

00591



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UN/M
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL
COMPLEJO F₁-I ENDÓGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**JULIO LENIN DOMÍNGUEZ
RAMÍREZ**



Tutor: DRA. MARIETTA TUENA DE GÓMEZ-PUYOU

MÉXICO, D. F.

Agosto 2004₅

m. 347149



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou en el laboratorio 105 Oriente, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza , del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM , en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de SEC-HPLC .

Se reconoce la colaboración del Dra. Georgina Garza Ramos , del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM , en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de Dicroísmo Circular.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Hugo Najera Peña en los experimentos de Fluorescencia Intrínseca.

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Edmundo Chávez Cossío	Instituto Nacional de Cardiología.
Vocal	Dr. George Dreyfus Cortés	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. José de Jesús Gracia Trejo	Instituto Nacional de Cardiología
Suplente	Dr. Edgar Vázquez Contreras	Instituto de Química, UNAM

Agradecimientos y dedicatorias:

Si bien no hay un orden en particular en esta lista, las primeras personas que vienen a mi mente son los Drs. Gómez-Puyou (Marietta y Armando), que han contribuido en más maneras de las que puedo recordar en mi formación científica y que les agradezco infinitamente. También me es inolvidable el que el Dr. Antonio Peña me haya reprobado en mi primer curso de bioquímica (en aquellos ahora extintos prerrequisitos de maestría), le debo el seguir trabajando en este campo. Al Dr. Salvador Uribe le agradezco la paciencia, pues trabaje con él en la peor parte de mi “adolescencia científica”. Al Dr. Diego González Halphen, que siempre es un refrescante contraste filosófico para mí (¿Por qué no le gusta que le diga “Doctor”?). Y también el Doctor Edmundo Chávez, que tanto se emociona con las novedades de las enzimas mitocondriales y me contagia siempre su emoción. Al Dr. George Dreyfus, por quitarle lo telegráfico a esta tesis y por insistir en que le de crédito a quien lo merece (Dreyfus, G. comunicación personal). Al Dr. Daniel Alejandro Fernández, por el apoyo moral y el optimismo en los totorales. No puedo dejar de lado al Dr. José de Jesús García que cuya contribución me ayudo a darle mayor soporte a las conclusiones de este trabajo. Al Dr. Edgar Vázquez Contreras, que me ayudo muchísimo a encontrar el enfoque adecuado para la forma de la tesis. Al Dr. Hugo Najera Peña, maestro de la cuantificación de fluorescencia intrínseca, a la Dra. Georgina Garza Ramos, que me instruyó en las sutilezas del Dicroísmo Circular de proteínas, y al Dr. Guillermo Mendoza, quien me introdujo al mundo del HPLC y me sigue estimando a pesar de haber roto una de sus jeringuillas del HPLC. A lo usuarios de Mac del Instituto de Fisiología Celular, en especial al Dr. Jesús Aguirre, pero sin olvidar al Dr. Fernando López Casillas, Dr. Wilhelm Hansberg y el Dr. Ernesto Maldonado, por ayudarme en la transición al Mac OS. Entre el terreno académico y lo social están los compañeros del laboratorio quienes también les agradezco su amistad: el Dr. Horacio Reyes Vivas, que su singular humor lo hace un persona con la cual es divertido trabajar; Jesús Oria, amigo incondicional y medio intermedio (jaja, no me crean eso último); Viviana Zomosa Signoret, excelente y jovial compañera de cubículo; al Dr. Gerardo Pérez Hernández, mi primer couch en el mundo de la ATP sintasa; a la Dra. Vanesa Olivares Illana, con su amabilidad y buen humor me ha contagiado siempre; a Beatriz y a Conny, las técnicas más agradables que conozco. La señora María Elena Orduña, que a través de mi estómago se ganó su lugar en mi corazón. Y no por que los haya olvidado y los tenga considerados a menos, le agradezco a mi madre, por no desheredarme a pesar de que no estudie Medicina; a mis hermanas, Ludmila y Lubianka, por la comida, la música, la platica y simplemente por ser mis hermanitas. A los Palominos; Luís Manuel, Elba, Horacio y Bruno, por dejarme ser parte de su hogar. A los Cortes: Ricardo, Lucila, Santiago (y, claro, a Helen también). A Paulina, por la vida que hemos, seguimos y seguiremos compartiendo felizmente. Desde luego que no olvido a Miguel Serrano Pinto, mi ahora instructor vinícola; Juan Ramón Martínez, mi guía a la aventura del buceo deportivo; a Iván Martínez y Carlo Corea, los mejores directores de cine con los que me he tomado una cereza. A Alex Verdín, nadie como tu para mostrar el significado de la amistad. A Soledad Funes, que por alguna extraña razón me ha dejado ser su amigo y corresponsal del medio de la ATP sintasa. Al Dr. Héctor Malagon, que sin él los conejos aún me asustarían; al Dr. Arturo Hernández Cruz, que nos presto su super-objetivo del microscopio confocal. Y si me olvido de alguien, disculpen ustedes, pero no duden que aprecio su amistad y ayuda.

Abreviaturas.

1GMJ. Código de PDB de la estructura cristalográfica de la IP H49K.

1HF9. Código de PDB de la estructura determinada por RMN del carboxilo terminal de la IP.

$\alpha\beta_{DP}$. Interfase entre las subunidades α y β que en la estructura del segmento F_1 PDB ID 1BMF tiene ADP unido.

$\alpha\beta_E$. Interfase entre las subunidades α y β que en la estructura del segmento F_1 PDB ID 1BMF carece de nucleótido unido.

$\alpha\beta_{TP}$. Interfase entre las subunidades α y β que en la estructura del segmento F_1 PDB ID 1BMF tiene ATP (ó AMP-PNP) unido.

ADN. Ácido Desoxirribonucleico.

ADP. Adenosín difosfato

AMP-PNP. Ácido [[[5-[(6-amino-9H-purin-9-il)]-3,4-dihidroxi-tetrahidrofurano-2-il]methoxi-hidroxi-fosfinoil]oxi-hidroxi-fosfinoyl] aminofosfónico, análogo del ATP.

ATP. Adenosín trifosfato

BMD. Dinámica Molecular Sesgada (Biased Molecular Dynamics).

Bos taurus. Bovino

°C Grados centígrados.

CA. Cromatografía de Afinidad.

CD. Dicroísmo Circular.

CEM. Cromatografía de Exclusión Molecular.

CPK. Esquema de colores propuesto por Corey, Pauling y Koltun.

D. Dímero de F_1 -IP endógeno.

DCCD. N'-N-Diciclohexilcarbodiimida.

DE. Dinámicas Esenciales (Essential Dynamics), análisis de covariancia que identifica movimientos coordinados.

D/M. Proporción del área bajo la curva del dímero y el monómero de F_1 -IP.

Escherichia coli. Enterobacteria de uso común en los laboratorios y considerado como modelo general de las bacterias.

F_1 . (también F_1 -ATPasa). Segmento hidrofílico de la F_1F_0 que contiene los sitios catalíticos.

F_1F_0 . ATP sintasa. ATP sintasa ó F_1F_0 .

F_0 . Segmento hidrofóbico de la F_1F_0 . Este segmento está embebido en la membrana y es el responsable del transporte de los iones.

H^+ . Protón

I. tartaricus. *Ilyobacter tartaricus.*

IP. (también IF_1). La proteína inhibidora endógena.

K. Grados Kelvin

K_{av}. Coeficiente de distribución aparente de una molécula entre una fase móvil y un fase estacionaria.

NADH. Nicotinamida adenín dinucleótido.

NBF. 4-cloro-7-nitrobenzofurazan, inhibidor covalente de la ATP sintasa.

M. Monómero de F₁-IP endógeno.

MD. Dinámica Molecular (Molecular Dynamics).

MSA. Mecanismo de Sitios Alternantes.

NMA. Análisis de Modos Normales (Normal Mode Analysis).

O. Forma abierta del sitio catalítico de la F₁F_o (Open).

OSCP. Olygomycin Sensitivity Conferral Protein.

PDB ID. Código asignado a cada estructura cristalográfica dentro de la base de datos del RCSB (www.rcsb.org).

Pi. Ortofosfato

PMSE. Fenilmetilsulfonilfluoruro (phenylmethysulphonylfluoride).

P. modestum. *Propionigenium modestum*.

PSM. Partículas Submitocondriales

QM/MM. Mecánica Cuántica y Mecánica Molecular (Quantum Mechanics /Molecular Mechanics).

Redox. Oxido-reducción

RMN. Resonancia Magnética Nuclear.

RMSD. Squared Root Mean Square Deviation.

SO. Forma semi-abierta del sitio catalítico de la F₁F_o (SemiOpen).

T. Forma cerrada del sitio catalítico de la F₁F_o (Tight).

TMD. Dinámica Molecular Dirigida (Targeted Molecular Dynamics).

UV. Luz ultravioleta (UltraViolet).

VMD. Virtual Molecular Dynamics, programa para visualizar estructuras cristalograficas a partir de sus archivos PDB.

Índice:

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL COMPLEJO F₁-I
ENDÓGENO 2**

RECONOCIMIENTOS 2

ABREVIATURAS..... 4

ÍNDICE: 6

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS: 8

RESUMEN. 10

ABSTRACT..... 11

INTRODUCCIÓN..... 12

LA MITOCONDRIA, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN..... 12

LA ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA..... 14

MECANISMO CATALÍTICO DE LA F₁F₀ ATP SINTASA..... 16

MECANISMO CATALÍTICO DEL SEGMENTO F₁: 16

MECANISMO CATALÍTICO DEL SEGMENTO F₀: 18

SUBUNIDADES SUPERNUMERARIAS..... 19

ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS..... 20

REPERCUSIONES DE LA ESTRUCTURA EN EL ESTUDIO DEL MECANISMO CATALÍTICO DE LA F₁F₀ ATP
SINTASA *IN SILICO*..... 22

MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATP SINTASA POR LA IP..... 22

PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA..... 25

HIPÓTESIS: 25

OBJETIVOS: 25

RESULTADOS..... 26

RESULTADOS I..... 27

PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO F₁-IP..... 28

CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS COMPLEJOS F₁-IP DIMÉRICOS (D) Y MONOMÉRICOS
(M)..... 31

INTERCONVERSIÓN ENTRE DÍMEROS Y MONÓMEROS DE F₁-IP ENDÓGENOS..... 33

LIBERACIÓN DE LA IP DE LOS COMPLEJOS F₁-IP DIMÉRICO Y MONOMÉRICO ENDÓGENOS..... 35

RESULTADOS II..... 38

REINTERPRETACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS INTERACCIONES DE LA IP CON EL COMPLEJO F₁..... 39

RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS CONSERVADOS DE LA IP ENTRE DIFERENTES ESPECIES..... 40

PROPIEDADES DINÁMICAS DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA IP..... 41

DIFERENCIAS ENTRE LAS ESTRUCTURAS DE LA IP DETERMINADAS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X Y
POR RMN..... 44

DISCUSIÓN 46

INTERCONVERSIÓN DÍMERO-MONÓMERO Y ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO F₁-IP ENDÓGENO..... 47

REINTERPRETACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA IP A NIVEL ATÓMICO..... 48

PAPEL DE LA DIMERIZACIÓN MEDIADA POR IP EN LA REGULACIÓN DEL COMPLEJO F₁F₀..... 48

CONCLUSIONES..... 50

PERSPECTIVAS..... 50

MÉTODOS..... 51

OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN BOVINO..... 53

OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES DE MGATP..... 53

PREPARACIÓN DE F₁-IP..... 54

CALIBRACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	55
PURIFICACIÓN DE F ₁	55
SMP-TRIS PARA F ₁	55
PREPARACIÓN DE F ₁	55
ACTIVACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES CON KCL.....	56
ACTIVACIÓN DE F ₁ -IP.....	57
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR BCA.....	57
ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	57
MEZCLA DE CARGA (PARA GEL DESNATURALIZANTE):.....	58
TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.....	59
TINCIÓN POR PLATA DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.....	59
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CON BIURET.....	59
CUANTIFICACIÓN DE DICROISMO CIRCULAR EN EL UV LEJANO.....	60
CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA.....	60
DECONVOLUCIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS.....	60
DETERMINACIÓN DE DOMINIOS DINÁMICOS UTILIZANDO EL PROGRAMA "DYNDOM".....	61
USO DEL SERVIDOR DE ANÁLISIS DE MODOS NORMALES (NMA) "ELNÉMO".....	61
USO DEL SERVIDOR DE DETERMINACIÓN DE KNOBS-INTO-HOLES "SOCKET".....	61
DINÁMICAS MOLECULARES UTILIZANDO EL PROGRAMA "GROMACS".....	62
REFERENCIAS.....	63
APENDICE I: SCRIPT PARA EL DYNDOM.....	70
APENDICE II: ¿ATP SINTASA O ATP SINTETASA?:.....	71

Índice de tablas y figuras:

FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS MEMBRANAS EXTERNA, INTERNA Y DE LAS CRESTAS MITOCONDRIALES.	13
FIGURA 2. ESQUEMA DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO F_1F_0 ATP SINTASA BASADO EN LAS ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS, RECONSTITUCIONES DE SUBUNIDADES AISLADAS Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	13
TABLA 1. COMPOSICIÓN DE SUBUNIDADES DE LOS SEGMENTOS F_1 Y F_0 DE LA ATP SINTASA DE DIFERENTES ORGANISMOS.	14
FIGURA 3. ESQUEMA DE LISTONES DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA INHIBIDORA (IP).	15
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LA ATP SINTASA DE <i>E. COLI</i> Y SU SUBDIVISIÓN EN ESTATOR Y ROTOR.	16
FIGURA 5. ESQUEMA DEL MECANISMO DE SITIOS ALTERNANTES (MSA).	17
FIGURA 6. ESTRUCTURAS DE BAJA RESOLUCIÓN OBTENIDAS POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA DEL COMPLEJO F_0 DE <i>E. COLI</i> Y LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DEL OLIGÓMERO DE SUBUNIDADES C DE <i>I. TARTARICUS</i> .	18
FIGURA 7. ESQUEMA DEL TRANSPORTE DE PROTONES POR LAS SUBUNIDADES A Y C DE SEGMENTO F_0 .	19
FIGURA 8. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DEL SEGMENTO F_1 , EN REPRESENTACIÓN DE LISTONES.	21
FIGURA 9. ESQUEMA DE LA INTERACCIÓN DE LA IP CON EL COMPLEJO F_1 EN EL CONTEXTO DEL MECANISMO DE SITIOS ALTERNANTES.	23
FIGURA 10. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO F_1 -IP ENDÓGENO.	28
FIGURA 11. REPURIFICACIÓN DE LAS FORMAS DIMÉRICA Y MONOMÉRICA DEL COMPLEJO F_1 -IP ENDÓGENO.	29
FIGURA 12. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN HPLC DEL COMPLEJO F_1 -IP A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA.	29
TABLA 2. DECONVOLUCIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA.	30
FIGURA 13. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LOS COMPLEJOS F_1 -IP DIMÉRICO Y MONOMÉRICO.	30
FIGURA 14. ACTIVACIÓN DE LOS COMPLEJOS F_1 -IP DIMÉRICO Y MONOMÉRICO DEL COMPLEJO F_1 -IP.	30
FIGURE 15. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LOS COMPLEJOS F_1 -IP DIMÉRICO Y MONOMÉRICO.	31
FIGURA 16. ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LOS COMPLEJOS F_1 -IP DIMÉRICO, MONOMÉRICO Y DEL COMPLEJO F_1 .	32
FIGURA 17. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE LOS COMPLEJOS F_1 -IP DIMÉRICO, MONOMÉRICO Y DEL COMPLEJO F_1 .	33
TABLA 3. ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS F_1-IP DIMÉRICO Y MONOMÉRICO.	34
FIGURA 18. REGRÁFICO DE LAS PROPORCIONES DÍMERO/MONÓMERO COMO FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.	35
FIGURA 19. ACTIVACIÓN DE LAS FRACCIONES DIMÉRICA Y MONOMÉRICA DEL COMPLEJO F_1 -IP EN FUNCIÓN DEL PH.	35
FIGURA 20. PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LAS FRACCIONES DIMÉRICA Y MONOMÉRICA DEL COMPLEJO F_1 -IP ENDÓGENO DURANTE LA ACTIVACIÓN A PH 8.0.	37
FIGURA 21. ACTIVACIÓN DE LAS FRACCIONES DIMÉRICA Y MONOMÉRICA DEL COMPLEJO F_1 -IP ENDÓGENO.	37
FIGURA 22. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LAS SUBUNIDADES γ DEL COMPLEJO F_1 Y DEL COMPLEJO F_1 -IP RECONSTITUÍDO.	39

FIGURA 23. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LAS SUBUNIDADES α_{DP} DEL COMPLEJO F_1 Y DEL COMPLEJO F_1 -IP RECONSTITUÍDO.	40
FIGURA 24. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LAS SUBUNIDADES β_{DP} DEL COMPLEJO F_1 Y DEL COMPLEJO F_1 -IP RECONSTITUÍDO.	40
TABLA 4. IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS DINÁMICOS DE LA IP UTILIZANDO EL PROGRAMA DYNDOM.	42
FIGURA 25. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE IP DE NUEVE DIFERENTES ORGANISMOS.	43
FIGURA 26. ANÁLISIS DE LAS HÉPTADAS DE LAS ESTRUCTURAS DE RMN (PDB ID 1HF9) Y CRISTALOGRÁFICA (PDB ID 1GMJ) DE LA IP.	45
ESQUEMA 1. POSIBLES VÍAS DE INTERCONVERSIÓN DÍMERO-MONÓMERO Y SU ACTIVACIÓN.	47
ESQUEMA 2. ESQUEMA DE LAS POSIBLES INTERACCIONES DEL COMPLEJO F_1 -IP ENDÓGENO.	49

Resumen.

