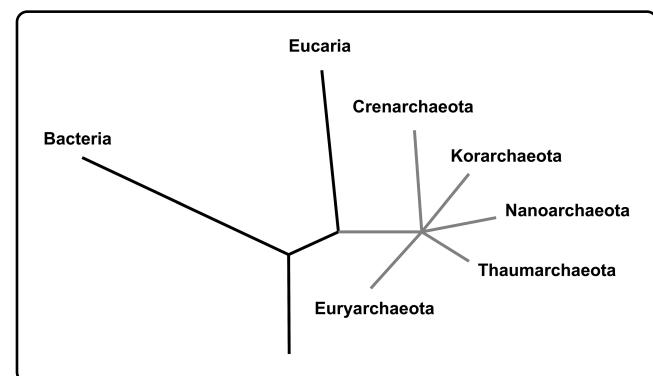


Figura 1. Esquema filogenético de las arqueas. Se observa la posición relativa de los tres dominios y las ramas del dominio Arquea (en gris) (Elaborado a partir de Gupta & Shami (2011)⁴ y Lewalter & Müller (2006)⁵).

terminal (complejo IV) (Figura 2b). En contraste con este concepto clásico, los complejos integrales de membrana encargados del transporte de electrones en algunas arqueas pueden estar fusionados y, en algunos casos, tener composiciones polipeptídicas inusuales^{13,14}.

Dentro del estudio reciente del metabolismo de las arqueas el papel preponderante lo ocupan los organismos metanogénicos, seguido de los implicados en los ciclos del azufre y nitrógeno, debido a su importancia ecológica y biotecnológica³. El grupo de arqueas aeróbicas estudiado se reduce a pocos géneros entre los que destacan: *Acidianus*, *Aeropyrum*, *Halobacterium*, *Picrophilus*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma* y *Metallosphaera*^{9,14,15}. Sin embargo, existen muy pocos estudios estructurales de los complejos respiratorios de estos géneros de microorganismos. La Tabla I^{13,15-30} presenta las características principales encontradas en los complejos respiratorios de arqueas aeróbicas.

De algunos de estos organismos sólo se conoce su carácter aeróbico, no existen estudios bioquímicos o genéticos sobre sus complejos respiratorios, como es el caso del género *Picrophilus*; por otro lado, existen géneros que se destacan por el estudio de su complejo V³¹⁻³³, pero en cuanto a sus complejos respiratorios no hay estudios bioquímicos o estructurales disponibles.

A_1A_o -ATP SINTASA (EC 3.6.3.14)

Como se mencionó, dentro del dominio Arquea existe una gran diversidad de formas de obtención del potencial electroquímico de membrana y la mayoría de estas rutas convergen en el complejo A_1A_o -ATP sintasa (Figura 2a). Este complejo se encuentra presente en todas las arqueas secuenciadas y, en la mayoría de estos organismos, es el encargado de llevar a cabo la síntesis de ATP³⁴. Sin embargo, para obtener un modelo universal de la ATPasa de arqueas deben tomarse en cuenta todas las diferencias fisiológicas dentro del dominio Arquea.

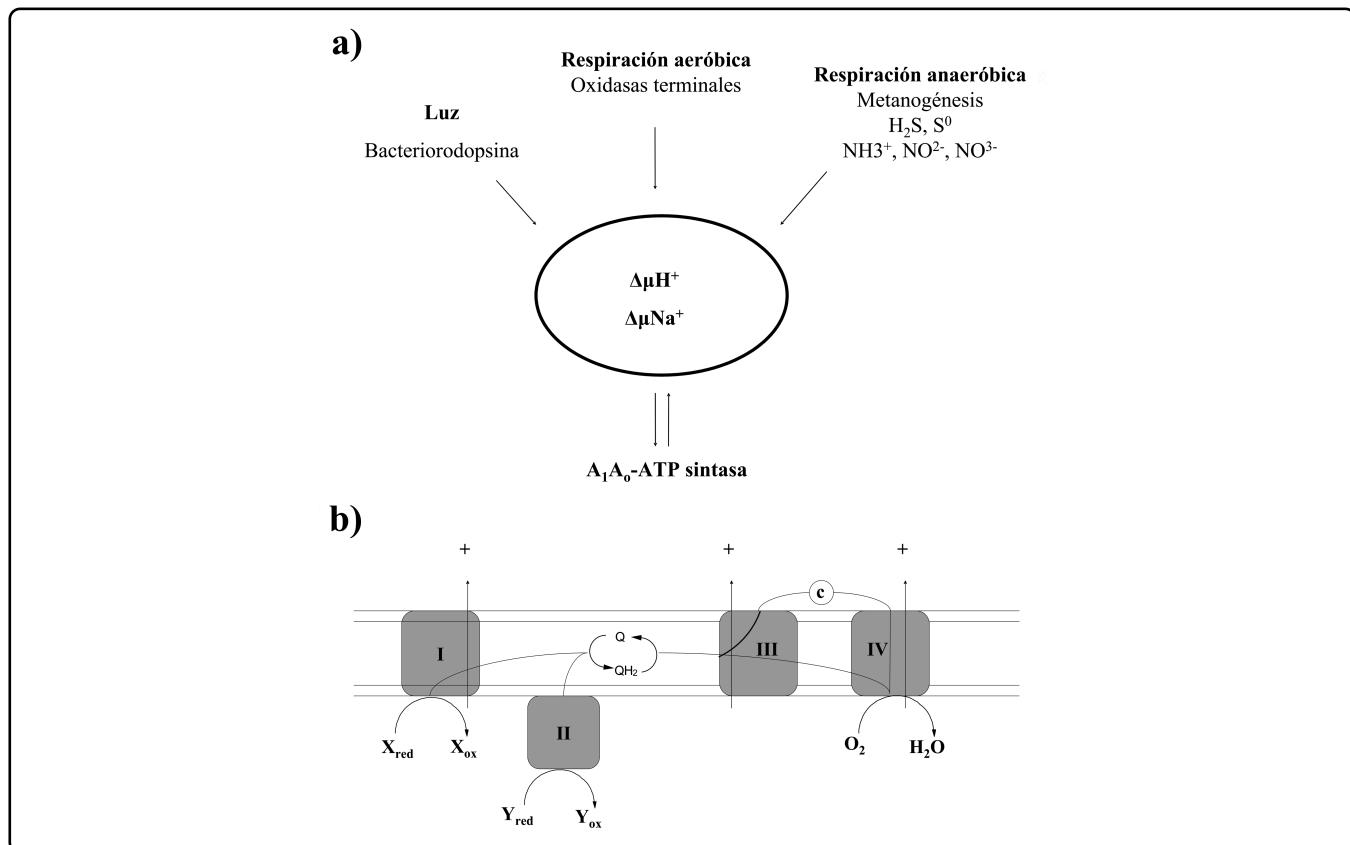


Figura 2. Procesos de transducción primaria de energía y modelo de cadena respiratoria en arqueas. a) Procesos que contribuyen a la formación de un potencial electroquímico de membrana ($\Delta\mu\text{H}^+$ o $\Delta\mu\text{Na}^+$) a través de la membrana plasmática en arqueas. Modificado de Schäfer *et al.* (1999)⁹. b) Esquema de la cadena de transporte de electrones en arqueas. I: X: quinona oxidoreductasa (X = NAD(P)H, F_{420}H_2 , otros; II: Y: quinona oxidoreductasa (Y = succinato); Q/ QH_2 : quinona oxidada/reducida; III: quinol: acarreador de e^- oxidoreductasa; c: acarreador de e^- soluble; IV: acarreador de e^- : O_2 oxidoreductasa. Modificado de Pereira *et al.* (2004)¹⁵.