La ATP sintasa es un complejo enzimático de importancia central en el metabolismo aeróbico ya que se encarga de acoplar la fuerza protonmotriz, generada por la cadena respiratoria, a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Estructuralmente, combina dos segmentos, uno hidrofílico llamado F_1 y uno hidrofóbico conocido como F_0 . La ATP sintasa de *E. coli* está formada por ocho subunidades diferentes (con su estequiometría indicada por subíndices): $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, en el segmento F_1 y ab_2c_9-12 , en el segmento F_0 ; en eucariontes, como *B. taurus*, el complejo está formado por 16 subunidades, que incluyen las ocho arriba mencionadas. Aquellas subunidades eucariontes sin contraparte procarionte reciben el nombre de supernumerarias. La proteína inhibidora endógena (IP) es una de ellas. La IP recibe su nombre por su capacidad de inhibir la actividad de hidrólisis de ATP del segmento F_1 así como de inhibir la síntesis e hidrólisis de ATP por el complejo F_1F_0 ATP sintasa. Con el objeto de caracterizar los efectos estructurales y funcionales de la interacción de la IP con el segmento F_1 , hemos analizado mediante dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca así como filtración en gel, las propiedades y la composición de subunidades del complejo F_1 -IP endógeno. La remoción de la inhibición (la activación) se usó como indicador de la presencia de la IP en este complejo.

Mediante filtración en gel, se observó que el complejo F_1 -IP existe en dos diferentes estados de agregación: una dimérica y una monomérica. Estas dos formas existen en un equilibrio dependiente de la concentración de proteína y de pH. La incubación a 4° C favorece la forma monomérica del complejo F_1 -IP sin activarlo y durante la activación del complejo F_1 -IP, la forma dimérica decrece; esto sugiere que el monómero del F_1 -IP es la forma susceptible de la activación (i.e. liberar a la IP).

Las estructura secundaria de los complejos F_1 -IP monoméricos y diméricos, así como la fluorescencia de sus tirosinas, no es muy diferente de la del complejo F_1 . En contraste, en la forma dimérica del F_1 -IP se observa un incremento en la fluorescencia intrínseca del único triptofano del complejo, el cual está localizado en la subunidad ϵ .

La dimerización del complejo F_1 -IP parece no afectar su activación *in vitro*, pero introduce un paso más en su regulación y es posible que el efecto de la dimerización sobre la regulación sólo se aprecie en la partícula submitocondrial o en la mitocondria.

El análisis estructural de la IP reveló una posible bisagra. Esta novedosa bisagra podría regular las interacciones entre la IP y el complejo F_1F_0 .

Abstract.

ATP synthase is an enzymatic complex central for the aerobic metabolism because it couples the proton motive force, generated by the respiratory chain, to the synthesis of ATP from ADP and Pi. The synthase comprises two segments, an hydrophilic one named F_1 and a hydrophobic one named F_0 . The *E. coli* ATP synthase is composed by eight distinct subunits (with the following stoichiometry): $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, in the F_1 and ab_2c_9-12 , in the F_0 . In mammals, such as *B. taurus*, the complex is formed of about 16 different subunits, including the six homologous subunits mentioned for *E. coli*. Those subunits without prokaryotic counterpart are called supernumerary. The inhibitory protein (IP) is one of such subunits. The IP gets its name from its capacity to inhibit the hydrolytic activity of the F_1 segment as well as ATP hydrolysis and synthesis by the F_1F_0 ATP synthase. To characterize the structural and functional effects due to the IP interaction with the F_1 , we have analysed the endogenous F_1 -IP complex through circular dichroism, intrinsic fluorescence as well as size exclusion chromatography. The release of the ATP hydrolysis inhibition, termed activation, was used as a indicator of the presence of the IP in this complex.

Through size exclusion we observed that the endogenous F_1 -IP complex exists in two different aggregation status: a dimer and a

monomer. These two forms are in a protein- and pH-dependent equilibrium. The incubation of this complex at 4° C favours the monomeric form of the F_1 -IP complex without any activation, and the activation of the F_1 -IP complexes decreases the dimeric form; this suggests that the monomeric F_1 -IP is the form of the complex that is susceptible to activation (i.e. IP release).

The secondary structure of the dimeric and monomeric F_1 -IP complexes as well as the intrinsic fluorescence of their tyrosines is very similar to that of the F_1 complex. However, in the dimeric form of the F_1 -IP there is an increase in the intrinsic fluorescence of the only tryptophan of the complex, which is in the ϵ subunit.

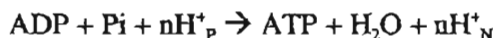
The dimerization of the F_1 -IP complex seems to have no effect on its activation *in vitro*, but introduces one step more in the regulation of the activity of the F_1 complex. It is possible that the effect of the dimerization step over the regulation of the ATP synthase is only noticeable in the submitochondrial particle or the in the mitochondria.

Structural analysis of the IP reveals a possible hinge. This novel hinge could regulate the interactions between IP and the F_1F_0 complex.

Introducción.

Para que la energía liberada por cualquier proceso exergónico sea aprovechada por un proceso endergónico, es indispensable que ambos procesos estén acoplados; este principio es central en la Biología ya que sin este acoplamiento ninguna reacción endergónica procedería. Un metabolito central para este acoplamiento es el ATP.

El ATP es sintetizado durante el proceso conocido como fosforilación oxidativa, en el que se acopla el potencial redox generado en el ciclo de Krebs, en forma de NADH, al transporte vectorial de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Esto a su vez genera un potencial electroquímico que es acoplado por la ATP sintasa a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. El marco teórico por el que entendemos este proceso es la hipótesis quimiosmótica, propuesta por Peter Mitchell¹. La síntesis del ATP puede escribirse de esta manera:



Donde los subíndices _p y _N se refieren a los lados positivos y negativos de una bicapa lipídica.

A diferencia de la fosforilación a nivel de sustrato, en la fosforilación oxidativa no hay un intermediario fosforilado para la formación del ATP. La estabilidad y funcionalidad de la ATP sintasa es indispensable para la obtención de energía en este proceso metabólico.

La mitocondria, estructura y función.

En células eucariontes, la ATP sintasa se localiza en las mitocondrias, las cuales son organelos de diversas formas y tamaños (1 a 10 μm), su número varía significativamente entre los distintos tipos celulares y entre diferentes organismos (ej. de 1 hasta 1000 mitocondrias por célula²). En plantas también existen ATP sintasas en los cloroplastos; por otra parte, en endotelio³⁻⁵, hepatocito⁶ y otros tipos celulares humanos, se ha detectado una ATP sintasa en la membrana plasmática.

Las mitocondrias están formadas por dos diferentes membranas, una externa y una interna; en el compartimento delimitado por la membrana interna, i.e. la matriz mitocondrial, se localizan las enzimas responsables de procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea y la beta oxidación. En la matriz mitocondrial también se localiza el ADN mitocondrial, y embebidos en la membrana interna mitocondrial se encuentran los transportadores de iones y de metabolitos así como las enzimas que efectúan la fosforilación oxidativa. La ultraestructura mitocondrial no es simplemente un par de membranas concéntricas; la membrana interna mitocondrial exhibe una serie de pliegues, llamados crestas mitocondriales, que le permiten tener una mayor superficie en un volumen reducido (figura 1).

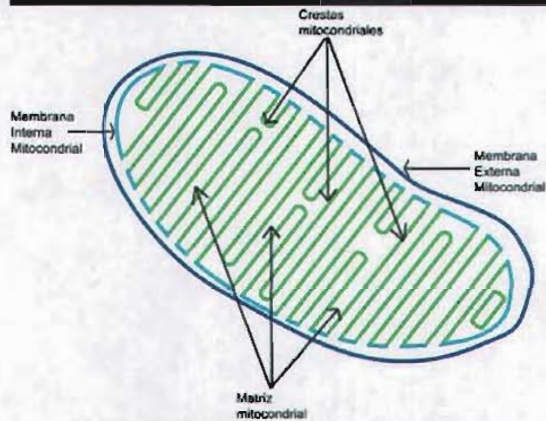


Figura 1. Esquema de las membranas externa, interna y de las crestas mitocondriales.

Se muestra la membrana externa en azul oscuro, la membrana interna mitocondrial (también llamada límite de la membrana interna⁷) en azul claro y las crestas mitocondriales en verde. Aunque la membrana interna y las crestas mitocondriales son una bicapa continua, se señalan con colores diferentes para enfatizar las diferencias en la composición proteica de las membranas.

Las crestas mitocondriales también delimitan ciertos microambientes en la mitocondria: en los puntos más cercanos entre la membrana externa e interna mitocondriales, parecen localizarse los sitios de importación de proteínas a la mitocondria^{8,9}, justo donde finalizan las crestas. Las crestas están enriquecidas en ATP sintasa, el Complejo III, el acarreador de fosfatos y el de adenín nucleótidos⁷. Recientemente se ha sugerido que tanto la ATP sintasa (ó Complejo V) así como algunos miembros de la cadena de transporte de electrones, son responsables de mantener la forma de las crestas¹⁰. En mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 2C) se ha demostrado que algunas subunidades supernumerarias de la ATP sintasa, son directamente responsables de dimerizar al Complejo V. La ablación de dichas subunidades supernumerarias de F_o

conlleva a la pérdida de las crestas mitocondriales y a un fenotipo *petit*^{11,12} y un genotipo Rho^0 (carente de DNA mitocondrial). En mitocondrias de bovino se han descrito dos tipos de oligómeros que involucran a la ATP sintasa; por un lado se han encontrado dímeros, trímeros y tetrámeros de ATP sintasa, todos ellos activos¹³ y por otro, se ha purificado un complejo que involucra a la ATP sintasa así como al acarreador de adenín nucleótidos y al de fosfato^{14,15}.

Aún se desconoce la relevancia funcional de estos oligómeros en mitocondrias de bovino o en otras mitocondrias de células eucariontes.

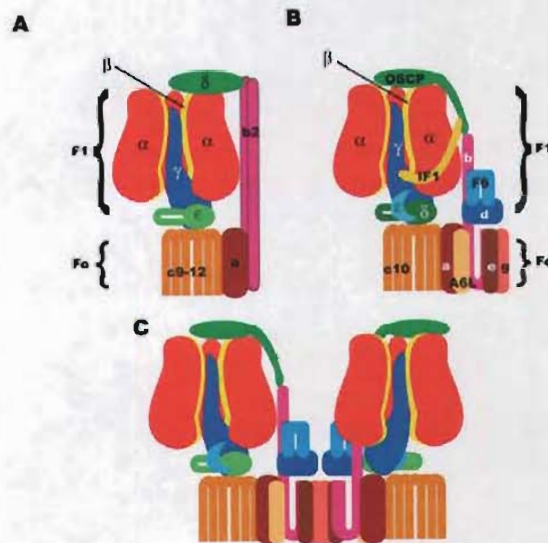


Figura 2. Esquema de las subunidades del complejo F_1F_o ATP sintasa basado en las estructuras cristalográficas^{16,17}, reconstituciones de subunidades aisladas¹⁸ y microscopía electrónica¹⁹.

En A se muestra el complejo F_1F_o de procariontes. En B se muestra el complejo F_1F_o de eucariontes. En C se muestra un dímero de F_1F_o de *S. cerevisiae* interactuando mediante las subunidades e y g en una interfase con F_o , c IP en una interfase de F_1 . Este esquema está basado en el modelo propuesto por Allen¹⁰.

La estructura de la ATP sintasa.

Estructuralmente, la ATP sintasa se divide en dos segmentos: un segmento hidrofóbico capaz de transportar protones, denominado como F_o , y un segmento hidrofílico que contiene los seis sitios de unión a nucleótidos (tres de los cuales son catalíticos) denominado como F_1 ; de esta designación surge el nombre de F_1F_o ATP sintasa. La enzima de *Escherichia coli* está

formada por ocho subunidades: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, en el segmento F_1 y ab_2c_{9-12} , en el segmento F_o (figura 2A), en eucariontes, como *Bos taurus*, el complejo está formado por 16 subunidades (figura 2B), incluyendo las antes mencionadas (Tabla 1). Las subunidades que solo se encuentran en las ATP sintasas de eucariontes se han designado como supernumerarias, y se desconoce si son requeridas para la catálisis, la regulación o la biogénesis del complejo enzimático.

Tabla 1. Composición de subunidades de los segmentos F_1 y F_o de la ATP sintasa de diferentes organismos.

Segmento	Subunidades			Estequiometría
	<i>Bos taurus</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	
F_1	α (55)	α (54)	α (55)	3
	β (51)	β (51)	β (50)	3
	γ (30)	γ (30)	γ (32)	1
	δ (15)	δ (14)	ϵ (14)	1
	ϵ (5.6)	ϵ (6.6)		1
	OSCP (20)	OSCP (20)	δ (19)	1
	IP (10)	IP (7.3)		1
F_o	a (24)	6 (27)	a (30)	1
	b (24)	4 (23)	b (17)	1-2
	c (7.6)	9 (7.7)	c (8.2)	9-12
	A6L (7.9)	8 (5.8)		1
	d (18)	d (10)		1
	f (10)	f (10)		n. d.
	F6 (8.9)	h (10)		1
		9 kDa		1
		15 kDa		1
	e (8.1)	e (10)		1
	g (11)	g (12)		1
		i (6.6)		1
		k (7.5)		n. d.

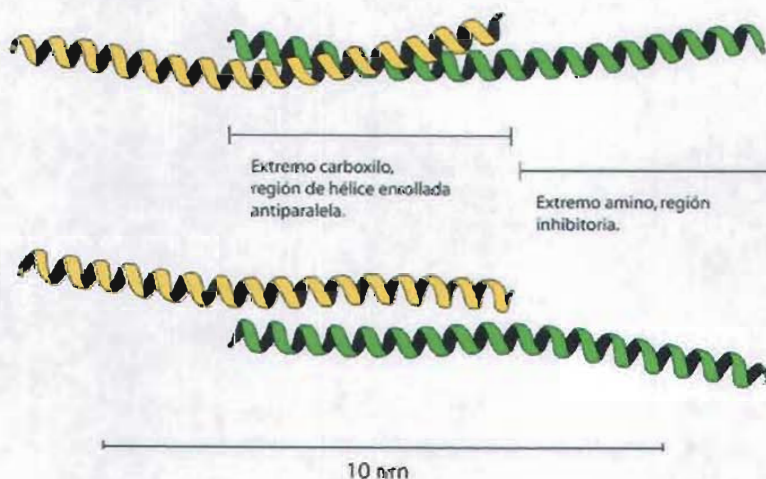
Los números en paréntesis son el peso molecular de las subunidades en kDa.

Aunque se conocen diversos mecanismos de regulación en las ATP sintasas²⁰, la IP ha recibido particular atención debido a su capacidad de inhibir la actividad de hidrólisis de ATP del segmento hidrofílico F_1 , así como de inhibir la síntesis e hidrólisis de ATP en el complejo F_1F_0 ATP sintasa²¹ por lo que posiblemente tenga un papel importante en la regulación fisiológica de la actividad del complejo.

La IP de *B. taurus* fue descrita originalmente como una proteína pequeña, básica, no dializable²², que además de

inhibir la hidrólisis de ATP por el complejo F_1 , también le confiere estabilidad a condiciones desnaturalizantes²³⁻²⁵. Se conoce la secuencia de aminoácidos que componen al inhibidor de bovino así como los de otras especies eucariontes. La IP de *B. taurus* está compuesta por 84 residuos, su estructura tridimensional en forma soluble y unida al sector F_1 ha sido determinada^{26,27}. Es una hélice alfa elongada de más de 100 Å de longitud, capaz de dimerizar consigo misma por su extremo carboxilo de manera antiparalela^{26,28} (figura 3).

A



B

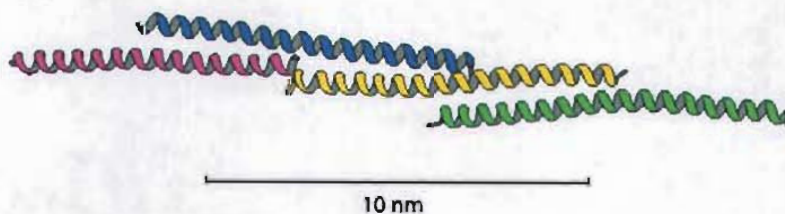


Figura 3. Esquema de listones de la estructura de la proteína inhibidora (IP).

En A se muestran dos diferentes proyecciones de la forma dimerica, indicando la región dimerizante antiparalela o de anclaje formada por el extremo carboxilo terminal. También se señala el extremo amino terminal que es la región inhibitoria. En B se muestra la estructura del tetrámero de la celda unitaria del cristal de la IP²⁶.

Mecanismo catalítico de la F_1F_0 ATP sintasa.

El complejo de la ATP sintasa funciona como una bomba de protones rotatoria, bajo este esquema y tomando como modelo el complejo de *E. coli*, las subunidades $\alpha_3\beta_3\delta ab$ forman un segmento estático o estator, respecto al cual la subunidades $\gamma\epsilon c_{10}$ forman el rotor²⁹. El flujo de protones a través de la subunidad *c* que a su vez arrastra a las subunidades γ y ϵ . Durante su rotación, la asimetría intrínseca de γ impone una asimetría en el oligómero estático formado por las subunidades $\alpha_3\beta_3$, que contienen los sitios catalíticos. Estas subunidades se mantienen fijas relativas a γ mediante la interacción de δ y *ab* (figura 4). En la siguiente sección se discutirán en detalle las evidencias que apoyan este esquema, desglosadas para el segmento F_1 y para el segmento F_0 .

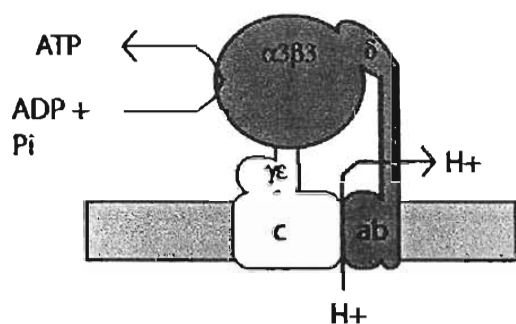


Figura 4. Representación de la ATP sintasa de *E. coli* y su subdivisión en estator y rotor. En gris oscuro se incluyen las subunidades $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$, que conforman el estator, en blanco las subunidades $\gamma\epsilon c_{10}$ que conforman el rotor. El mismo esquema se aplica para la ATP sintasa de eucariotes, donde las subunidades supernumerarias asociadas a la subunidad *b* (i.e. OSCP, δ y F6) forman parte del estator. Las subunidades δ y ϵ pertenecen al rotor eucariote. De acuerdo a la figura 2, la IP podría ser la única subunidad que en su interacción inhibitoria, anclarían al rotor y al estator³⁰.

Mecanismo catalítico del segmento F_1 :

El mecanismo rotacional de hidrólisis y síntesis de ATP por la F_1F_0 ATP sintasa se propuso inicialmente con base en experimentos de reacciones de recambio de oxígeno en los nucleótidos en el segmento F_1 . Con base en estos experimentos, Paul D. Boyer propuso el *mecanismo de sitios alternates*³¹ (MSA). En éste mecanismo, planteado en función de la hidrólisis de ATP, la enzima posee tres sitios catalíticos los cuales se encuentran en las interfases $\alpha\beta$. Cada uno de estos sitios tiene conformación y afinidad diferentes por el ATP en cualquier momento dado del ciclo catalítico. Para mayor claridad, a cada uno de estos sitios los llamaremos *T*, *L*, y *O* (por *Tight*, *Loose* y *Open*, respectivamente) en orden decreciente de afinidad. En condiciones de sustrato subestequiométrico respecto al segmento F_1 , sólo el sitio de más alta afinidad une al ATP (el sitio *T*). Los sitios *L* y *O* permanecerán vacíos^{32,33}; en esta condición ocurre la catálisis *unisito*, en la que sólo el sitio de mayor afinidad es capaz de hidrolizar ATP. En condiciones donde el sustrato se encuentra en alta concentración, procede la catálisis *multisito*, en la cual más de un sitio es capaz de hidrolizar ATP. Existen dos esquemas diferentes para describir la catálisis multisito: el bisito y el trisito.

En la catálisis bisito, el sitio de mayor afinidad, *T* (menor a 10 nM en la enzima de *B. taurus*), se ocupa primero. El producto, que en el caso de la hidrólisis es ADP, no se libera del sitio *T* hasta que no ocurra la unión de un segundo nucleótido en el siguiente de sitio *L*, que tiene menor afinidad. Consecuentemente el sitio *T* tomará la conformación del sitio *O* liberando al producto de la reacción,

simultáneamente, el sitio *L* se convertirá en *T*, y el sitio *O* en el *L*. Este ciclo se repite durante la catálisis³⁴.

En el esquema trisítio, se requiere que los tres sitios catalíticos estén ocupados para que la catálisis alcance su máxima velocidad (V_{max}). El sitio *T* contiene ATP y es un estado previo a la catálisis, el sitio *SO* (*semi-open*, forma intermedia entre el sitio *T* y el sitio *O*) contiene ADP y Pi y es un estado transitorio posterior al rompimiento del

enlace fosfodiéster (figura 5, estado 1). El sitio *L* está listo para recibir al nucleótido, su ocupación dispara la cooperatividad; en el sitio *T* se rompe el enlace fosfodiéster y se transforma en *SO* (figura 5, estado 2). Simultáneamente, el sitio *L* se transforma en *T*; el sitio *SO* se transforma *O* y posteriormente en *L* (figura 5, estado 3). Con la repetición de este ciclo, procede la catálisis³³.

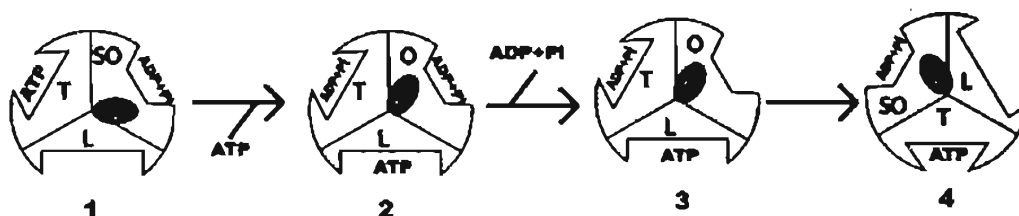


Figura 5. Esquema del Mecanismo de Sitios Alternantes (MSA).

Se presenta el segmento F_1 como se observaría desde la membrana interna mitocondrial. La rotación de la subunidad γ es la que ocurre durante la hidrólisis de ATP. De izquierda a derecha: el estado 1 representa un F_1 con dos sitios ocupados. El estado 2 muestra tres sitios ocupados, la subunidad γ ha rotado 80° con respecto al estado 1. El estado 4 es el mismo que el estado 1 tras una rotación de 120° de la subunidad γ , la cual forma el eje central rotatorio.

En ambos esquemas, es la energía de unión de los nucleótidos la que impulsa la rotación de la subunidad γ .

Durante la catálisis multisitio se ocupan los sitios de baja afinidad y la actividad de la ATP sintasa se incrementa 10^5 veces respecto a la velocidad de la actividad unisitio. Por estas características particulares, la cinética del complejo se describe como de cooperatividad positiva para la catálisis (es decir, la unión subsecuente de cada nucleótido aumenta la velocidad de la catálisis) y cooperatividad negativa para la unión del sustrato (la unión subsecuente de cada nucleótido reduce la afinidad por el siguiente). Aún se debate si es necesario que los tres sitios se encuentren ocupados durante la catálisis

multisitio o si la catálisis procede de acuerdo al esquema bisitio; los datos estructurales del complejo F_1 , confirman el mecanismo de sitios alternantes y parecen apoyar el mecanismo trisítio. Para la síntesis de ATP, el mecanismo arriba descrito opera en sentido contrario, donde la rotación de γ estará impulsada por la rotación del segmento F_0 .

Desde el punto de vista de la regulación de la hidrólisis de ATP por la IP, hay que enfatizar que para que la IP de bovino se una al F_1 , se requieren varios ciclos catalíticos³⁵⁻³⁷, no así en el caso de *S. cerevisiae* en el que la inhibición es instantánea³⁸.

Existen otros inhibidores de la ATPasa se han estudiado en detalle y se cuenta con su estructura cristalográfica en complejo con

el F_1 , tales como el DCCD¹⁶, la aurovertina³⁹, la efrapeptina⁴⁰, el NBF⁴¹ y la tentoxina⁴². En concordancia con el mecanismo de sitios alternantes para inhibir la catálisis multisitio sólo se requiere la unión de una sola molécula de los inhibidores^{16,39-42}.

Otra prueba importante del mecanismo de sitios alternantes es la visualización de la rotación de la subunidad y dentro del complejo F_1 durante la hidrólisis de ATP⁴³ gracias a que las metodologías experimentales para una sola molécula han sido refinadas al grado que se ha logrado hacer rotar la enzima en el sentido necesario para sintetizar ATP^{44,45}. Con estas técnicas se ha demostrado la completa reversibilidad del mecanismo rotatorio del segmento F_1 .

Mecanismo catalítico del segmento F_0 :

El mecanismo catalítico con el que se describe la operación del segmento membranal conocido como F_0 es principalmente especulativo ya que carece de una estructura de alta resolución de dicho segmento, aunque se ha determinado la estructura de alta resolución del oligómero de la subunidad c ⁴⁶. Mediante mutagénesis dirigida, entrecruzamientos, así como microscopía electrónica y de fuerza atómica, se ha definido la estructura de baja resolución del segmento F_0 ⁴⁷ (figura 6A, B y C) donde las subunidades c forman un oligómero de 10 a 14 subunidades, que se arregla en un anillo simétrico. Las subunidades a y b se unen a un lado de este oligómero (figura 6A), las subunidades a y c son indispensables para el bombeo de protones, y por separado no son funcionales. La subunidad b vincula al segmento F_0 con el F_1 , y tiene una función de soporte, mientras que en la interfase entre la subunidad a y las subunidades c se lleva a cabo el transporte de protones^{48,49}

(o de Na^+ , en el caso de *I. tartaricus* y *P. modestum*^{50,51}, figura 6D).

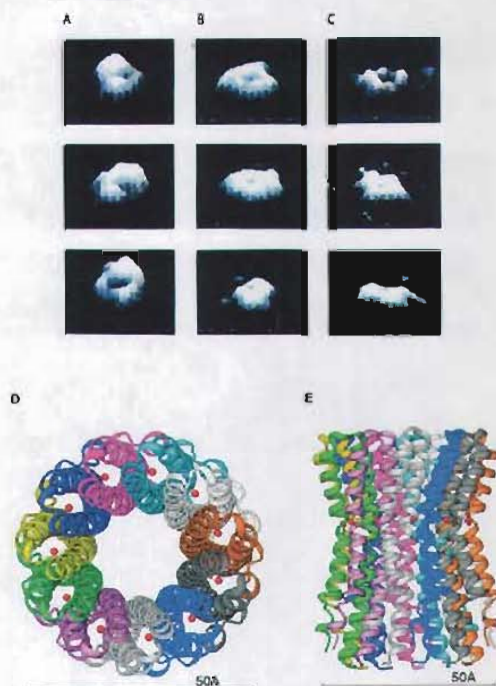


Figura 6. Estructuras de baja resolución obtenidas por microscopía de fuerza atómica del complejo F_0 de *E. coli* (A, B y C) y la estructura cristalográfica del oligómero de subunidades c de *I. tartaricus* (D y E).

En A se muestra el F_0 completo, en B la imagen de un F_0 tratado con tripsina, y en C se observa un oligómero reconstituido de subunidades c . En D y E se muestra el oligómero de subunidades c de la F_0F_1 ATP sintasa de *I. tartaricus* resuelto por difracción de rayos X, visto de manera perpendicular y paralela a la membrana, respectivamente.

Se ha propuesto que las interacciones requeridas para el transporte de protones están dadas por el residuo R210 (arginina 210), de la subunidad a , y el residuo D61 (aspártico 61) de las subunidades c (numeración de residuos de *E. coli*). Esta interacción se da entre dos subunidades c y una subunidad a , aunque se requiere un oligómero de c intacto. En esta interfase, la subunidad a formaría un hemicanal que daría acceso a los protones

del medio al residuo D61, el hemicanal permitiría el paso de protones mediante el oligómero de subunidades c dando un flujo neto de un lado al otro de la membrana. En este esquema, el residuo R210 de la subunidad a actuaría como "guardavalla", bloqueando el flujo inespecífico^{48,49}.

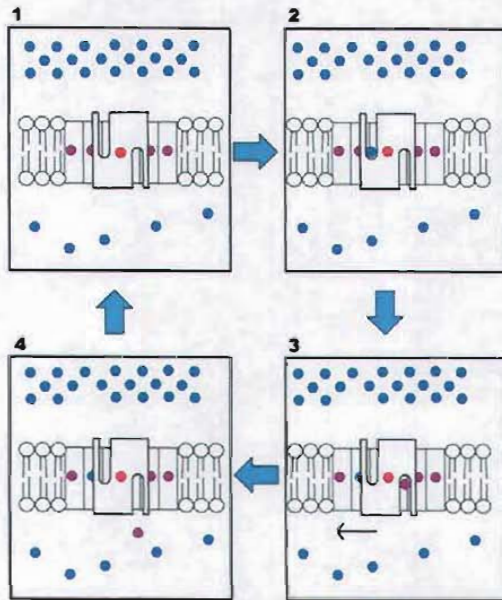


Figura 7. Esquema del transporte de protones por las subunidades a y c de segmento Fo.

La concentración de protones de un lado al otro de la membrana es diferente. En el centro está la subunidad a con el residuo R210 en rojo. La subunidad a forma un hemicanal que da acceso a los residuos D61 de las subunidades c (morado). En el estado 1 se muestra el hemicanal y dos subunidades c vacías (con carga negativa) mantenidas en posición por la R210 (cargada positivamente). En el estado 2, un protón del medio ocupa una subunidad c, neutralizando la carga, esto conlleva a la rotación unidireccional del oligómero de c. Esto permite la liberación de un protón (estado 3). En el estado 4, ocurre el transporte neto de un protón.

De la estructura de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del monómero de la subunidad c a diferentes valores de pH, se ha propuesto que el cambio en el estado de

protonación del residuo D61 afecta la conformación de esta subunidad^{52,53}. Este cambio conformacional, permitiría que el residuo R210 regule la liberación de los protones hacia el otro lado de la membrana (figura 7).