Los metanógenos son estrictamente quimiosmóticos, lo que significa que es indispensable una enzima que sintetice ATP³⁵. Por otro lado, los halófilos pueden realizar respiración/fotosíntesis, e igualmente fermentación; en este caso necesitan una enzima capaz de trabajar en ambas direcciones (síntesis e hidrólisis)³⁶. La mayoría de los hipertermófilos son estrictamente anaerobios y la obtención de ATP se encuentra ligada a la enzima Acetil CoA sintetasa (ACS), en donde el ATP se forma a partir de un derivado de CoA, ADP y fosfato inorgánico³⁷, por lo tanto, no hay necesidad de una A_1A_0 -ATP sintasa.

Se ha propuesto que las ATPasas provienen de un ancestro común, la hipótesis más aceptada postula que un organismo anaeróbico desarrolló una bomba de protones dependiente de ATP para la formación de un gradiente en su membrana, esta enzima evolucionó a una ATP sintasa y, posteriormente, a una bomba de H^+ ajustando nuevamente la relación estructural mediante la duplicación de genes en el rotor y la inactivación de sitios catalíticos en el sector soluble, a fin de modificar la relación H^+/ATP de acuerdo a la función a desarrollar^{34, 38} (Figura 3).

La familia de los complejos membranales de ATPasas rotatorias contiene tres miembros y cada uno juega un papel fundamental en la conversión de la energía. La F_1F_0 -ATPasa (F-ATPasa) acopla la síntesis de ATP con el potencial electroquímico de membrana ($\Delta\mu$) en bacteria, mitocondria y cloroplasto, mientras que la H^+ -ATPasa (V-ATPasa) opera como una bomba de protones dependiente de la hidrólisis de ATP en membranas de eucariontes. En diferentes especies de arqueas y bacterias, la A_1A_0 -ATPasa (A-ATPasa) puede funcionar tanto como una ATP sintasa o como una bomba de iones³⁹. Basados en su composición polipeptídica y la secuencia primaria de las subunidades, las A-ATPasas se encuentran más relacionadas con las V-ATPasas que con las F-ATPasas⁴⁰. Morfológicamente, las A- F- y V-ATPasas contienen tres componentes (Figura 4a y 4b): un dominio de membrana $\text{A}_0/\text{F}_0/\text{V}_0$ formado por el canal de protones, un tallo central (rotor) y un dominio soluble $\text{A}_1/\text{F}_1/\text{V}_1$ que contiene las subunidades catalíticas⁴¹⁻⁴³. Una diferencia fundamental entre las ATPasas tipo V- y A- es la disociación reversible del dominio V_1 del V_0 como un mecanismo de regulación *in vivo* de la actividad de ATPasa⁴⁴.

Género	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	Referencias
<i>Acidianus</i>	Tipo II (FAD unido por enlace covalente)	Tipo E; FAD unido por enlace covalente, carece del FS3 sustituido por [4F-4S]. Carece del sitio de unión a la membrana típico (SdhC + SdhD); se propone que sólo la subunidad SdhC lleva a cabo esta función.	Citocromo <i>ba</i>	Citocromo <i>aa</i> ₃ (carece de residuo conservado I-286)	16, 17, 18, 19, 20, 21
<i>Aeropyrum</i>	—	Tipo A	Citocromo <i>bc</i>	Citocromo <i>ba</i> ₃ y Citocromo <i>aa</i> ₃ (inhibidos con cianuro y azida; pH óptimo 6.8 y 7.4, respectivamente)	15, 22, 23
<i>Halobacterium</i>	Tipo II	Sdh típica (inhibida por malonato)	Análogo citocromo <i>bc</i> ₁	Citocromo <i>c</i> oxidasa	24, 25
<i>Pyrobaculum</i> ^a	NADH oxidasa*	Tipo C; Subunidades*: FAD, Fe/S, citocromo <i>b</i>	Citocromo <i>b</i> ₅₅₉ * - FS*	Citocromo <i>aa</i> ₃ (inhibido con cianuro y azida)	15, 26, 27
<i>Sulfolobus</i>	Tipo II (FMN unido por enlace covalente)	Tipo E: unido mediante la subunidad SdhC, no contiene grupo hemo	citocromo <i>b</i> ₅₆₂ + citocromo <i>a</i> ₅₈₃ - <i>aa</i> ₃ (un solo complejo; carece de citocromo <i>c</i>)		13, 28, 29
<i>Metallosphaera</i>	Tipo II*	SdhABCD*		5 oxidadas terminales*: SoxABCDL (<i>aa</i> ₃), SoxEFGHIM (<i>bb</i> ₃), DoxBCE (<i>aa</i> ₃), SoxNL-CbsAB y FoxABCD	30

*Propuestos con base en información de genomas. ^aLa cadena es expresada constitutivamente, incluso en anaerobiosis.

Tabla I. Principales características de los complejos respiratorios de los géneros más estudiados de arqueas aeróbicas.

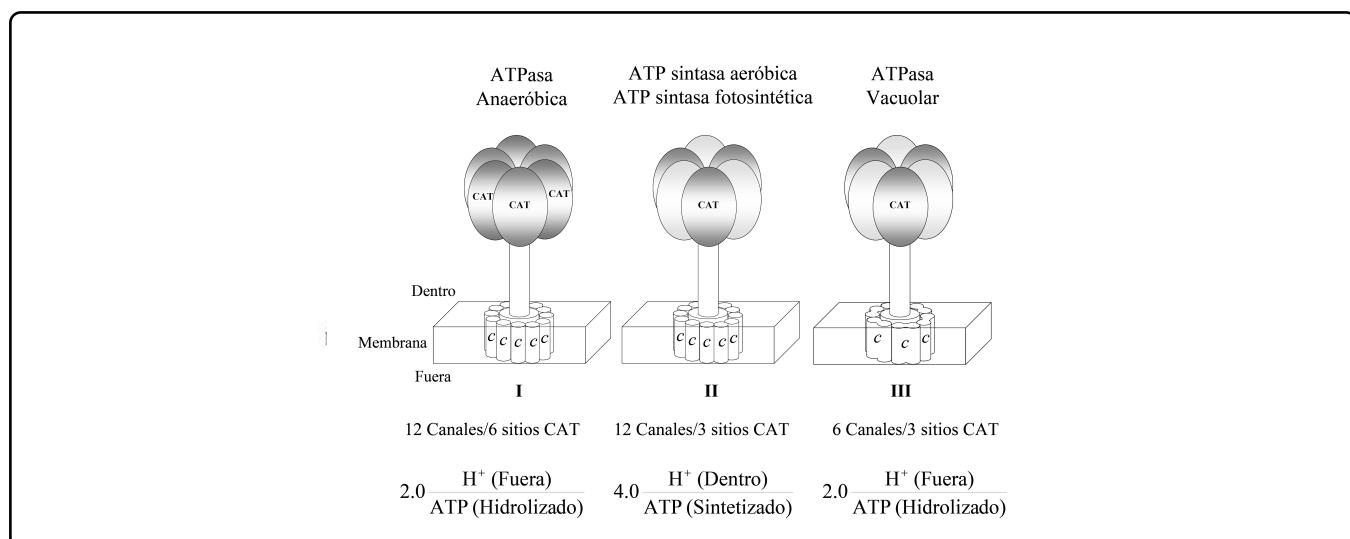


Figura 3. Evolución de las ATPasas rotatorias. La bomba de protones dependiente de ATP anaeróbica ancestral evolucionó hacia una ATP sintasa aeróbica (I → II), acompañando este cambio de función ocurrió una duplicación de genes de la subunidad catalítica (CAT), lo que provocó la pérdida de la función de tres de ellas, duplicando la relación H⁺/ATP. El siguiente cambio en la función generó una bomba de protones dependiente de ATP, nuevamente (II → III) acompañada de una duplicación en los genes de la subunidad *c* que provocó la pérdida de la mitad de sitios en el canal de H⁺, disminuyendo la relación H⁺/ATP a 2.0. Modificado de Cross & Taiz (1990)³⁸.