De manera semejante al mecanismo de sitios alternantes del F₁, el mecanismo del paso de protones en el F_o es cooperativo: la modificación química de una sola subunidad c detiene por completo el transporte.

Usando la F₁F_o de *Propionigenium modestum* (la cual transporta Na⁺ en lugar de H⁺), se ha mostrado que el oligómero de subunidades c rota en relación al oligómero de $\alpha_3\beta_3$, por lo que se asume que el mecanismo global de la F₁F_o ATP sintasa debe ser el de un motor rotatorio⁴⁵.

Subunidades supernumerarias.

La mayoría de las subunidades supernumerarias no tienen una función conocida, algunas de ellas, como las subunidades d, y F6, forman parte del estator de la enzima junto con las subunidades b y OSCP¹⁸. En bacterias, el estator está compuesto por el dímero de subunidades b y la subunidad δ ⁵⁴; pero en eucariontes, donde no se forma un dímero de subunidad b por cada F₁F_o, estas subunidades supernumerarias complementan a la b. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, se ha observado que a nivel de F_o, las subunidades e, g e i en conjunto con la subunidad b, dan origen a la oligomerización de la ATP sintasa¹¹.

Globalmente, las subunidades supernumerarias complementan al estator de la ATP sintasa, permitiendo la oligomerización del complejo así como posiblemente su estabilización durante la catálisis⁵⁵ (figura 1C).

Se ha propuesto que la IP y la OSCP interactúan mediante el carboxilo de la IP y una región indeterminada de la OSCP⁵⁶. Ambas subunidades, de manera independiente, confieren termoestabilidad al complejo F_1 (figura 1B).

Estructuras cristalográficas.

En 1994 se describió la primera estructura atómica de un subsegmento de la F_1F_0 , el complejo formado por las subunidades α, β, γ de mitocondria de corazón bovino⁵⁷. En esta estructura se observaron a alta resolución las diferencias entre los sitios catalíticos predichos por el mecanismo de sitios alternantes⁵⁸ (figura 5 y figura 8). En buena medida, la primera estructura confirmó el mecanismo, pues cada uno de sus tres sitios catalíticos tiene una conformación diferente y un nucleótido diferente unido:

El sitio catalítico β_{TP} , que contiene AMP-PNP (análogo del ATP), el sitio β_{DP} , tiene ADP, y el sitio β_E , que está vacío. (figura 8A). Los sitios llamados T, L y O corresponden a β_{DP} , β_{TP} y β_E , respectivamente⁵⁹. El sitio SO se ha identificado en una estructura del F_1 con ADP-fluoroaluminato (un análogo del estado de transición del sustrato ATP), donde el sitio β_E está en una conformación semicerrada⁶⁰ (figura 5 estado SO).

La estructura del segmento F_1 tiene a las subunidades α y β alternadas, formando un hexamero en torno a la subunidad γ . Es en las interfases entre α y β donde se forman los seis sitios de unión a nucleótidos, tres catalíticos y tres no-catalíticos. La subunidad γ tiene contactos simultáneamente con las tres subunidades α y las tres subunidades β , pero por su asimetría intrínseca, todos los contactos

son diferentes entre sí. En la base de la subunidad γ se encuentran las subunidades δ y ϵ . Estas se encuentran a más de 20 Å de distancia de las subunidades α y β y también se localizan de manera asimétrica (figura 8B). En la estructura resuelta para el complejo F_1c_{10} de *S. cerevisiae* se observa que al menos la subunidad δ se encuentra cerca de las subunidades c y en consecuencia, de a y b ¹⁷.

Se han determinado dos estructuras tridimensionales de la IP de mitocondrias de corazón de bovino en su forma soluble:

Una estructura del extremo carboxilo de la IP (del residuo 48-84) resuelta por RMN²⁸. En la determinación de RMN se observó que el extremo carboxilo de la IP forma una hélice enrollada izquierda antiparalela, que sigue las reglas de las heptadas⁶¹⁻⁶³. La secuencia de este extremo carboxilo contiene las cinco histidinas de la IP silvestre, sin embargo, no mostró sensibilidad a los cambios en el pH²⁸.

La otra, de una IP mutante (donde se sustituyó la histidina 49 por una lisina²⁶), fue resuelta por rayos X. En esta estructura la IP soluble se observa como una hélice alfa elongada de cerca de 100 Å de longitud (figura 3A), la unidad asimétrica contienen un tetrámero formado por un dímero de dímeros⁶⁴ (figura 3B). El dímero está constituido por la interacción de los extremos carboxilo similar a la observada en la estructura de RMN²⁸. El dímero de dímeros se forma por una interacción asimétrica de un par de los extremos amino terminales. En esta forma de tetramerización, dos de los extremos amino inhibitorios quedan libres²⁶.

La estructura resuelta por rayos X del complejo F_1 -IP reconstituido exhibe

dos ocupancias ²⁷, en una de ellas, fueron resueltos los residuos 2-40 de la IP; en la otra ocupancia se resolvieron los residuos 2-47. En ambos casos los extremos amino terminales de la IP están en la interfase $\alpha\beta_{DP}$, próximos a la región DELSEED. En esta última ocupancia, los residuos 40-47 están completamente fuera de la

interfase $\alpha\beta_{DP}$. En ninguna de las dos ocupancias se resolvió el extremo carboxilo, pero la relación espacial entre las dos ocupancias apunta hacia la formación de un dímero como se había mencionado antes^{65,66}.

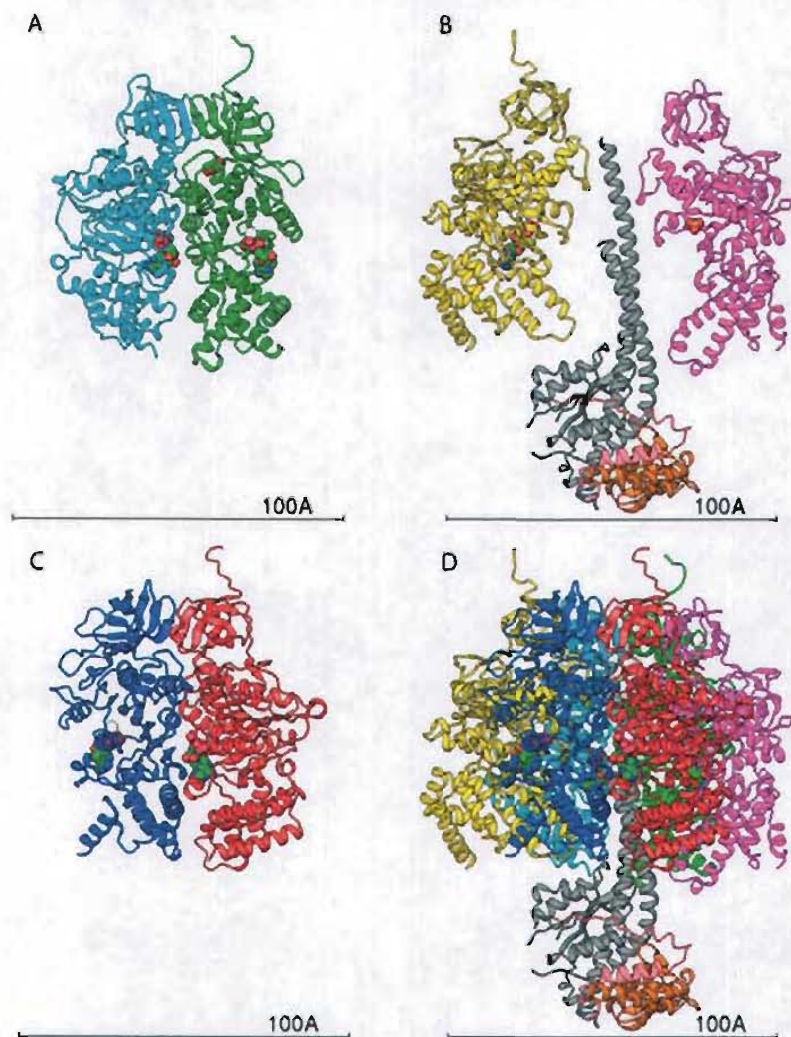


Figura 8. Estructura cristalográfica del segmento F_1 ¹⁶, en representación de listones.

Se muestran diferentes planos del segmento F_1 , en A se muestran las subunidades α_{TP} (azul claro) y β_{TP} (verde), en B las subunidades α_{DP} , β_E (morado), γ (gris), δ (anaranjado) y ϵ (rosa), en C las subunidades α_E (rojo) y β_{DP} (azul oscuro). En D se muestran todos los planos juntos, A al fondo, B en medio y C al frente.

Repercusiones de la estructura en el estudio del mecanismo catalítico de la F_1F_0 ATP sintasa *in silico*.

La disponibilidad de las estructuras cristalográficas y de RMN del complejo F_1 y varias formas de la subunidad c ha permitido probar los modelos propuestos para la catálisis *in silico*. Se ha tomado a la subunidad β independiente del complejo F_1 y, mediante dinámica molecular^{67,68}, se ha mostrado que la presencia de nucleótido (ATP ó ADP) es suficiente para que el sitio O se transforme en el sitio T. Con la parametrización de las áreas accesibles al solvente determinadas a partir de la estructura de la subunidad β , se determinó la energía involucrada en la interacción nucleótido-subunidad β ; este cálculo coincidió con los datos obtenidos por calorimetría de titulación⁶⁹.

Con el complejo F_1 se ha tratado de simular la catálisis química utilizando mecánica cuántica y mecánica molecular^{59,70}, también se han simulado los cambios conformacionales en β derivados de la rotación de γ mediante dinámica molecular dirigida y dinámica molecular sesgada⁷¹. También se ha tratado de cuantificar la flexibilidad intrínseca de todas las subunidades en el complejo F_1 utilizando análisis de modos normales⁷² y para definir el sitio cristalográfico que corresponde al sitio T del *mecanismo de*

*sitios alternantes*⁵⁹. Los resultados apoyan un mecanismo como el que se describe en la figura 5, donde el sitio β_{TP} corresponde al sitio T, y en el que la rotación de γ en 90° precede la ruptura del enlace fosfodiéster del ATP⁷³.

La disponibilidad de estructuras de alta resolución ha abierto nuevas puertas al estudio de la F_1F_0 ATP sintasa, sus subunidades y su comportamiento a nivel atómico.

Mecanismo de regulación de la actividad de la ATP sintasa por la IP.

La IP se une al segmento F_1 (ó con el complejo F_1F_0), en una estequiometría de una IP por cada F_1 ⁷⁴⁻⁷⁶, y esta interacción evita la actividad catalítica. En la enzima de bovino, se requieren varios ciclos catalíticos multisitio para que esta unión sea productiva³⁵⁻³⁷, esto se ilustra en la figura 9, donde el estado 1 es idéntico al estado 1 en el esquema trisitio de la figura 5. El estado de la F_1 al que se une la IP, está representado en el estado 2 (figura 9), que es un estado transitorio y se convierte al estado 3 rápidamente, al unirse la IP, el ATP recién unido queda atrapado, pero el sitio SO puede transformarse en O y liberar el ADP + Pi. El estado 3 es equivalente a la estructura cristalográfica del F_1 -IP reconstituído²⁷, si bien este esquema se basa en la catálisis trisitio, pero puede ajustarse a la catálisis bisitio. La IP inhibe la catálisis multisitio, pero su efecto sobre la catálisis unisitio es aún debatido^{77,78}.

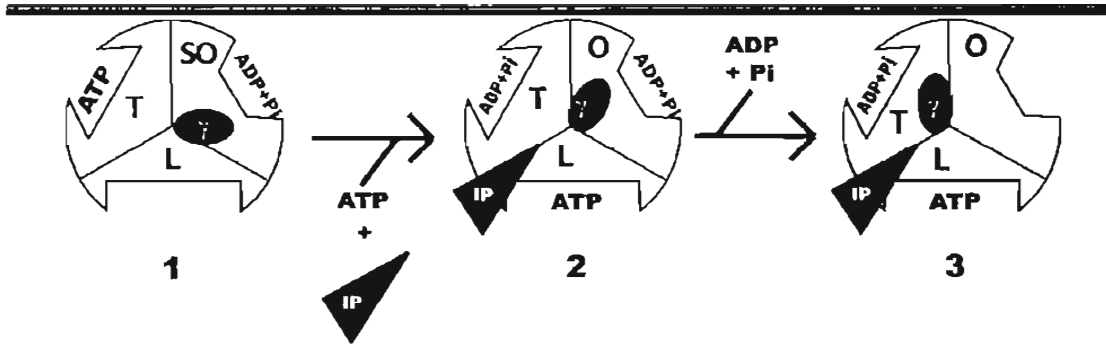


Figura 9. Esquema de la interacción de la IP con el complejo F_1 en el contexto del Mecanismo de Sitios Alternantes.

El esquema 3 representa el estado de los sitios catalíticos en la estructura cristalográfica del complejo F_1 -IP. En el esquema 2 se muestra otro posible estado, donde la unión de ATP en el sitio L ocasionó una rotación de la subunidad γ de 80° . También se ha propuesto un esquema donde la IP se une al sitio O^{27} .

Mecánicamente, la IP previene los cambios conformacionales de la subunidades $\alpha\beta$, también interacciona con las subunidades γ y ϵ , posiblemente previniendo el giro del rotor^{27,30,79}. Es posible que este mecanismo de regulación, i.e. la prevención de la rotación en la enzima, sea semejante al que ocurre en la regulación mediada por oxidorreducción de tioles en las ATP sintasas de cloroplasto^{20,80-82}, y los cambios conformacionales de la subunidad ϵ de las ATP sintasa de eubacterias⁸³⁻⁸⁶.

La proteína inhibidora de *B. taurus* en su forma madura está formada por 84 residuos, los 40 residuos que forman el extremo amino están involucrados directamente con la inhibición del complejo F_1 ²⁷. Los 44 residuos restantes del extremo carboxilo forman una región regulatoria o de anclaje^{56,87,88}. Entre las secuencias de IP conocidas el extremo amino se encuentra conservado. A pesar de esto, la IP de *B. taurus* es un buen inhibidor de la F_1 de *S. cerevisiae*, pero no inhibe a la F_1 de *E. coli*⁸⁹.

La inhibición de la hidrólisis de ATP por la IP es dependiente del pH: en

condiciones ácidas la IP es un inhibidor eficiente, pero en condiciones alcalinas, la IP pierde su capacidad de inhibir; esto se cumple para las proteínas inhibitoras de varias especies⁹⁰⁻⁹². En el caso de la IP de *B. taurus* el residuo responsable de esta sensibilidad al pH es la histidina 49 ya que cualquier mutación sobre este residuo alteran la dependencia al pH de la inhibición⁹³.

Mediante centrifugación al equilibrio y entrecruzamiento, se ha observado que la IP en su forma soluble también cambia su estado oligomérico en función del pH, a pH ácido, la IP es dimérica; pero a pH alcalino, se tetrameriza⁶⁶. Se ha propuesto que esta tetramerización es directamente responsable de la inactivación de la IP a valores de pH alcalinos; en contraposición, en partículas submitocondriales (PSM) la proteína inhibidora parece no liberarse al medio durante la activación⁹⁴⁻⁹⁶. Esto ha sugerido la existencia de un sitio de anclaje no-inhibitorio⁵⁶.

El que la proteína inhibidora se capaz de dimerizarse tiene una consecuencia importante: dado que se dimeriza por su extremo carboxilo, el extremo amino (la región inhibitoria)

queda libre para unirse al segmento F_1 , consecuentemente ocurre la dimerización de los segmentos F_1 que tienen unida a su IP. Esto se ha verificado en el complejo F_1 -IP reconstituido⁹⁷. El complejo F_1 -IP endógeno es aquel que ha sido purificado a partir de las mitocondrias con su IP unida. Por el contrario, el complejo F_1 -IP reconstituido es aquel que se obtiene al mezclar purificaciones independientes de F_1 y de IP. Este último se obtiene en condiciones donde se mezclan cinco IP por cada F_1 , muy por encima de la estequiometría de una IP por una F_1 , que se ha determinado en las mitocondrias. El complejo F_1 -IP endógeno se activa con la remoción de la IP (inducida *in vitro* por pH alcalino, alta concentración de sal y 40° C), y alcanza valores de hidrólisis de ATP idénticos a los esperados en un complejo F_1 puro⁹⁸. El complejo F_1 -IP reconstituido muy diferente al endógeno en términos de su activación^{98,99}, esto es, se necesitan condiciones más agresivas mantenidas por tiempos largos para activar al complejo. Debido a estos factores, se

creo que el complejo endógeno representa al complejo F_1F_0 *in vivo*.

Existen dos propuestas principales que asignan la región inhibitoria mínima a diferentes segmentos de la IP:

En la primera, la región inhibitoria mínima consiste de los residuos 14- 47. Esta región corresponde a la que se encuentra en la interfase $\alpha\beta_{DP}$ en la estructura cristalográfica del complejo F_1 -IP reconstituido⁸⁸.

En la segunda, la región inhibitoria mínima estaría localizada en el segmento 42-58. En el contexto de la estructura cristalográfica, este segmento se encuentra fuera de la interfase $\alpha\beta$, sin ningún contacto con el F_1 . La inhibición por este segmento es aditiva con la de la IP silvestre, indicando un sitio de interacción diferente⁸⁶.

Es indudable que para entender todos los aspectos estructurales y funcionales que caracterizan a la ATP sintasa, aún hace falta conocer la estructura e interacciones de las subunidades de F_0 , y de las subunidades supernumerarias, con el segmento F_1 .

Planteamiento general del problema.

La IP es un regulador endógeno de la actividad de síntesis e hidrólisis de ATP en el complejo F_1F_0 de mitocondrias de *Bos taurus*, es sensible a cambios de pH y al potencial electroquímico.

Ante la posibilidad de una regulación basada en cambios en el estado oligomérico de la F_1 , se decidió estudiar los efectos de la IP sobre este complejo.

En el presente trabajo se busca caracterizar la interacción de la IP con el complejo F_1 tomando como paradigma el complejo F_1 -IP endógeno, el cual representa una forma de la enzima más cercana a su forma *in vivo* que el complejo F_1 -IP reconstituido.

Hipótesis:

Existe abundante literatura sobre la inhibición de la hidrólisis de ATP por la IP y un mecanismo para la regulación del estado oligomérico de la IP, pero se carece de un esquema que integre el mecanismo de inhibición, las interacciones no-inhedoras de la IP y la regulación por pH de la inhibición. Con el conocimiento de los efectos funcionales y estructurales de la interacción de la IP con el complejo F_1 , debe ser posible plantear un esquema general de la regulación de la actividad de hidrólisis de ATP del segmento F_1 por la IP.

Por ello, planteamos los siguientes objetivos particulares:

Objetivos:

1.- Obtener un complejo F_1 -IP endógeno de alta pureza, evitando en lo posible la contaminación de la preparación con complejo F_1 .

2.- Caracterizar los efectos de la interacción de la IP sobre los diferentes niveles de estructura del complejo F_1 -IP aislado.

3.- Caracterizar los efectos funcionales de la interacción entre el F_1 y la IP.

4.- Con las estructuras tridimensionales del complejo F_1 , la IP y del F_1 -IP reconstituido, y los datos obtenidos de dinámicas moleculares, proponer un modelo que integre las observaciones *in vitro* e *in silico*.

Resultados.

La sección de resultados se dividió en dos partes: una corresponde a los experimentos realizados para cumplir con los objetivos 1, 2 y 3 . La otra es el análisis teórico de las estructuras cristalográficas del complejo F_1 , F_1 -IP reconstituido e IP cristalográfico y de RMN, para cumplir con el objetivo 4.

Resultados I.

Purificación del complejo F_1 -IP.

El complejo F_1 -IP endógeno obtenido por cromatografía de afinidad¹⁰⁰ (ver Métodos: Preparación de F_1 -IP) tuvo una actividad basal de hidrólisis de ATP de 5-10 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, y cuando se incubó en condiciones de activación (ver Métodos: Activación de F_1 -IP) alcanzó una actividad de 80-90 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Este complejo fue sometido a una cromatografía por exclusión molecular (CEM) en HPLC utilizando una columna SEC 4000, el perfil cromatográfico mostró dos componentes diferentes: el primero, de menor tiempo de elución (mayor peso molecular aparente) contribuye mayoritariamente al perfil cromatográfico (figura 10, línea discontinua). El segundo es un hombro distinguible del primer componente. De la calibración de la columna se obtuvieron los siguientes pesos moleculares aparentes: 670 000 y 380 000 Daltones (inserto de la figura 10) para el primer y segundo componentes, respectivamente.

El perfil cromatográfico del complejo F_1 solamente reveló un componente de aproximadamente 370 000 Daltones (figura 10, línea sólida), la cromatografía de una mezcla de F_1 -IP endógeno y de F_1 (figura 10, línea punteada) mostró que el hombro del complejo endógeno es indistinguible del complejo F_1 . Sin embargo, la actividad de hidrólisis de ATP basal del complejo F_1 -IP endógeno fue baja y activable (ver más adelante).

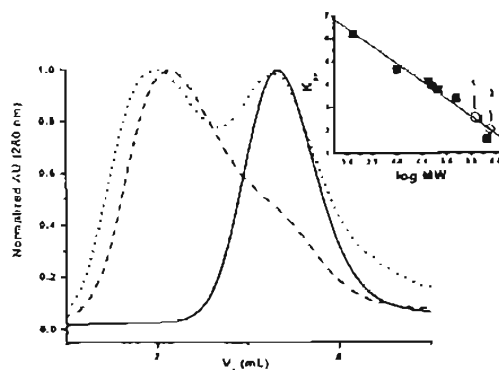


Figura 10. Cromatografía de exclusión molecular del complejo F_1 -IP endógeno. Perfil cromatográfico el complejo F_1 (línea continua), del complejo F_1 -IP endógeno (línea discontinua) y de la mezcla del F_1 -IP + F_1 (línea punteada) se comparó contra varios estándares de peso molecular (ver Métodos: Calibración de la CEM). En el regráfico de calibración (inserto) se indican la fracción monomérica (1) y la fracción dimérica (2). En este experimento se utilizaron 100 μg de F_1 y F_1 -IP. En la mezcla F_1 -IP + F_1 , se utilizaron 100 μg de F_1 -IP y 10 μg de F_1 .

A partir de esta separación por exclusión molecular, se intentó fraccionar ambos componentes, para ello se seleccionaron las fracciones señaladas en la figura 11A. Al recromatografiar la fracción dimérica (figura 11B) y la fracción monomérica (figura 11C) de manera independiente, se observó que la fracción dimérica exhibía aún cierto contenido de monómero, también la fracción monomérica mostró un remanente de dímero; esto sugirió una interconversión entre ambas formas oligoméricas.

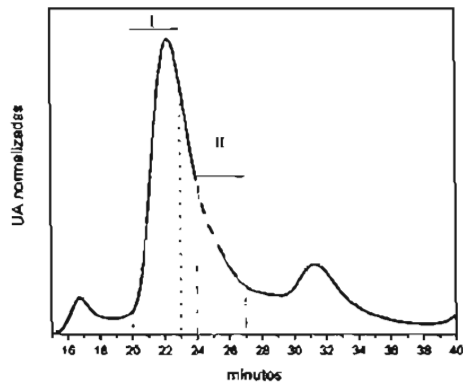
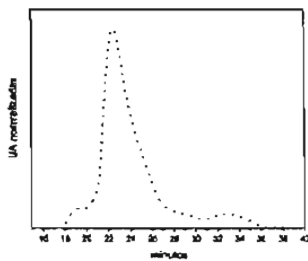
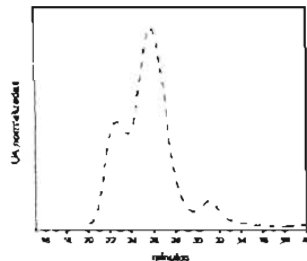
A**B****C**

Figura 11. Repurificación de las formas dimerica y monomérica del complejo F_1 -IP endógeno.

De la CEM en FPLC (con la columna Superdex 200 HR) del complejo F_1 -IP endógeno obtenido por cromatografía de afinidad, se eligieron fracciones de alto peso molecular (dímero, líneas rojas) y de bajo peso molecular (monómero, líneas verdes). Las fracciones dimerica y monomérica se concentraron y se recromatografiaron (B y C, respectivamente).

La posibilidad de interconversión se exploró utilizando la CEM a diferentes concentraciones de proteína (figura 12). A 3.5 mg/ml se obtuvo un perfil muy semejante al de la figura 11A, a 1 mg/ml se observó un incremento en el tamaño del hombro que corresponde a la fracción monomérica, y a 0.16 mg/ml todo el complejo F_1 -IP se encontró en la forma monomérica (Tabla 2).

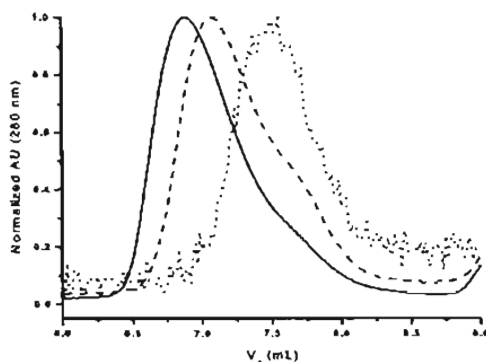


Figura 12. Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC del complejo F_1 -IP a diferentes concentraciones de proteína.

Se muestran los cromatogramas del complejo F_1 -IP a 14 mg/ml (línea continua), 10 mg/ml (línea discontinua) y a 0.32 mg/ml (línea puntuada). El amortiguador usado es el medio para FPLC (ver Métodos: Preparación de F_1 -IP).

Tabla 2. Deconvolución de los cromatogramas a diferentes concentraciones de proteína.

Proteína total (mg)	Máximo de elución (mL)	Distribución (porcentaje)	
		D	M
350	6.9	69 ± 10	21 ± 10
100	7.0	57 ± 10	23 ± 10
16	7.5	1 ± 10	90 ± 10

Las áreas bajo la curva de los cromatogramas de la figura 12 se usaron para estimar la cantidad de dímero y monómero en las muestras. Los cálculos se realizaron como se indica en Métodos.

A pesar de esta interconversión, las fracciones dimérica y monomérica se obtuvieron en formas enriquecidas de cada una, a la fracción enriquecida con la forma dimérica se le denominó dímero (D); a la fracción enriquecida con la forma monomérica se le llamó monómero (M).

La electroforesis desnaturizante del dímero y del monómero (figura 13) mostró los mismos componentes: $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$, OSCP e IP. La actividad basal de la fracción D fue de 7-13 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y la de la fracción M fue de 10-15 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Esto sugirió que ambas fracciones tenían su IP endógena unida a la F_1 . La velocidad de activación de ambas fracciones, al ser incubadas en 100 mM de KCl, pH 8.0 a 40° C (ver Métodos: Activación de F_1 -IP), es muy similar (figura 14), y al término de 1 hora de incubación ambas preparaciones

alcanzaron 100 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, actividad típica del complejo F_1 .

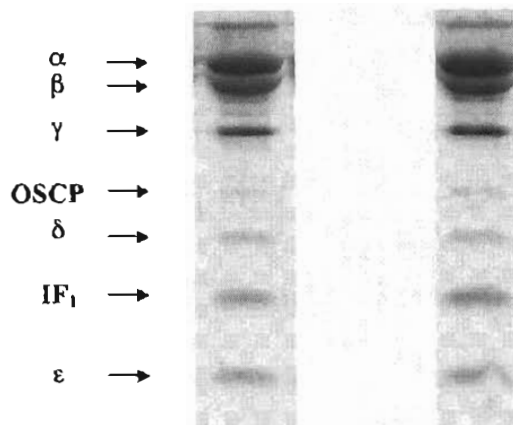


Figura 13. Electroforesis desnaturizante de los complejos F_1 -IP dimérico (A) y monomérico (B).

Las fracciones dimérica y monomérica obtenidas como en la figura 12, se corrieron en un gel de von Jagow al 16%. Se indican las subunidades de ambas fracciones basadas en los pesos moleculares aparentes.

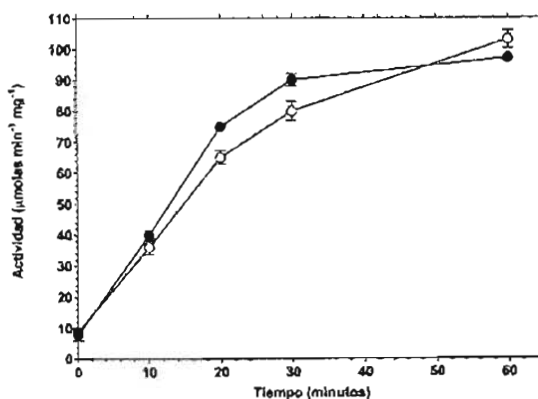


Figura 14. Activación de los complejos F_1 -IP dimérico (círculos abiertos) y monomérico (círculos cerrados) del complejo F_1 -IP.

La activación se realizó como se indica en los Métodos a pH 8.0, a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las barras de error corresponden al error estándar de 5 experimentos diferentes.

Se prepararon fracciones de Dímero (D) y de Monómero (M) para obtener imágenes en el microscopio electrónico. La fracción monomérica observada a dos diferentes aumentos (figura 15A y 15C, respectivamente) mostró las esferas características de la F_1 , la mayoría separadas entre sí, con la

fracción dimerica se observó una parte de la población como dos esferas muy próximas (figura 15B y 15D). Cabe resaltar que ambas fracciones fueron diluidas 1000 veces (aproximadamente a $1 \mu\text{g/ml}$), explicando la baja proporción de dímeros observados en la fracción D.

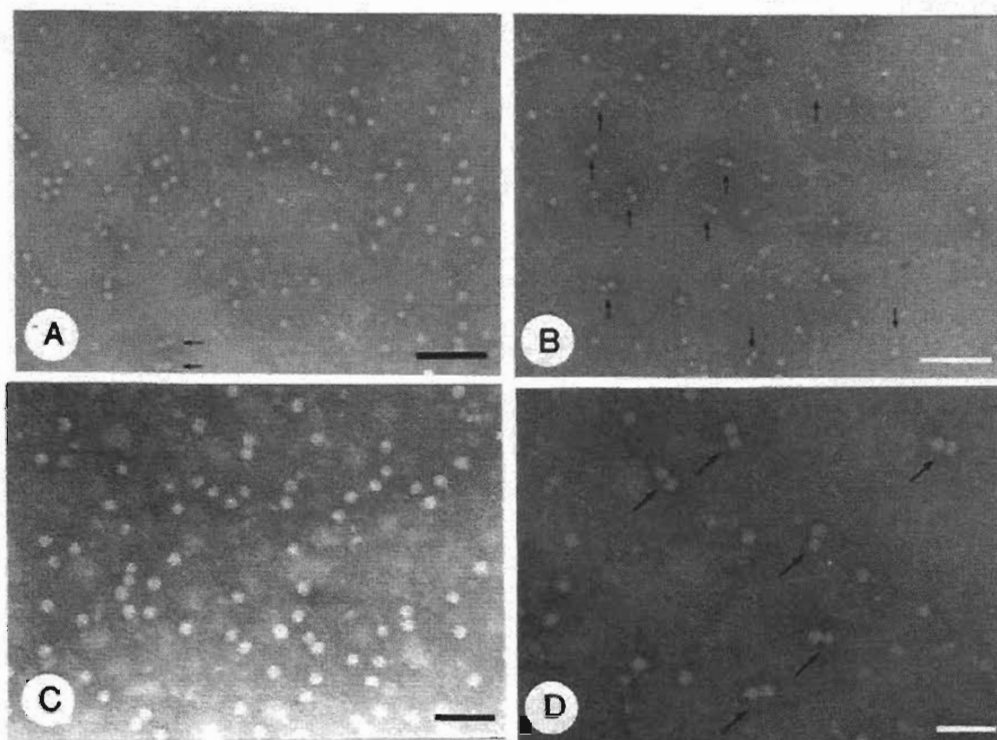


Figure 15. Microscopia electrónica de los complejos F_1 -IP dimerico y monomérico.

En A y B se muestran los monómeros y dímeros, respectivamente, a un aumento de 120 000x. Las flechas indican los dímeros que se observan en ambas preparaciones. En C y D se muestran los mismos campos que en A y B, pero con un aumento de 200 000x.