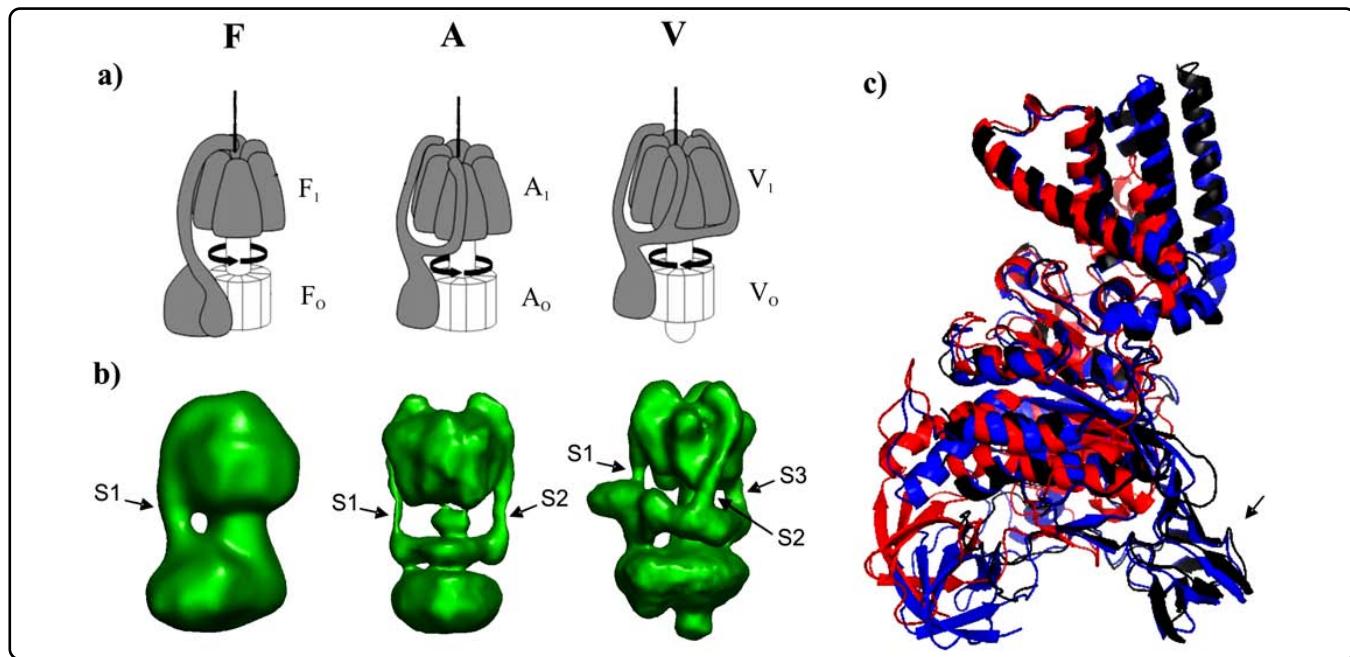


Figura 4. Modelo tridimensional de los elementos rotor/estator y sobreposición de las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas. a) Esquema de organización de los dominios de las -F, -A y -V ATPasas, las flechas indican la dirección relativa de giro del rotor central durante la síntesis de ATP (-F, -A) e hidrólisis de ATP (-V). Modificada de Muench *et al.* (2011)³⁹. b) Modelos tridimensionales obtenidos por microscopía electrónica de las -F, -A y -V ATPasas (F: EMD 1357; A: EMD 1542; V: EMD 1590), se observa la presencia de 1, 2 y 3 brazos periféricos para las -F, -A y -V ATPasas, respectivamente, y una estructura tipo "collar" en las -A y -V ATPasas. Modificada de Muench *et al.* (2011)³⁹. c) Sobreposición de las estructuras cristalográficas correspondientes a las subunidades catalíticas de las -F, -A y -V ATPasas (se utilizaron las estructuras obtenidas a la mayor resolución disponible). Negro: subunidad A de A-ATPasa (pdb: 3MFY, 2.35 Å); azul: subunidad A de V-ATPasa (pdb: 3GQB, 2.8 Å); rojo: subunidad β de F-ATPasa (pdb: 2JDI, 1.9 Å), la flecha indica la región no homóloga (NHR).

Debido a su origen común, las subunidades mayores de las A-ATPasas comparten cerca del 50% de identidad en la secuencia con las V-ATPasas y alrededor del 25% con las F-ATPasas⁴⁵. Las estructuras cristalográficas de las subunidades catalíticas de los tres tipos de ATPasas al empalmarse muestran que la diferencia primordial entre estas estructuras es la denominada región no homóloga (NHR) (Figura 4c), que se encuentra presente en las ATPasas tipo -V y tipo -A, únicamente, y se ha sugerido que juega un papel en la regulación de la actividad enzimática⁴⁶.

Los modelos tridimensionales obtenidos mediante criomicroscopía electrónica de la A-ATPasa de *Pyrococcus furiosus* permitieron la observación de lo que corresponde a una estructura de "collar" que actúa como un segundo estator alrededor del núcleo catalítico A_3/B_3 ^{47,48}. Esta estructura se encuentra más pronunciada en la familia de las V-ATPasas como se observa en el modelo del gusano de tabaco, *Manduca sexta*⁴⁹, esta estructura de "collar" no se encuentra en las F-ATPasa (Figura 4b). La A_1A_o -ATP sintasa está compuesta por un dominio catalítico (A_3/B_3), un rotor central (D, F, C y c), dos brazos periféricos (E y G), una región translocadora de protones embebida en la membrana (I) y una estructura tipo "collar" compuesta por el extremo amino de la subunidad I (Figura 5).

A la fecha no se ha reportado la estructura completa de una ATP sintasa. Para este tipo de enzimas existen 155 estructuras disponibles en el banco de datos estructurales de proteínas (PDB), las más completas corresponden a las F-ATPasas mitocondriales de bovino, de levadura y de *E. coli*. En el caso de las A-ATPasas sólo se encuentra disponible un número reducido de estructuras (25), la mayoría de ellas corresponden a subunidades aisladas (A, B, E y F). Uno de los mejores acercamientos a una estructura completa de una V-ATPasa se realizó mediante un empalme de los modelos cristalográficos de las subunidades de 6 especies diferentes ajustando al mapa tridimensional obtenido para la V-ATPasa de *M. sexta*⁴⁹; esta misma estrategia se utilizó para reconstruir un modelo completo para la A_1A_o -ATPasa de la bacteria *Thermus thermophilus*⁵².

NÚCLEO CATALÍTICO

Como se anotó, la estructura del núcleo catalítico de la familia de las ATPasas se encuentra altamente conservada. Se ha propuesto que el trímero de dímeros A/B (β/α para las F-ATPasas) proviene de una duplicación de los genes de la subunidad catalítica y la subsecuente pérdida de la actividad de tres de ellas (Figura 3). Como las A-ATPasas comparten una estructura central con las V-ATPasas, es posible equiparar la