Las barras corresponden a 100 nm en A y B, y a 50 nm en C y D. Las muestras fueron preparadas como se describió antes⁹⁷ pero las rejillas del microscopio electrónico se lavaron con el *medio para HPLC* (ver Métodos) antes de la tinción con tungstato de metilamina al 4%.

Características espectroscópicas de los complejos F_1 -IP dimericos (D) y monoméricos (M).

Se decidió estudiar las fracciones enriquecidas de dímero y monómero por

medio de dicroísmo circular (CD) con el fin de identificar cambios en las estructuras secundarias de los complejos cuyo origen pudiera atribuírsele a la IP. Como punto de referencia, se determinó el espectro de CD del segmento F_1 . Se obtuvo el espectro de CD desde 260 nm

hasta 185 nm (UV lejano, figura 16). Los espectros de CD del complejo F_1 y del monómero fueron prácticamente indistinguibles. El espectro del dímero fue ligeramente más intenso en la región de las hélices alfa (alrededor de los 220 nm). La deconvolución de los espectros,

mediante el uso de redes neurales¹⁰¹ no reveló ninguna diferencia significativa, esto es, las diferencias observadas en los contenidos de estructura secundaria de los diferentes complejos están dentro del error experimental.

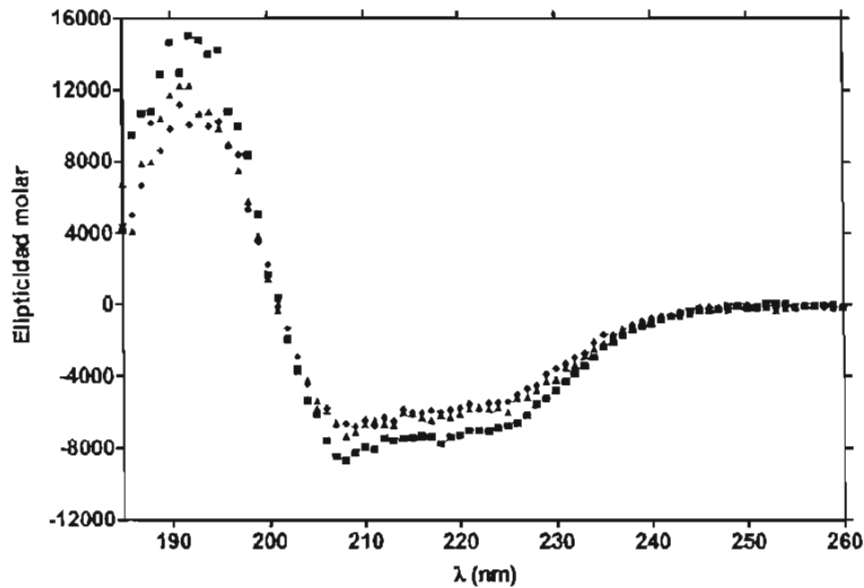


Figura 16. Espectros de dicroísmo circular de los complejos F_1 -IP dimérico (cuadros), monomérico (triángulos) y del complejo F_1 (rombos).

Los espectros fueron realizados a 20 °C, a pH 6.5 (ver Métodos). Para el cálculo de la elipticidad molar se utilizaron los pesos moleculares indicados en Métodos: Dicroísmo Circular en el UV lejano. Cada espectro es el promedio de tres espectros de la misma muestra.

Los espectros de fluorescencia intrínseca de los complejos mostraron algunas diferencias. El espectro de emisión al excitar a 280 nm, mostró que la intensidad de emisión de la forma dimérica del F_1 -IP es mayor que la de la forma monomérica, la cual a su vez, es mayor que la del segmento F_1 (figura 17A). El espectro de emisión al excitar a 295 nm mostró un comportamiento diferente (figura 17B), el espectro de emisión del complejo F_1 es igual al del monómero, sin embargo la forma dimérica del F_1 -IP muestra el doble de intensidad de

emisión. En el complejo F_1 hay 98 tirosinas y un triptofano, **OSCP** contribuye con 5 tirosinas y la IP solo tiene una tirosina y ningún triptofano, dado que la contribución de la IP a la emisión a 280 nm debe ser nula, las diferencias se deben a cambios en el ambiente global de las tirosinas. Por el contrario, el efecto sobre la emisión del único triptofano del complejo F_1 puede deberse a cambios muy localizados en el ambiente de ese residuo, estos cambios solo ocurrieron en la forma dimérica del F_1 -IP.

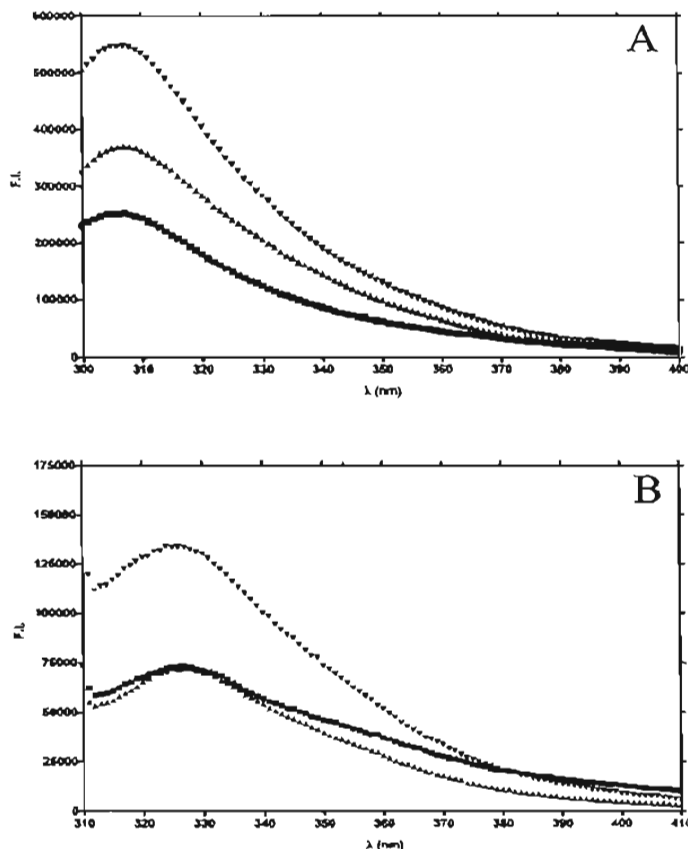


Figura 17. Espectros de fluorescencia intrínseca de los complejos F_1 -IP dímérico (triángulos invertidos), monomérico (cuadros) y del complejo F_1 (círculos).

En A se muestran los espectros de emisión obtenidos al excitar a 280 nm. En B se muestran los espectros de emisión al excitar a 295 nm. Los espectros fueron realizados a 20 °C, pH 6.5 (ver Métodos), y son el promedio de tres de la misma muestra.

Interconversión entre dímeros y monómeros de F_1 -IP endógenos.

Se estudió la estabilidad de los complejos D y M a 4 °C en función del tiempo, bajo estas condiciones la liberación de la IP fue casi nula. Para el dímero, una incubación de 2 horas, convirtió 13 % del D en M (Tabla 3, experimento A), al agregar 100 mM KCl al medio de incubación los cambios ocurrieron más rápido, en la incubación de 1 minuto, 18 % de D se transformó en M. Al cabo de 2 horas, sólo quedó un 19 % de

D (Tabla 3, experimento B). De manera similar, la incubación del monómero en presencia de KCl durante 1 minuto provocó la disminución del D en un 23 % (Tabla 2, experimento C), al cabo de 2 horas se observó sólo un 10 % de D. La actividad basal de hidrólisis de los complejos F_1 -IP dímérico y monomérico fueron de 2 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, y al cabo de las 2 horas de incubación a 4° C alcanzaron 16±1 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y 17±2 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente. Eso sugiere que durante esta interconversión, la mayor parte de los complejos permanecen con

su IP unida, a pesar de la monomerización del D.

Tabla 3. Estabilidad de los complejos F₁-IP dimérico y monomérico.

Experimento.	Preparación inicial.	Tiempo.	Porcentaje de Dímero.	Porcentaje de monómero.
A	Dímero	0	60±2	40±3
		1 min	54±2	46±3
		1 hora	49±4	51±3
		2 horas	47±3	53±2.7
B	Dímero	0	60±2	40±3
		1 min	41±1.5	58±2
		1 hora	20±2.1	79±2
		2 horas	19±1.7	80±1
C	Monómero	0	33±4	67±3
		1 min	9.7±0.7	90±1
		1 hora	18±1.7	91±1.6
		2 horas	10±1.2	89±1.7

Las incubaciones se realizaron en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5, a 4 °C. A los tiempos indicados se tomó una alícuota y se inyectó al HPLC. Los experimentos B y C tienen además 100 mM de KCl. Los porcentajes de dímero y monómero fueron calculados a partir del área bajo la curva de los cromatogramas como se indica en Métodos. Se muestra el promedio de dos experimentos.

Dado que la dimerización es una reacción bimolecular, se estudió el efecto de la concentración de proteína en la proporción Dímero/Monómero (D/M) de las fracciones del complejo F₁-IP. La fracción dimérica fue incubada a una concentración de 10 mg/ml y a una de 1 mg/ml (figura 18A), y se siguió mediante CEM. Se observó que a 1 mg/ml, la fracción dimérica pasó de una proporción de 1.6 D/M a 0.5 al cabo de cuatro horas de incubación mientras que a 10 mg/ml,

pasó de 2.0 D/M a 1.5 en el mismo intervalo. En la fracción monomérica, incubada a una concentración de 1 mg/ml, la proporción pasó de 0.48 a cerca de 0.2 en seis horas; a 10 mg/ml la proporción inicial de 0.66 se incrementó a 0.8 durante la dos y cuatro horas de incubación, y decreció 0.65 a las seis horas de incubación (figura 18B). La concentración de proteína tuvo el efecto esperado en una reacción bimolecular, estabilizando la forma dimérica a mayor concentración.

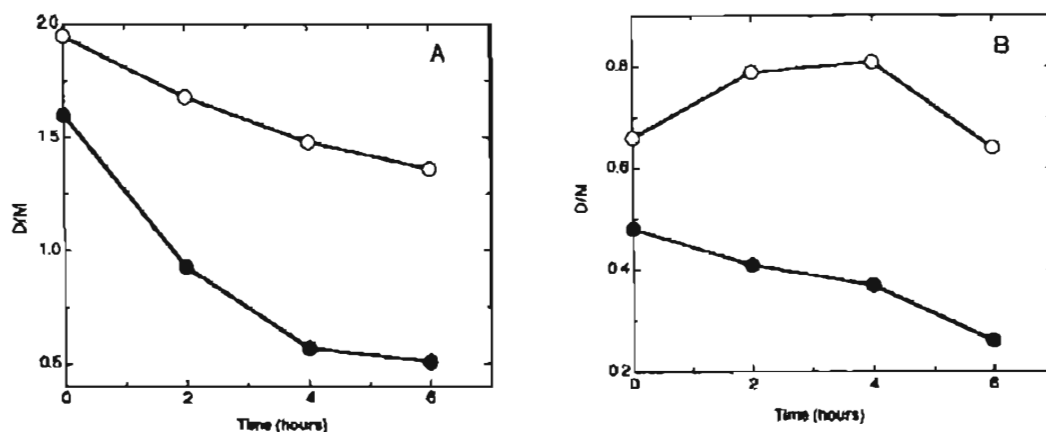


Figura 18. Re gráfico de las proporciones Dímero/Monómero como función de la concentración de proteína.

Las muestras a 10 mg/ml (círculos abierto) y a 1 mg/ml (círculos cerrados) fueron incubadas a pH 6.5, 25 °C, como se indica en Métodos. A) La fracción dimérica a 10 mg/ml cambia más lentamente su proporción D/M que la dimérica a 1 mg/ml. B) La fracción monomérica exhibe un incremento transitorio de D.

Liberación de la IP de los complejos F₁-IP dimérico y monomérico endógenos.

El complejo F₁-IP endógeno obtenido de la purificación por CA se incubó en condiciones de activación pH 8.0, 100 mM KCl y 40 °C). La figura 19 muestra la activación de las fracciones dimérica y monomérica del complejo F₁-IP a diferentes valores de pH, ambas especies respondieron de manera semejante, a pH 6.5, ambas formas se activaron lentamente (figura 19, cuadros), y a pH 7.0, ambas formas se activaron más rápidamente que a pH 6.5 (figura 19, triángulos invertidos), y se diferenciaron ligeramente entre sí; a pH 8.0 se observó la activación más rápida, también indistinguible entre dímero y monómero.

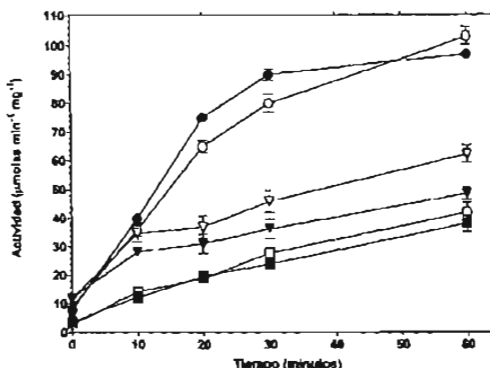


Figura 19. Activación de las fracciones dimérica (símbolos cerrados) y monomérica (símbolos abiertos) del complejo F₁-IP en función del pH.

La activación se llevó a cabo a pH 6.5 (cuadros), pH 7.0 (triángulos invertidos) y pH 8.0 (círculos), en amortiguador Tris/Bis-Tris (ver Métodos: Activación de F₁-IP), con 1 mg/ml de proteína. Las barras representan el error estándar de 5 experimentos.

Estas activaciones también fueron seguidas por CEM, de manera que los cambios en el estado oligomérico de los complejos F₁-IP fueron correlacionados con los cambios en actividad, ya que de esta información podría deducirse si

ambas especies, dímero y monómero, son capaces de liberar a la IP. Los perfiles cromatográficos de la fracción dimérica (figura 20A) y la fracción monomérica (figura 20B) se obtuvieron como función del tiempo (a 0, 10 y 60 minutos). En los perfiles cromatográficos la forma monomérica del F_1 -IP y la F_1 son indistinguibles. El contenido de F_1 en el cromatograma se estimó a partir de las activaciones a pH 8.0 (figura 19) de la siguiente manera:

Se asume que tanto el complejo F_1 -IP dimérico como el monomérico puros tienen una actividad basal de cero, cualquier actividad diferente de cero es debida a la contaminación por F_1 en el pico correspondiente al monómero⁶⁵. Además, la máxima actividad que se alcanza con la activación de los complejos F_1 -IP es de $100 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, este es el 100% de actividad cuando todos los complejos F_1 -IP han liberado a su proteína inhibidora.

En el tiempo cero, la fracción dimérica estaba formada por 60% de dímero y 40% de monómero (figura 20A), con una actividad basal de hidrólisis de ATP de $6 \pm 2 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (figura 19), esta actividad basal podría corresponder a un 6% de contaminación por F_1 . A los 10 minutos de activación, se observó 33% de dímero y 66% de monómero, con una actividad de hidrólisis de $40 \pm 1 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, en este punto sólo se ha

alcanzado un 40% de la actividad máxima ($40 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), y sólo queda el 33% de dímero. Si el 60% de actividad restante dependiera de la activación del dímero de F_1 -IP, este sería insuficiente para alcanzar el 100%. Al cabo de 60 minutos, todo el dímero ha desaparecido y se alcanzó la actividad de $100 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

El mismo experimento se realizó con la fracción monomérica (figura 20B), en el tiempo cero, el monómero estaba compuesto por 33% de dímero y 66% de monómero, con una actividad basal de hidrólisis de ATP de $7 \pm 1 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (figura 19). A los 10 minutos, los dímeros fueron el 19% y los monómeros el 81%, la actividad de hidrólisis de ATP fue de $36 \pm 2 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Esto es, falta más del 60% de activación cuando sólo queda 19% de dímero, si la activación dependiera de la transformación del dímero de F_1 -IP este sería insuficiente para alcanzar el 100% de la actividad. A los 60 minutos, había un 100% de monómero y se alcanzó la activación máxima. Es importante notar que al inicio de la activación de la fracción monomérica, se observó un 66% de monómero con una actividad baja de hidrólisis. Este dato, junto con la conversión de dímeros en monómeros que ocurre a 4°C , podría indicar que el monómero de F_1 -IP se acumuló durante la activación.