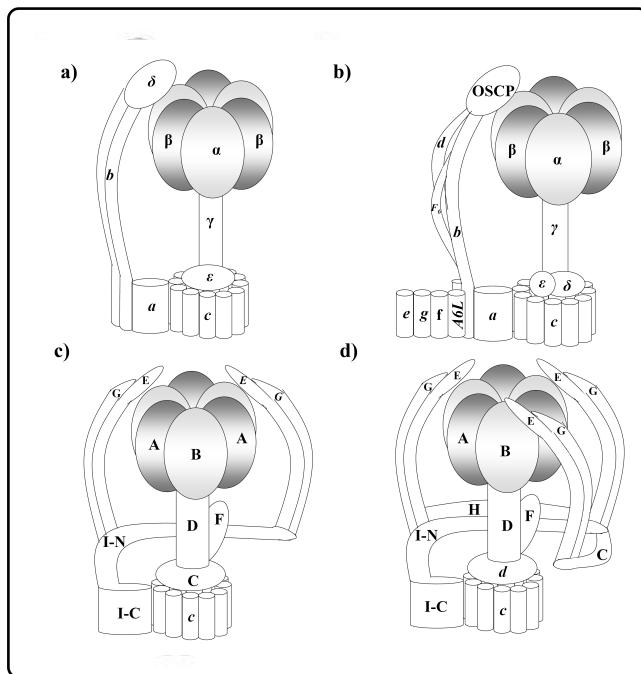


Figura 5. Estructura de las ATPasas rotatorias. Distribución de las subunidades en las -F, -A y -V ATPasas. a) ATP sintasa de *E. coli*. b) Complejo V mitocondrial de corazón de bovino. c) ATP sintasa de Arquea. d) ATPasa vacuolar. Basado en Muench *et al.* (2011)³⁹, Walker & Kane-Dickson (2006)⁵⁰, Cano-Estrada & González-Halphen (2011)⁵¹.

información estructural de estas ATPasas. Existe un total de seis posibles sitios de unión a nucleótido en el sector A₁ localizados en el núcleo catalítico A₃/B₃⁹. Estudios de marcaje de fotoafinidad y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) demostraron que tanto la subunidad catalítica A como la no catalítica B pueden unir análogos de nucleótido a pesar de que la secuencia consenso GXXGXGKTV, denominada región de unión a fosfato P-Loop, no se encuentra en la subunidad B⁵³. El mecanismo catalítico de la A₁A₀-ATP sintasa es acorde con el propuesto por Paul Boyer para la catálisis rotacional⁵⁴ en los tres sitios catalíticos formados en la interfase B-A del dominio A₁.

La estructura cristalográfica de la subunidad A de la A-ATPasa de *Pyrococcus horikoshii* reveló una inserción de aproximadamente 90 residuos en la parte superior, denominada región no homóloga (NHR), la cual no se encuentra en la subunidad no catalítica B de las A/V-ATPasas y en las F-ATPasas (Figura 6a y 6b)⁵⁵. Como se observa en la estructura cristalográfica del sector A₃/B₃ de la bacteria *T. thermophilus*, esta NHR también se encuentra presente en la subunidad A de las V-ATPasas⁵⁶. Lo anterior implica que la estructura global del sector A₁/V₁ difiere notablemente de la estructura semiesférica observada para el dominio F₁ de las F-ATPasas, en donde las subunidades α y β se sobreponen con un RMS menor a 1 sin tomar en cuenta el P-Loop⁵⁷. Estructuralmente, la subunidad B puede ser dividida en tres dominios: amino terminal barril β

(1-71), dominio α/β (113-184) y extremo carboxilo (442-565). Por su parte, la subunidad catalítica A adicionalmente posee el dominio NHR (185-204), el P-loop (222-250), y un asa hidrofóbica (374-407)⁵⁶ (Figura 6a).

CANAL DE H⁺/Na⁺ Y ROTOR CENTRAL

El dominio traslocador de iones (A₀) contiene un anillo de proteolípidos (subunidad c) y una copia de la subunidad anfifílica I que se encuentra adyacente al anillo, ambos forman un canal para el flujo de iones⁵⁸. Por otro lado, el tallo central se compone por las subunidades C, D y F. La subunidad D tiene una estructura larga de hélices entrecruzadas y se inserta en una cavidad hidrofóbica en el interior del núcleo catalítico A₃/B₃⁵⁹ de forma similar a la subunidad γ de las F-ATPAsas⁶⁰. La evidencia experimental de la rotación del tallo central de la A-ATPasa se obtuvo de forma análoga a la del dominio F₁ de la F-ATPasa⁶¹, detectando el movimiento de una perla unida a la subunidad D mediante un filamento de biotina-estreptavidina al agregar ATP que es hidrolizado por el dominio V₁ (A₃/B₃, D, F), que a su vez se encuentra inmovilizado en una superficie por medio de una etiqueta de histidinas en la subunidad A⁶².

Asociada a la subunidad D en el tallo central se ubica la subunidad F que sólo se encuentra presente en las A- y V-ATPAsas y no tiene contraparte en las F-ATPAsas³⁹ (Figura 5). Utilizando estructuras de RMN de segmentos de las subunidades D y B de *Methanoscarcina mazei*, en estudios de dinámica molecular y otros, se ha propuesto que ambas subunidades interaccionan por sus extremos carboxilos de forma tal que la subunidad D adquiere una estructura contraída o elongada acorde a la rotación del tallo central en esta arquea⁶³. Sin embargo, esta interacción no pudo ser corroborada en la estructura cristalográfica obtenida para el dominio V₁ de *Thermus thermophilus* debido a la baja resolución (4.51 Å) del modelo obtenido⁵⁹. En un estudio reciente, se ha propuesto una contribución de esta interacción entre las subunidades D y B en la síntesis de ATP favoreciendo la unión del nucleótido a la subunidad B, acoplando energéticamente la rotación del tallo central con el núcleo catalítico⁶⁴.

En general, las subunidades c que han sido purificadas a partir de arqueas tienen una masa molecular parecida a la subunidad c de las F₁F₀-ATPAsas de aproximadamente 8 kDa con dos segmentos transmembranales⁶⁵⁻⁶⁷. En contraste, algunos metanógenos como *Methanothermobacter thermoautotrophicus* y *M. jannaschii* poseen subunidades de mayor tamaño de dos o tres rizos transmembrana que posiblemente provienen de duplicación y triplicación de genes respectivamente, con la subsecuente fusión de éstos (Figura 7)⁶⁸. En el caso de *M. thermoautotrophicus* el carboxilato del canal de iones se encuentra presente en las hélices 2 y 4, mientras que en *M. jannaschii* se encuentra únicamente en las hélices 4 y 6, dado que en la hélice 2 ha sido sustituido por un residuo de glutamina^{69,70}. En el organismo

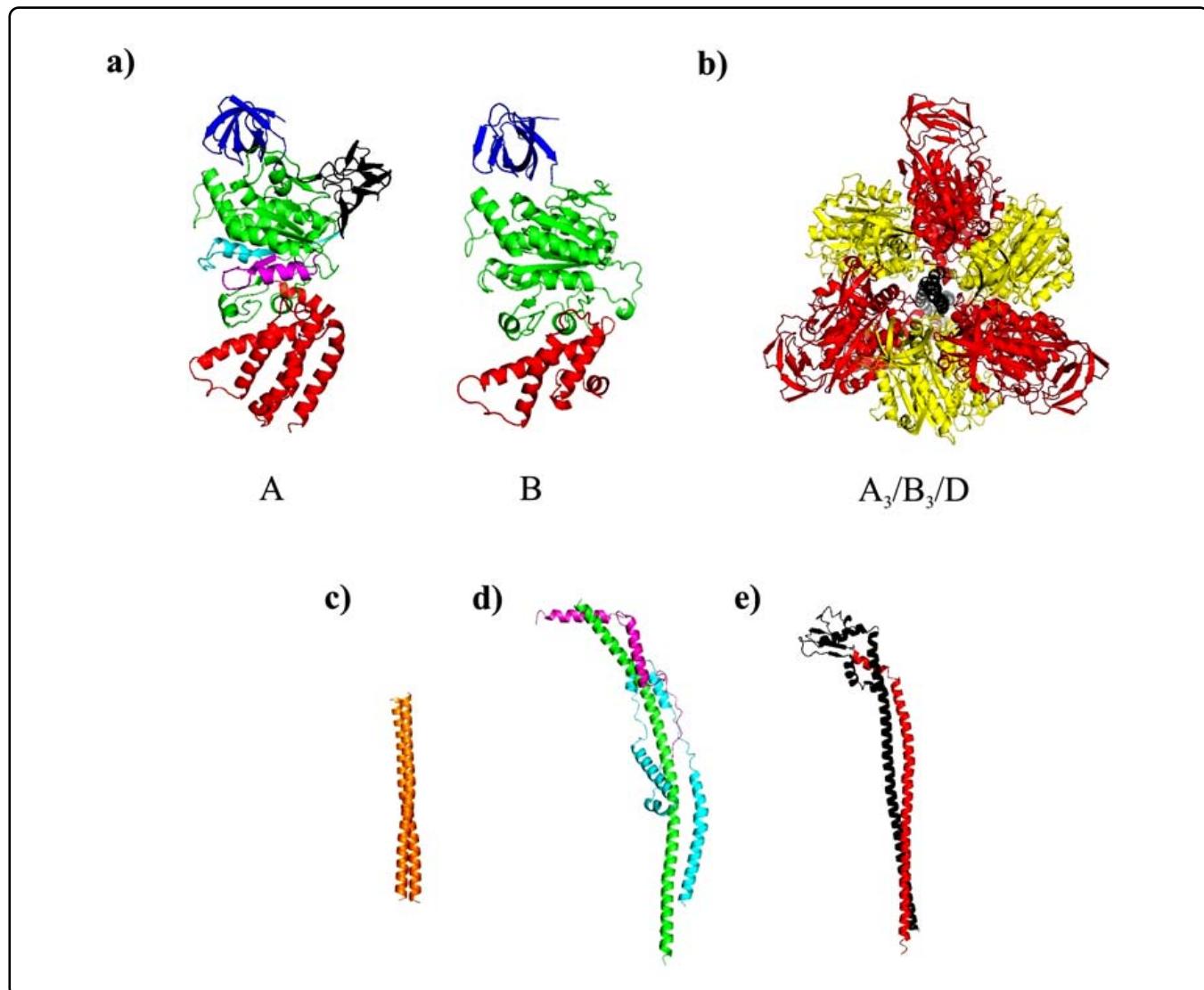


Figura 6. Estructura de las subunidades del núcleo catalítico de la A₃A₁-ATP y de los brazos periféricos de las -F y -V ATPasas. Parte superior: a) Dominios presentes en las subunidades A y B: amino terminal barril β (azul marino), dominio α/β (verde) y extremo carboxilo (rojo), adicionalmente en la subunidad A: dominio NHR (negro), el *P-loop* (azul claro), y un asa hidrofóbica (violeta) pdb 3GQB. b) Estructura del núcleo catalítico A₃/B₃/D; se observa la presencia del dominio NHR en las subunidades A (rojo); subunidad B (amarillo); subunidad D (negro) pdb 3A5C. Parte inferior: Se observa una estructura de hélices entrecruzadas como parte central del brazo. c) Región formadora del dímero (b₆₂₋₁₂₂) de la F-ATPasa de *E. coli* (pdb: 1L2P). d) Brazo periférico (b₇₉₋₁₈₃; d₃₋₁₂₃; F₆₅₋₇₀) del complejo V mitocondrial de bovino (pdb: 2CLY). e) Brazo periférico de la A-ATP sintasa de *T. thermophilus* (subunidades E y G) (pdb: 3K5B).

hipertermófilo *P. furiosus* la subunidad *c* tiene una masa molecular de ~16 kDa. Al purificar la enzima se observó una asociación del oligómero de subunidades *c* y la subunidad *I* de 60 kDa resistente al SDS en geles desnaturizantes⁴⁸. Un caso extraordinario es el organismo *Methanopyrus kandleri* en donde el gen *ntpK* codifica para una subunidad *c* repetida 13 veces y se propone que la base del rotor se forma por una sola subunidad, aunque no es posible descartar una edición postraduccional de la proteína, por lo que el tamaño real de la subunidad en el complejo debe ser verificado⁷¹.

BRAZOS PERIFÉRICOS

El brazo periférico es un componente adicional requerido para contrarrestar la fuerza de torsión mecánica generada por la rotación del tallo central de la enzima durante la síntesis e hidrólisis de ATP, así como para conectar el núcleo catalítico con la base membranal. El número de estos estatores varía según el tipo de ATP sintasa siendo de 1, 2 y 3 para las F-, A- y V-, respectivamente (Figura 5). Cada uno de los tallos periféricos de las enzimas tipo A- y V- se forman por un heterodímero de subunidades E y G^{52,72}, mientras que la composición del brazo

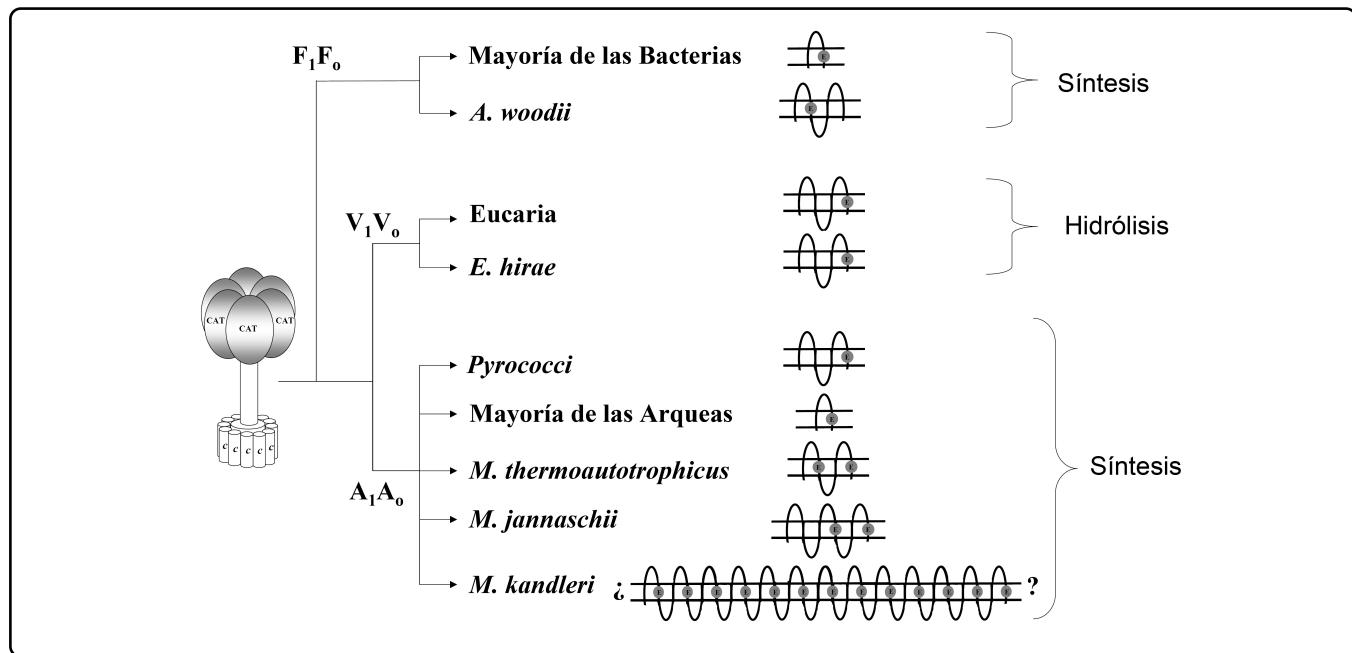


Figura 7. Estequiometría de la subunidad c en las -F, -V y -A ATPasas. Una subunidad c clásica (2 segmentos transmembranales) estaba presente en el ancestro común a todas las ATPasas rotatorias (Modificado de Müller et al. (2006)⁶⁸).

en las F-ATPasas es muy variable entre organismos⁵¹. A la fecha no se ha logrado resolver la estructura de ningún estator periférico completo junto con la porción membranal y la información disponible corresponde a estudios estructurales de subcomplejos aislados o junto al núcleo catalítico⁷³⁻⁷⁵.