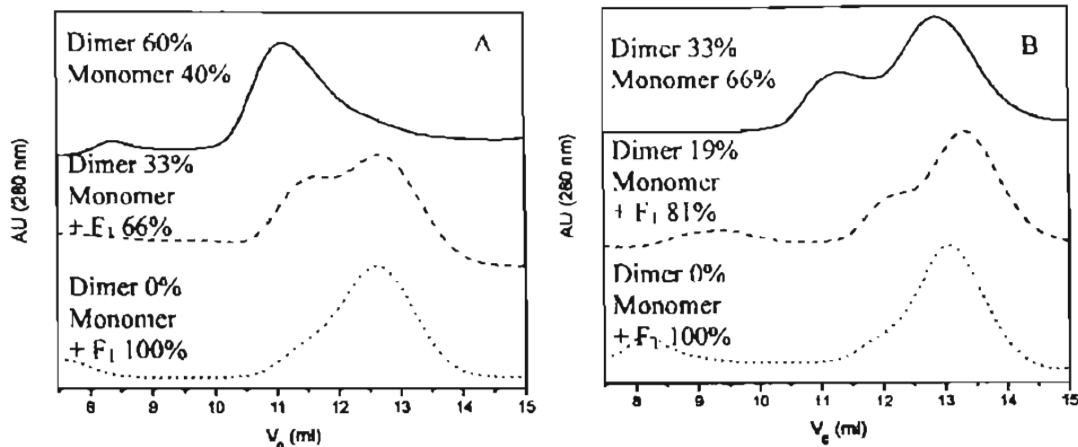


Figura 20. Perfiles cromatográficos de las fracciones dimérica y monomérica del complejo F_1 -IP endógeno durante la activación a pH 8.0.

Se muestran los perfiles cromatográfico de la activación (a 1 mg/ml de proteína) de la fracción dimérica (A) y monomérica (B), respectivamente, a diferentes tiempos: al tiempo cero (línea sólida), a los 10 minutos (línea discontinua) y a los 60 minutos (línea punteada). En el lado izquierdo de la gráfica se indica el porcentaje de dímero y monómero obtenido por la deconvolución del perfil cromatográfico.

Para determinar el efecto de la interconversión Dímero/Monómero sobre la activación, se realizó la incubación para activar los complejos F_1 -IP a alta concentración de proteína, cuando se activaron las fracciones dimérica y monomérica a 10 mg/ml, la velocidad de activación decreció a la mitad (figura 21). La activación del dímero a 1 mg/ml durante 10 minutos presentó una actividad de $40 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, en cambio, a 10 mg/ml durante 10 minutos alcanzó una actividad de $16 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Con la fracción monomérica ocurrió lo mismo, indicando que cuando se favorece la forma dimérica se hace más lenta la activación.

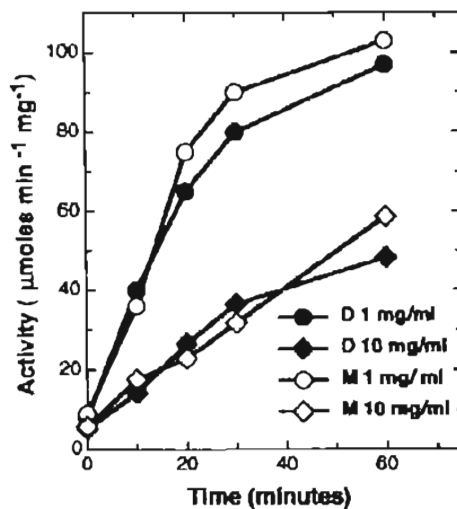


Figura 21. Activación de las fracciones dimérica (símbolos cerrados) y monomérica (símbolos abiertos) del complejo F_1 -IP endógeno.

Los dímeros y monómeros se activaron a 10 mg/ml (rombos) ó a 1 mg/ml (círculos) a pH 8.0 y 40 °C. En los tiempos indicados, se tomó una alícuota para determinar actividad.

Resultados II

Reinterpretación Estructural de las Interacciones de la IP con el complejo F_1 .

En la sección de Resultados I se mostró que la fluorescencia intrínseca del único triptofano del complejo F_1 incrementó su intensidad en el dímero de F_1 -IP respecto al complejo F_1 (figura 17 y 22). Disponiendo de la estructura cristalográfica del complejo F_1 -IP reconstituido, se buscó una explicación estructural para la observación anterior. El único triptofano del complejo F_1 se localiza en la base de la estructura, en la subunidad ϵ (figura 22). Debido a su movilidad, la subunidad ϵ sólo se ha resuelto en dos diferentes estructuras de la F_1 , una de ellas está inhibida con DCCD (F_1 -DCCD, PDB ID 1E79); un alineamiento estructural de la F_1 -DCCD con el complejo F_1 -IP reconstituido (figura 22) mostró que la IP está a una distancia de aproximadamente 12 Å de la subunidad ϵ . El mismo alineamiento también mostró que la interacción de la IP con la subunidad γ distorsionó a la hélice amino terminal de esta última. Esta hélice está a su vez en contacto con la subunidad ϵ y su triptofano.

Del mismo alineamiento estructural se pudieron determinar otros efectos de la IP en la interfase $\alpha\beta_{DP}$ donde interactúa:

1.- Los residuos 2 al 8 del extremo amino terminal de la IP interactúan con la subunidad γ , esta interacción distorsiona a la subunidad γ , empujando la hélice del extremo amino terminal hacia la interfase $\alpha\beta_{TP}$ (figura 22).

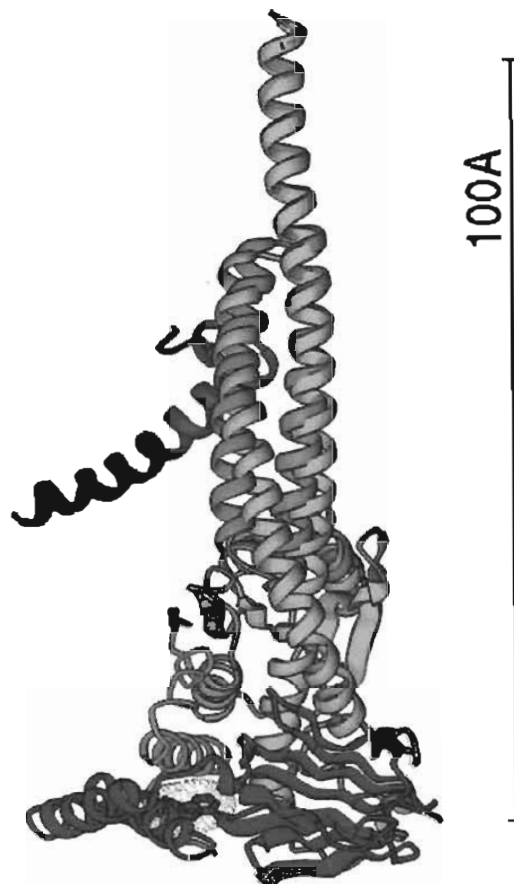


Figura 22. Alineamiento estructural de las subunidades γ y del complejo F_1 , y del complejo F_1 -IP reconstituido.

Se muestran las subunidades y del complejo F_1 (en amarillo, PDB ID 1E79) y la subunidad γ del complejo F_1 -IP (rojo, PDB ID 1OHH). La proteína inhibidora (verde, PDB ID 1OHH) interactúa con el extremo carboxilo terminal de la subunidad γ , introduciendo una distorsión que se transmite hasta el triptofano (superficie punteada en verde) de la subunidad ϵ (rosa, PDB ID 1E79) que esta en la interfase con las subunidad δ (azul, PDB ID 1E79).

2.- Los residuos 16 al 27 de la IP parecen desplazar los residuos 401 al 410 de la subunidad α de su lugar, partir de este movimiento, la distorsión se propaga a todo el extremo carboxilo de dicha subunidad α (figura 23).

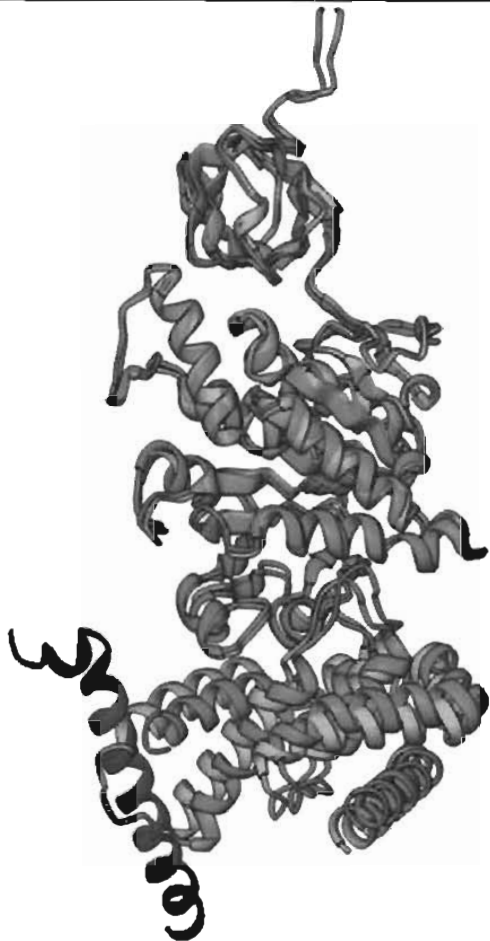


Figura 23. Alineamiento estructural de las subunidades α_{DP} del complejo F_1 y del complejo F_1 -IP reconstituido.

Se muestran la subunidad α_{DP} del complejo F_1 en ausencia de la IP (amarilla, PDB ID 1E79) y la subunidad α_{DP} en complejo con la IP (roja y verde, respectivamente. PDB ID 1OHH). Se aprecia la distorsión del extremo carboxilo terminal de la subunidad α_{DP} en presencia de la IP.

3.- Un cambio semejante se observa en la subunidad β . Resalta un cambio de orientación de un residuo del sitio catalítico que, en presencia de la IP, deja de hacer un puente de Hidrógeno con el nucleótido. Es en la interacción con esta subunidad donde se oculta la mayor cantidad de superficie (figura 24), en incluye los residuos 6-37 de la IP.



Figura 24. Alineamiento estructural de las subunidades β_{DP} del complejo F_1 y del complejo F_1 -IP reconstituido.

Se muestran la subunidad β_{DP} del complejo F_1 en ausencia de la IP (amarilla, PDB ID 1E79) y la subunidad β_{DP} en complejo con la IP (rosa y azul, respectivamente. PDB ID 1OHH).

A grandes rasgos, la interacción de la IP parece abrir la interfase $\alpha\beta_{DP}$ como una cuña y esta distorsión afecta al menos un residuo catalítico

Residuos de aminoácidos conservados de la IP entre diferentes especies.

En la figura 25 se muestra un alineamiento entre las IP de varias

especies, en la parte superior se indican las interacciones del segmento inhibitorio de la IP con las otras subunidades de la interfase $\alpha\beta\gamma_{DP}$ (cursivas) en la estructura del complejo F_1 -IP reconstituido. De los residuos indicados, sólo la serina 4 de la IP varía de especie a especie, el resto ésta altamente conservado entre mamíferos y levaduras. En la figura 25 también se indican las posiciones de la heptada en el extremo carboxilo. Una gran diferencia entre mamíferos y levaduras es que estas últimas tienen una IP más corta. Algunas posiciones de la heptada no están conservadas, de manera que llegan a sustituir H por S, Q ó incluso M que de acuerdo a las reglas de las petadas, estas sustituciones son desestabilizantes ¹⁰².

El motivo KKHHEne de la IP (en mayúsculas se indican los residuos idénticos y en minúsculas los que exhiben variaciones) se encuentra muy conservado en los mamíferos (figura 25). La segunda histidina de este motivo (el residuo 49 de la IP de *B. taurus*) es responsable de la sensibilidad al pH de la inhibición^{66,93}. En el estructura cristalográfica del complejo F_1 -IP, este motivo se encuentra fuera de la interfase con las subunidades $\alpha\beta\gamma_{DP}$ ²⁷.

Propiedades Dinámicas de la Estructura Cristalográfica de la IP.

Con la disponibilidad de la estructura cristalográfica de la IP (mutante H49K²⁶) se decidió explorar la existencia de dominios dinámicos en la proteína. Para este fin, se empleó el programa de computo conocido como DynDom^{103,104}. De manera general, este programa compara dos estructuras y determina si hay un cambio significativo entre ellas (ver Métodos: Determinación de Dominios Dinámicos utilizando el programa

DynDom), en caso de encontrarlo, determina los residuos involucrados y reporta varios valores asociados a las diferencias entre ambas estructuras. En la tabla 4 se muestran los datos obtenidos de este análisis al comparar los cuatro monómeros de la IP derivados de la estructura cristalográfica²⁶, en cinco de las seis comparaciones posibles, se determinó la existencia de dos dominios unidos por una bisagra efectiva (definida por los $C\alpha$ de la proteína que están a menos de 3Å del eje definido por el movimiento de los dominios). Los residuos consenso que forman la bisagra están en el segmento 45-52. Sólo en el caso de la comparación entre las cadenas C y D (C/D) el RMSD que identifica los dominios dinámicos no disminuyó respecto a un alineamiento global por ello, este resultado particular se considero como un control interno. Tomando en cuenta que la región de la IP definida por este algoritmo incluye al residuo 49, se consideró relevante confirmar de manera independiente los resultados anteriores.

Para ello se utilizó el Análisis de Modos Normales¹⁰⁵ (NMA), este análisis busca los movimientos de baja frecuencia (milisegundos) que exhiben las proteínas. Con cualquiera de los 4 monómeros de la IP se reprodujo el comportamiento observado para las estructuras determinadas cristalográficamente. En la comparación de los resultados, sólo un modo normal de la subunidad A de la IP se analizó con el programa DynDom (tabla 4), los valores obtenidos con esta aproximación son muy semejantes a los obtenidos para las comparaciones internas de la estructura cristalográfica (ej. la del par de monómeros A/D).

Como una tercera aproximación, se decidió generar un fragmento *in silico* de la IP, con los residuos 36-62. Este fragmento fue sometido a una Dinámica Molecular (MD) con hidratación explícita durante 3 ns a 300 K, al final de esta simulación, las trayectorias resultantes fueron analizadas por los algoritmos de Dinámicas Esenciales (ED). Este último algoritmo extrajo las conformaciones extremas que ocurrieron durante la simulación, finalmente, estas conformaciones extremas se analizaron

con el programa DynDom y los resultados se muestra en la tabla 4.

Los resultados están de acuerdo tanto con los parámetros obtenidos para el análisis de la estructura cristalográfica así como los derivados del NMA, a pesar de que la MD fue realizada con un segmento pequeño de la IP. En el caso de las IP de mamíferos, la región de la bisagra, que corresponde a la secuencia KKHHNEN de *B. taurus*, está muy conservada (figura 25).

Tabla 4. Identificación de Dominios Dinámicos de la IP utilizando el programa DynDom.

Par comparado	A/B	A/C	A/D	B/C	B/D	C/D ^a	A ^b	A ^c
Número de dominios.	2	2	2	2	2	-	2	2
Tamaño de dominio (residuos)	29 27	27 28	21 31	26 29	21 31	- -	29 32	9 13
RMSD de la cadena principal (Å)	0.31 0.12	0.41 0.43	1.08 0.53	0.38 0.46	1.07 0.6	- -	0.56 0.7	0.12 0.13
Intervalo de residuos en cada dominio:	22-50 51-77	22-48 49-76	25-45 46-76	22-47 48-76	25-45 46-76	-	21-49 50-81	38-50 51-59
Ángulo de rotación (degrees)	11.2	20.1	25.7	21.8	29.0	-	29.7	11.6
Traslación (Å)	0.3	-0.2	0.5	0.3	0.9	-	0.47	0.21
Cierre (%)	20.7	70.3	90.5	100	98.9	-	96.3	59.2
Residuos de la bisagra	48-52	48-49	45-47	47-48	45-46	-	46-51	49-51

^a Comparación de subunidades de la estructura cristalográfica de la IP que no exhibe dominios dinámicos.