Las subunidades G(H) y E fueron propuestas inicialmente para la formación de la estructura de tipo “collar” por los grupos de Müller y Gruber^{47,76}, sin embargo, a partir de estudios del mismo y otros grupos de investigación se ha podido llegar a un modelo más detallado en el cual la estructura de “collar” se encuentra formada por la subunidad I que extiende su extremo amino hacia la fracción extramembranal⁷⁷ y es la encargada de unir los dos estatores^{31,52} (Figura 5), en contraste con las F-ATPasas, en las que la subunidad b desarrolla esta función⁷⁸.

La estructura cristalográfica del estator heterodimérico (E y G) que une a la subunidad I con una subunidad B del núcleo catalítico permitió observar una estructura de hélices entrecruzadas dextrógiros⁷⁵ (Figura 6). Se ha postulado que este tipo de plegamiento se encuentra presente en la región formadora del dímero de las subunidades B del brazo de la F-ATPasa de *E. coli*^{79, 80}; sin embargo, existen estudios que proponen que esta región podría formar hélices entrecruzadas levógiros^{81, 82}. En el caso del brazo periférico de la F-ATPasa de bovino no está claro el sentido de las hélices presentes, ya que las estructuras se han obtenido a partir de segmentos de las subunidades^{73, 74} (Figura 6).

UTILIZACIÓN DEL $\Delta\mu(\text{Na}^+)$ Y $\Delta\mu(\text{H}^+)$ EN ARQUEAS METANOGÉNICAS

Las arqueas metanogénicas son una de las pocas formas de vida que producen un potencial electroquímico transmembranal ($\Delta\mu$) de iones H^+ y Na^+ , simultáneamente. La metanogénesis se sugiere como una de las primeras rutas metabólicas desarrolladas en la Tierra⁸³. La especificidad de la ATP sintasa por el ión a utilizar se encuentra definida por la región traslocadora en la base de la enzima (A_o), formada por un anillo que agrupa múltiples copias de la subunidad c (K/L), cada una de las cuales posee un sitio de unión⁶⁸. Una de las incógnitas más representativas es cómo aprovechan cada uno de estos gradientes este grupo de organismos. Los primeros estudios con inhibidores indicaron la presencia de una F_1F_o -ATP sintasa y una A_1A_o -ATP sintasa en la membrana plasmática de *M. mazei* Gö1, se propuso que estas enzimas utilizan los iones Na^+ y H^+ para la síntesis de ATP respectivamente, lo que indica una independencia del ión en la síntesis de ATP⁸⁴. Por otra parte, el crecimiento de la especie *Methanobrevibacter ruminantium* M1 fue inhibido por ionóforos y protonóforos de sodio lo que demuestra que ambos gradientes son esenciales⁸⁵. Para elucidar la importancia de la F_1F_o -ATPasa en estos organismos, el operón de la ATPasa en *Methanosarcina acetivorans* se intercambió por un cassette de resistencia a puromicina. La mutante presentó un crecimiento equivalente al de la cepa silvestre, con un contenido de ATP celular idéntico, lo que demostró que los genes de la F_1F_o -ATPasa no son esenciales para la supervivencia de este organismo⁸⁶. Recientemente, Schlegel y colaboradores demostraron que la A_1A_o -ATP sintasa de *M. acetivorans* es

capaz de utilizar ambos gradientes (Na^+ y H^+) simultáneamente para sintetizar ATP⁸⁷.

CONCLUSIONES

El estudio de los complejos respiratorios en arqueas aeróbicas aún se encuentra en una etapa temprana, lo que parcialmente se debe a la dificultad para aislar y cultivar estos organismos, por su dependencia de condiciones muy específicas (extremas) para su desarrollo. Sin embargo, la investigación con arqueas ha permitido esclarecer mecanismos biológicos y características estructurales que proporcionan una visión mucho más amplia de los organismos vivos y, por lo tanto, es necesario continuar con el estudio de estos complejos para abrir las puertas a todo un abanico de nuevas posibilidades sobre la transducción primaria de energía a través de las membranas.

Por otro lado, muchas vías de obtención de energía en arqueas involucran al complejo A_1A_o -ATP sintasa (Figura 2a); esto,

aunado a su similitud con las V_1V_o -ATP sintasa de eucariontes y su importancia en las arqueas metanogénicas, ha despertado interés por una gran diversidad de estudios estructurales y bioquímicos sobre este complejo. El conjunto de trabajos disponibles hasta la fecha permitió proponer un modelo estructural (inicial) que ha evolucionado y actualmente ha sido construido casi por completo (Figura 8). Esto no implica el final de su estudio, sino el comienzo de una nueva etapa abriendo puertas hacia la elucidación de su mecanismo catalítico, su regulación y las diferencias estructurales dentro de cada una de las especies, entre otros aspectos.

En general, la información disponible acerca de las arqueas se ha obtenido en relativamente poco tiempo; su importancia evolutiva, biológica y biotecnológica^{3, 88} parece representar sólo una pequeña proporción de lo que las arqueas tienen que ofrecer, lo que es un incentivo para continuar con la investigación referente a este fascinante dominio de la vida.

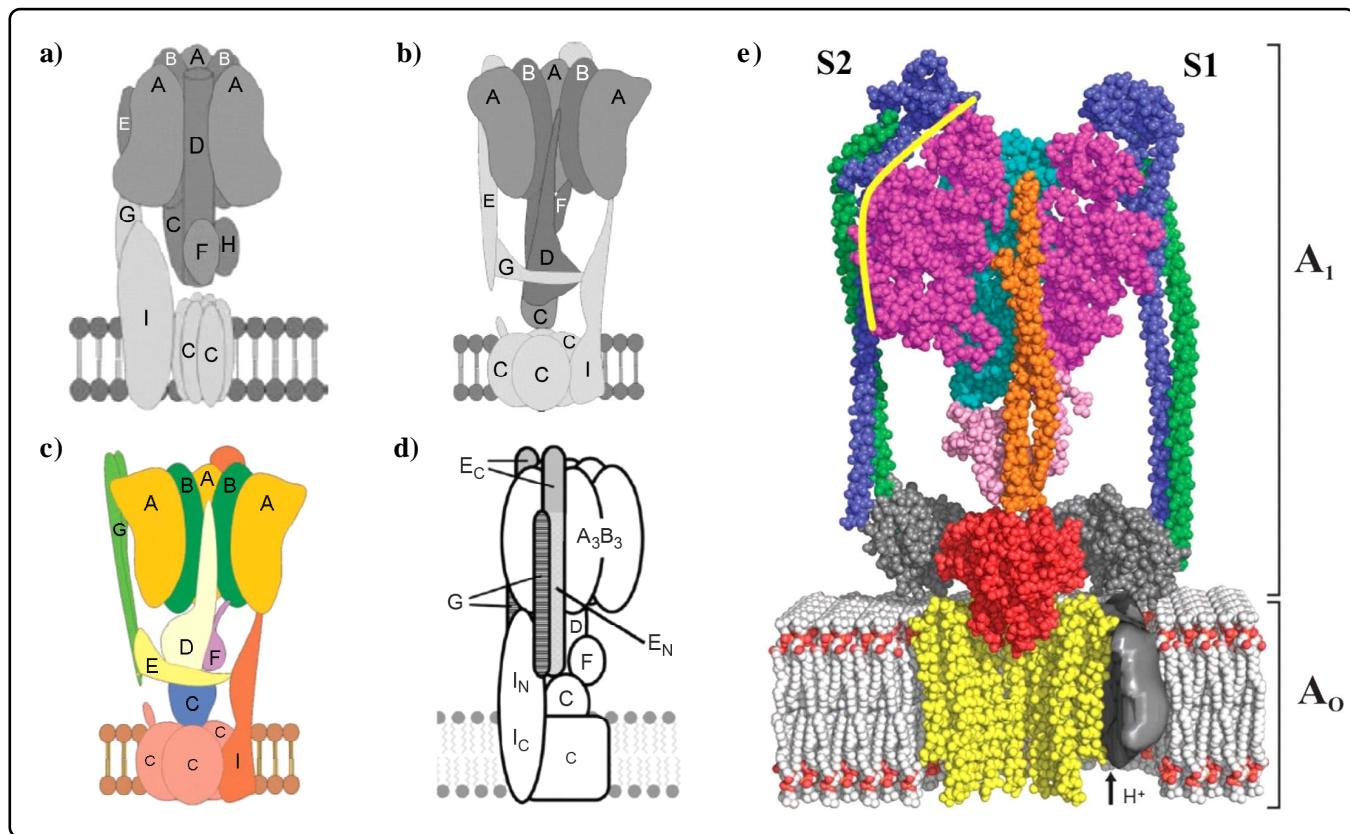


Figura 8. Evolución del modelo estructural de la A_1A_o -ATP sintasa. Se observan los cambios en la distribución de las subunidades a través del tiempo. En los primeros modelos (a), (b), (c) la subunidad I se proponía para formar parte directa de los brazos periféricos. Es hasta los trabajos de Kish-Trier y colaboradores que se proponen dos estatores idénticos heterodiméricos (d), los cuales han sido incorporados al modelo actual (e); en éste se observan los dominios A_1 y A_o , así como los estatores 1 y 2 (S1 y S2) Canal de H^+ y rotor central: subunidad I (gris); anillo de subunidades c (amarillo), subunidad C (rojo), subunidad F (rosa), subunidad D (naranja); Núcleo catalítico: subunidades B (violeta), subunidad A (cian) (dos subunidades A y una B fueron eliminadas por claridad); Brazos periféricos: subunidad G (verde), subunidad E (azul). Modificados de (a) Müller & Grüber (2003)⁷⁷, (b) Coskun *et al.* (2004)⁴⁷, (c) Grüber & Marshansky (2008)⁷⁶, (d) Kish-Trier *et al.* (2008)³¹, (e) Stewart *et al.* (2012)⁵².

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los proyectos: 128110 (CONACyT) e IN203311-3 de la DGAPA (UNAM). Héctor Vicente Miranda-Astudillo es becario de CONACyT (229474). Se agradece a los doctores Diego González-Halphen (IFC-UNAM), Salvador Uribe-Carvalj (IFC-UNAM) y Arturo Becerra-Bracho (FC-UNAM) por sus valiosas opiniones en la realización de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Zillig, W. Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Curr. Opin. Genet Dev.* **1**, 544-551 (1991).
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579 (1990).
- Jarrell, K.F. *et al.* Major players on the microbial stage: why archaea are important. *Microbiology* **157**, 919-936 (2011).
- Gupta, R.S. & Shami, A. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 133-157 (2011).
- Lewalter, K. & Müller, V. Bioenergetics of archaea: ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 437-445 (2006).
- Huber, H. *et al.* A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **2**, 63-67 (2002).
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. & Pace, N.R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9188-9193 (1996).
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 245-252 (2008).
- Schäfer, G., Engelhard, M. & Müller, V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 570-620 (1999).
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **4784**, 144-148 (1961).
- Deppenmeier, U. Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1513-1533 (2002).
- Müller, V. *et al.* Bioenergetics of archaea: ATP synthesis under harsh environmental conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 167-180 (2005).
- Iwasaki, T., Matsuura, K. & Oshima, T. Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **270**, 30881-30892 (1995).
- Schäfer, G., Purschke, W.G., Gleissner, M. & Schmidt, C.L. Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 16-20 (1996).
- Pereira, M.M. *et al.* Respiratory chains from aerobic thermophilic prokaryotes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 93-105 (2004).
- Brito, J.A., Bandeiras, T.M., Teixeira, M., Vonrhein, C. & Archer, M. Crystallisation and preliminary structure determination of a NADH: quinone oxidoreductase from the extremophile *Acidianus ambivalens*. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 842-845 (2006).
- Gomes, C.M., Bandeiras, T.M. & Teixeira, M. A new type-II NADH dehydrogenase from the archaeon *Acidianus ambivalens*: characterization and in vitro reconstitution of the respiratory chain. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 1-8 (2001).
- Gomes, C.M. *et al.* The unusual iron sulfur composition of the *Acidianus ambivalens* succinate dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 134-141 (1999).
- Lemos, R.S., Gomes, C.M. & Teixeira, M. *Acidianus ambivalens* Complex II typifies a novel family of succinate dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 141-150 (2001).
- Bandeiras, T.M. *et al.* The cytochrome *ba* complex from the thermoacidophilic crenarchaeote *Acidianus ambivalens* is an analog of *bc1* complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 37-45 (2009).
- Gilderson, G. *et al.* Kinetics of electron and proton transfer during O₂ reduction in cytochrome aa₃ from *A. ambivalens*: an enzyme lacking Glu(I-286). *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 261-270 (2001).
- Kabashima, Y. & Sakamoto, J. Purification and biochemical properties of a cytochrome *bc* complex from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *BMC Microbiology* **11**, 52 (2011).
- Ishikawa, R. *et al.* *Aeropyrum pernix* K1, a strictly aerobic and hyperthermophilic archaeon, has two terminal oxidases, cytochrome ba₃ and cytochrome aa₃. *Arch. Microbiol.* **179**, 42-49 (2002).
- Sreeramulu, K., Schmidt, C.L., Schäfer, G. & Anemüller, S. Studies of the electron transport chain of the euryarchaeon *Halobacterium salinarum*: indications for a type II NADH dehydrogenase and a complex III analog. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 443-453 (1998).
- González, O. *et al.* Systems analysis of bioenergetics and growth of the extreme halophile *Halobacterium salinarum*. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000332 (2009).
- Nunoura, T., Sako, Y., Wakagi, T. & Uchida, A. Regulation of the aerobic respiratory chain in the facultatively aerobic and hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum oguniense*. *Microbiology* **149**, 673-688 (2003).
- Nunoura, T., Sako, Y., Wakagi, T. & Uchida, A. Cytochrome aa3 in facultatively aerobic and hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum oguniense*. *Can. J. Microbiol.* **51**, 621-627 (2005).
- Bandeiras, T.M., Salgueiro, C.A., Huber, H., Gomes, C.M. & Teixeira, M. The respiratory chain of the thermophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: studies on the type-II NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1557**, 13-19 (2003).
- Hamann, N. *et al.* The CCG-domain-containing subunit SdhE of succinate:quinone oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus* P2 binds a [4Fe-4S] cluster. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 457-470 (2009).
- Auernik, K.S. & Kelly, R.M. Identification of components of electron transport chains in the extremely thermoacidophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula* through iron and sulfur compound oxidation transcriptomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7723-7732 (2008).
- Kish-Trier, E., Briere, L.K., Dunn, S.D. & Wilkens, S. The stator complex of the A₁A₀-ATP synthase-structural characterization of the E and H subunits. *J. Mol. Biol.* **375**, 673-685 (2008).
- Kish-Trier, E. & Wilkens, S. Domain architecture of the stator complex of the A₁A₀-ATP synthase from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **284**, 12031-12040 (2009).
- Kish-Trier, E. & Wilkens, S. Interaction of the *Thermoplasma acidophilum* A₁A₀-ATP synthase peripheral stalk with the

- catalytic domain. *FEBS Letters* **583**, 3121-3126 (2009).
34. Cross, R.L. & Müller, V. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Letters* **576**, 1-4 (2004).
35. Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* **165**, 149-163 (1996).
36. Bickel-Sandkötter, S., Gartner, W. & Dane, M. Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. *Arch. Microbiol.* **166**, 1-11 (1996).
37. Adams, M.W. The biochemical diversity of life near and above 100°C in marine environments. *J. Appl. Microbiol. Syn. Sup.* **85**, 108s-117s (1998).
38. Cross, R.L. & Taiz, L. Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of F_oF₁ATPases and synthases. *FEBS Letters* **259**, 227-229 (1990).
39. Muench, S.P., Trinick, J. & Harrison, M.A. Structural divergence of the rotary ATPases. *Q. Rev. Biophys.* **44**, 311-356 (2011).
40. Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. & Miyata, T. Evolutionary relationship of archaeabacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9355-9359 (1989).
41. Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G. & Walker, J.E. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 672-679 (2000).
42. Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R. & Müller, V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **204**, 2597-2605 (2001).
43. Nishi, T. & Forgac, M. The vacuolar H⁺-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103 (2002).
44. Wieczorek, H. *et al.* Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 127-135 (2000).
45. Müller, V., Ruppert, C. & Lemker, T. Structure and function of the A₁A₀-ATPases from methanogenic Archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 15-27 (1999).
46. Shao, E., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. & Forgac, M. Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **278**, 12985-12991 (2003).
47. Coskun, U. *et al.* Structure and subunit arrangement of the A-type ATP synthase complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii* visualized by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **279**, 38644-38648 (2004).
48. Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B. & Müller, V. Three-dimensional structure of A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **284**, 10110-10119 (2009).
49. Muench, S.P. *et al.* Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *J. Mol. Biol.* **386**, 989-999 (2009).
50. Walker, J.E. & Kane-Dickson, V. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 286-296 (2006).
51. Cano-Estrada, A. & González-Halphen, D. F₁F_o-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB* **30**, 98-108 (2011).
52. Stewart, A.G., Lee, L.K., Donohoe, M., Chaston, J.J. & Stock, D. The dynamic stator stalk of rotary ATPases. *Nat. Commun.* **3**, 687 (2012).
53. Schäfer, I.B. *et al.* Crystal structure of the archaeal A₁A₀ ATP synthase subunit B from *Methanosarcina mazei* GÖ1: Implications of nucleotide-binding differences in the major A₁A₀ subunits A and B. *J. Mol. Biol.* **358**, 725-740 (2006).
54. Boyer, P.D. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* **3**, 2164-2178 (1989).
55. Maegawa, Y. *et al.* Structure of the catalytic nucleotide-binding subunit A of A-type ATP synthase from *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel domain related to the peripheral stalk. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 483-488 (2006).
56. Maher, M.J. *et al.* Crystal structure of A₃B₃ complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO Journal* **28**, 3771-3779 (2009).
57. Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628 (1994).
58. Bernal, R.A. & Stock, D. Three-dimensional structure of the intact *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase by electron microscopy. *Structure* **12**, 1789-1798 (2004).
59. Numoto, N., Hasegawa, Y., Takeda, K. & Miki, K. Inter-subunit interaction and quaternary rearrangement defined by the central stalk of prokaryotic V₁-ATPase. *EMBO Reports* **10**, 1228-1234 (2009).
60. Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Structural Biology* **7**, 1055-1061 (2000).
61. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinoshita, K. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**, 299-302 (1997).
62. Imamura, H. *et al.* Evidence for rotation of V₁-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2312-2315 (2003).
63. Raghunathan, D., Gayen, S., Grüber, G. & Verma, C.S. Crosstalk along the stalk: dynamics of the interaction of subunits B and F in the A₁A₀-ATP synthase of *Methanosarcina mazei* GÖ1. *Biochemistry* **49**, 4181-4190 (2010).
64. Raghunathan, D. *et al.* Subunit F modulates ATP binding and migration in the nucleotide-binding subunit B of the A₁A₀-ATP synthase of *Methanosarcina mazei* GÖ1. *J. Bioenerg. Biomembr.* **44**, 213-224 (2012).
65. Ihara, K., Watanabe, S., Sugimura, K., Katagiri, I. & Mukohata, Y. Identification of proteolipid from an extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* as an N,N'-dicyclohexylcarbodiimide binding subunit of ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 267-272 (1997).
66. Wilms, R. *et al.* Subunit structure and organization of the genes of the A₁A₀ ATPase from the Archaeon *Methanosarcina mazei* GÖ1. *J. Biol. Chem.* **271**, 18843-18852 (1996).
67. Inatomi, K., Maeda, M. & Futai, M. Dicyclohexylcarbodiimide-binding protein is a subunit of the *Methanosarcina barkeri* ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1585-1590 (1989).
68. Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K. & Fritz, M. ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 455-460 (2006).
69. Ruppert, C., Wimmers, S., Lemker, T. & Müller, V. The A₁A₀ ATPase from *Methanosarcina mazei*: cloning of the 5' end of the aha operon encoding the membrane domain and expression of the proteolipid in a membrane-bound form in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3448-3452 (1998).
70. Ruppert, C. *et al.* The proteolipid of the A₁A₀ ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. *J.*

- Biol. Chem.* **274**, 25281-25284 (1999).
71. Lolkema, J.S. & Boekema, E.J. The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. *FEBS Letters* **543**, 47-50 (2003).
72. Zhang, Z. *et al.* Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35983-35995 (2008).
73. Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO Journal* **25**, 2911-2918 (2006).
74. Rees, D.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21597-21601 (2009).
75. Lee, L.K., Stewart, A.G., Donohoe, M., Bernal, R.A. & Stock, D. The structure of the peripheral stalk of *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase. *Nature Structural Biology* **17**, 373-378 (2010).
76. Grüber, G. & Marshansky, V. New insights into structure-function relationships between archaeal ATP synthase (A_iA_o) and vacuolar type ATPase (V_iV_o). *BioEssays* **30**, 1096-1109 (2008).
77. Müller, V. & Grüber, G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 474-494 (2003).
78. Weber, J. ATP synthase—the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 53-56 (2007).
79. Del Rizzo, P.A., Bi, Y., Dunn, S.D. & Shilton, B.H. The “second stalk” of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry* **41**, 6875-6884 (2002).
80. Del Rizzo, P.A., Bi, Y. & Dunn, S.D. ATP synthase b subunit dimerization domain: a right-handed coiled coil with offset helices. *J. Mol. Biol.* **364**, 735-746 (2006).
81. Wise, J.G. & Vogel, P.D. Subunit b-dimer of the *Escherichia coli* ATP synthase can form left-handed coiled-coils. *Biophysical Journal* **94**, 5040-5052 (2008).
82. Wise, J.G. & Vogel, P.D. Accommodating discontinuities in dimeric left-handed coiled coils in ATP synthase external stalks. *Biophysical Journal* **96**, 2823-2831 (2009).
83. Deppenmeier, U. & Müller, V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 123-152 (2007).
84. Becher, B. & Müller, V. ΔμNa⁺ drives the synthesis of ATP via an ΔμNa⁺-translocating F₁F₀-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* GÖ1. *J. Bacteriol.* **176**, 2543-2550 (1994).
85. McMillan, D.G. *et al.* A_iA_o-ATP synthase of *Methanobrevibacter ruminantium* couples sodium ions for ATP synthesis under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **286**, 39882-39892 (2011).
86. Saum, R., Schlegel, K., Meyer, B. & Müller, V. The F₁F₀ ATP synthase genes in *Methanosarcina acetivorans* are dispensable for growth and ATP synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **300**, 230-236 (2009).
87. Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gómez, J.D. & Müller, V. Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na⁺ and H⁺ translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 947-952 (2012).
88. de Champdoré, M., Staiano, M., Rossi, M. & D'Auria, S. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J. R. Soc. Interface* **4**, 183-191 (2007).