^b Análisis de DynDom de dos conformaciones del primer modo normal de la cadena A de la IP.

^c Análisis de DynDom de las dos conformaciones extremas obtenidas por Dinámica Esencial del segmento 36-62 de la IP.

Diferencias entre las estructuras de la IP determinadas por difracción de rayos X y por RMN.

Dos diferencias básicas entre la estructura cristalográfica y la de RMN deben tenerse en cuenta:

i) La estructura cristalográfica tiene la mutación H49K²⁶. En ésta estructura sólo se resolvió uno de los dos E81 (figura 26).

ii) La estructura de RMN²⁸ tiene la H49 silvestre pero carece de los primeros 47 residuos del extremo amino terminal. En esta estructura se observaron los dos residuos E81 (figura 26).

El análisis de la sección anterior no se pudo realizar fácilmente con la estructura de RMN de la IP, sin embargo, se realizó

una comparación entre ambas estructuras considerando únicamente su región dimerizante. Con este fin se utilizó el programa SOCKET¹⁰⁶, el cual determina la distribución de las posiciones a y d de las heptadas con base en la estructura. Mientras la estructura cristalográfica tiene tres y media heptadas desde el residuo 49 hasta el 81 (figura 26), la estructura de RMN perdió cuatro de las interacciones del residuo L63 (figura 26), esta estructura también perdió dos interacciones del residuo I67, quedando únicamente con dos heptadas.

Esto podría sugerir un impacto de la posición 49 en la estabilidad de la interfase de la IP, es decir que tanto la carga como el tamaño del residuo que ocupe esta posición será muy importante en la estabilidad del dímero de IP.

A

```

                                49           63  67
      GAFGKREQAEEERYFRARAKEQLAALKKHKENEISHHAKIEIERLQKEIERHKQSIKCLKQSED
register      defgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefga
knobtype     -----4---4---4---4---4---4---4---2-
```

```

                                49           63  67
      AFGKREQAEEERYFRARAKEQLAALKKHKENEISHHAKIEIERLQKEIERHKQSIKCLK
register      defgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcd
knobtype     -----4---4---4---4---4---4---4---2-
```

B



C

```

                                49           63  67
      HHENEISHHAKIEIERLQKEIERHKQSIKCLKQSED
register      defgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefga
knobtype     -----4---4---4-----2---4---4---4-----
```

```

                                49           63  67
      HHENEISHHAKIEIERLQKEIERHKQSIKCLKQSED
register      defgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefga
knobtype     -----4---4---4-----2---4---4---4-----
```

D



Figura 26. Análisis de las héptadas de las estructuras de RMN (PDB ID 1HF9) y cristalográfica (PDB ID 1GMJ) de la IP.

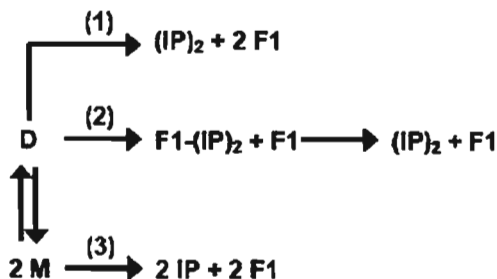
En A) y C) se muestran las secuencias de las estructuras 1GMJ²⁶ y 1HF9²⁸, respectivamente. En la parte superior se indican algunos residuos importantes. Con letras minúsculas se indican las posiciones de las héptadas, los números indican la cantidad de interacciones (por residuo) con la cadena polipeptídica opuesta.

Discusión

Interconversión dímero-monómero y activación del complejo F₁-IP endógeno.

Existen al menos dos formas del complejo F₁-IP endógeno de *B. taurus*: una dimérica y otra monomérica. Los resultados experimentales (ver Resultados I) muestran que ambas formas son interconvertibles y funcionales; esto contrasta con las propiedades del complejo F₁-IP reconstituido, el cual es solamente dímérico y de difícil activación^{107,108}.

Las incubaciones para activar los complejos F₁-IP en función de la concentración de proteína (figura 21) indican que al incrementar la proporción de dímero de F₁-IP disminuye la velocidad de la activación; la estabilidad del dímero a 4° C en presencia de sal (Tabla 3) indican que la transformación del dímero en el monómero de F₁-IP no es directamente responsable de la activación, esto es, no se libera la IP al monomerizar al F₁-IP dímérico. En el esquema 1 se presentan tres posibilidades de la interconversión del dímero y el monómero así como de la activación.



Esquema 1. Posibles vías de interconversión dímero-monómero y su activación.

Solo el paso de dímero a monómero (y viceversa) es reversible. D representa al dímero de F₁-IP endógeno, M al monómero, F₁ al complejo F₁ activo, F₁-(IP)₂ es una F₁ con un dímero de IP unido, IP es la proteína inhibidora endógena en forma monomérica y (IP)₂ es la forma dímérica.

En todos las vías, el dímero y el monómero de F₁-IP están en equilibrio. Si el dímero fuera la forma oligomérica capaz de activarse, dando origen a dos F₁ activas, la activación seguiría la vía (1). En esta vía, al aumentar la concentración de proteína, se debería incrementar la velocidad de activación porque la formación de monómero coincidiría directamente con la aparición de la actividad. Esto es opuesto a lo que se observa en la figura 20 (Activación a varias concentraciones de proteína). Además, en esta vía no podría existir un monómero de F₁-IP (i.e. una F₁ inhibida por una IP). Esto no ocurre así pues la incubación a 4° C de los dímeros de F₁-IP produce monómeros de F₁-IP (Tabla 3).

En la vía (2) el dímero se activaría dando origen a una F₁ activa y a una F₁ con un dímero de IP unida. En este esquema la velocidad de activación aumentaría al incrementar la concentración (experimentalmente se observa lo contrario, figura 20) de proteína pero la aparición del monómero sería dos veces más rápida que la de la actividad. Esto quiere decir que al agotarse la forma dimérica del F₁-IP solamente se debería alcanzar el 50% de la actividad máxima. El 50% restante estaría en forma de F₁ con un dímero de IP unido.

El vía (3), coincide con las observaciones de la acumulación del monómero de F₁-IP durante la incubación para la activación (figura 20), la incubación a 4 °C en presencia de sal (Tabla 3) y la disminución de la velocidad de activación a altas concentraciones de proteína (figura 20).

El F_1 -IP en la forma monomérica es la que es capaz de activarse, liberando un F_1 y una IP.

Los complejos F_1 -IP diméricos y monoméricos obtenidos en este trabajo son originales debido a que contienen tanto a la subunidad **OSCP** como a la IP¹⁰⁹ (figura 13) mientras que los complejos F_1 -IP reconstituidos parecen carecer de **OSCP**⁹⁷.

Reinterpretación de la Estructura de la IP a Nivel Atómico.

A partir de la estructura del complejo F_1 -IP reconstituido se pueden hacer las siguientes observaciones que son compatibles con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo:

1.- El cambio de la intensidad de fluorescencia del único triptofano que se observa en el dímero de F_1 -IP puede explicarse con la estructura del complejo reconstituido. Esto sugiere que ambos complejos diméricos son muy semejantes estructuralmente, excepto que el dímero endógeno sabemos contiene **OSCP**, mientras que el reconstituido parece carecer de dicha subunidad⁹⁷.

2.- La interfase $\alpha\beta\gamma_{DP}$ donde interactúa la IP con el complejo F_1 es diferente de la misma interfase en su ausencia. Esto puede significar dos cosas: La primera es que la conformación donde se une la IP es transitoria y la segunda es que se requiera de un cambio conformacional significativo para formarse. Ambas opciones son compatibles con el requerimiento de los varios ciclos de hidrólisis de ATP para que se lleve a cabo la inhibición.

3.- La región mínima inhibitoria formada por los residuos 14-47⁸⁸ es consistente con la estructura de la IP^{26,28} y del complejo F_1 -IP reconstituido²⁷. En ésta última, la bisagra formada por los residuos KKHHNEN esta en una región importante, fuera de la interfase con la F_1 y de la región dimerizante de la IP.

Las bisagras son un elemento común en las enzimas y su función es la de mediar grandes cambios conformacionales^{71,110-114}. La bisagra que describimos para la IP es novedosa; ya que mediaría cambios conformacionales de gran amplitud (debido al tamaño y la forma de la IP) en función del pH. La histidina 49 de la IP es un residuo único, ya que cambia de neutro a cargado en valores de pH cercanos a 7.0²⁸. Nuestros resultados teóricos enfatizan la importancia de este residuo como sensor del pH para la IP de mamíferos. Esta distinción es relevante, dado que la IP de *S. cerevisiae* es incapaz de dimerizar y podría indicar una divergencia evolutiva más profunda de los mecanismos de oligomerización y regulación. Esta bisagra es también un nuevo dominio funcional de la IP, y sugerimos que para ser un buen regulador fisiológico requiere de sus tres regiones: la inhibitoria del extremo amino terminal, la dimerizante (ó de anclaje) del extremo carboxilo terminal y la bisagra, mediando la respuesta al cambio en el pH.

Papel de la dimerización mediada por IP en la regulación del complejo F_1F_0 .

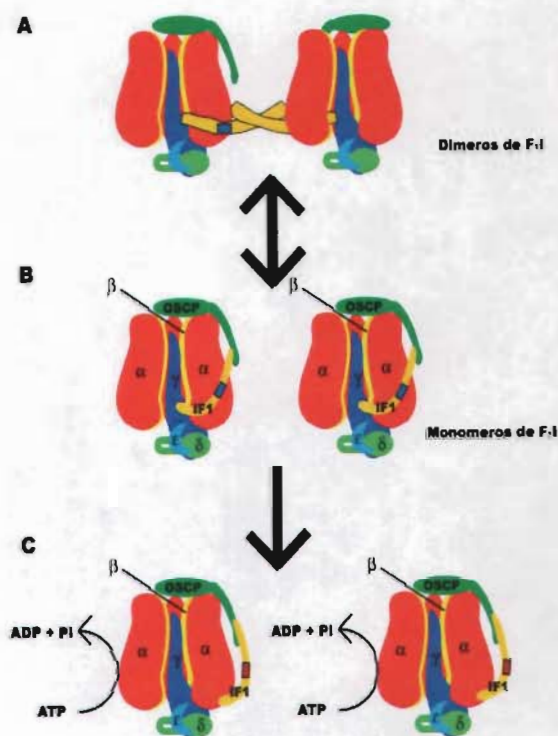
Nuestros resultados muestran que en la forma soluble del F_1 -IP endógeno la oligomerización parece no

tener un impacto importante sobre la activación, ya que ambas formas oligoméricas se activan prácticamente a la misma velocidad. Esto es debido a que la interconversión entre dímero y monómero ocurre más rápido que la activación, sin embargo, la concentración de proteína en la membrana interna mitocondrial es elevada y su difusión limitada al plano de la misma membrana. En esa situación, el dímero de F_1 -IP podría ser la forma predominante y dado que la IP es sensible a los dos componentes de la fuerza protonmotriz, en la mitocondria podría mediar la activación del complejo así como su estado oligomérico en función del estado energético del organelo.

La literatura reciente de la interacción de la IP con el segmento F_1 ha señalado la interacción del extremo amino terminal de la IP con la interfase $\alpha\beta_{DPY}^{27,30}$, así como la interacción de su extremo carboxilo terminal con la subunidad $OSCP^{56,115}$. Es a la luz de la estructura atómica de la F_1 -IP reconstituida, de los datos antes mencionados y de nuestra descripción de la bisagra de la IP, que la activación sin liberación de la IP se puede explicar (esquema 2):

La proteína inhibidora puede dimerizar al complejo F_1 cuando su extremo carboxilo terminal está libre, esta interacción es sensible a cambios en la fuerza iónica (i.e. la concentración de sal), apuntando a su naturaleza electrostática. La interacción homodimérica de la IP compite con la interacción IP- $OSCP$. La interacción IP- $OSCP$ monomeriza el complejo F_1 -IP, estableciendo el equilibrio dímero-monómero. Una vez formado el monómero, la bisagra monitorea los cambios de pH mediante la H49. A pH alcalino, la bisagra remueve a la IP del

sitio inhibitorio sin disociarla de la $OSCP$. En esta forma de la enzima, capaz de hidrolizar ATP, la IP está unida al complejo mediante su extremo carboxilo terminal y su región inhibitoria está libre sin interactuar con el segmento F_1 .



Esquema 2. Esquema de las posibles interacciones del complejo F_1 -IP endógeno.

En (A) se muestran dos F_1 unidas por dos IP. En (B) se muestra el monómero de F_1 -IP endógeno donde el extremo carboxilo terminal de la IP está interactuando con $OSCP$. La bisagra de la IP con la histidina 49 en su forma neutra se indica en azul. Dímero y monómero de F_1 -IP están en un equilibrio. A pH alcalino (C) las histidinas se protonan (bisagra en rojo) y la IP deja su sitio inhibitorio sin disociarse del complejo F_1 - $OSCP$.

Conclusiones.

El complejo F_1 -IP endógeno *in vitro* existe en su forma soluble en un equilibrio entre dos formas que dependen de la IP, a saber, un dímero y un monómero de F_1 -IP. Ambas formas se encuentran en un equilibrio de interconversión más rápido que la activación, el que involucra es desplazamiento de la región inhibitoria de la IP.

En esta forma soluble de la enzima, el efecto de la oligomerización en la activación es discreto, esto podría ser diferente en la enzima asociada a la membrana; sin embargo, la oligomerización introdujo un nuevo paso de regulación ya que el dímero debe monomerizarse para poderse activar.

La IP presenta una bisagra que contiene el residuo 49, sensor del pH, y divide su estructura en dos dominios dinámicos: el extremo amino inhibitorio y el extremo carboxilo dimerizante o de anclaje. Esta bisagra permite explicar dos aspectos de la interacción de la IP con el complejo F_1 : primero permite explicar los fenómenos la regulación de la proteína inhibidora sin invocar la existencia de una forma tetramérica soluble de la IP⁶⁶, y segundo, la liberación la IP que permite la hidrólisis de ATP sin que ésta proteína se disocie del complejo F_1F_o .

Perspectivas.

El complejo F_1 -IP endógeno se obtiene con su **OSCP** asociada, si el esquema 2 es correcto, la ausencia de **OSCP** es la razón por la que el complejo F_1 -IP reconstituido es incapaz de monomerizarse y activarse. Para demostrar esto es necesario estudiar si la adición de la **OSCP** al complejo F_1 -IP reconstituido lo hace idéntico al endógeno, es decir, activable y formando dímeros y monómeros.

Por otra parte, determinar la estructura cristalográfica del complejo F_1 -IP endógeno en ambas formas oligoméricas confirmaría el esquema 2 y aportaría la estructura de **OSCP** y su interacción con la IP.

Genéticamente hablando, la ATP sintasa de mitocondria de *B. taurus* es un sistema aún inaccesible. Por ello, es difícil mostrar que la IP es importante en la dimerización del complejo en la mitocondria. Se requieren nuevas metodologías que hagan accesibles al estudio las formas oligoméricas que ocurren durante los diferentes estados energéticos de la mitocondria.

Métodos



Obtención de mitocondrias de corazón bovino.

En el cuarto frío (a 4° C) se limpió el corazón de tejido conectivo, grasa y coágulos de sangre; se cortó el músculo en tiras. Se molió la carne. Generalmente se obtuvo entre 400 a 600 g de carne de un corazón de tamaño regular.

Se adicionaron 4 litros de *amortiguador A* por cada kg de carne molida y se ajustó el pH a 7.4 con Tris saturado. Este paso se realizó burbujeando nitrógeno a las muestras. Se licuó a máxima velocidad durante 90 segundos y se ajustó nuevamente el pH a 7.4 con Tris saturado. Se colocó el licuado en botellas de centrifuga de 500 ml de capacidad y se centrifugó a 1100 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante rojo se decantó a través de una malla de gasa triple colocada en un vaso de 5 litros. El precipitado se desechó. El filtrado se centrifugó a 16000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido son las mitocondrias, las cuales se resuspendieron en 500 ml del *amortiguador B* por cada kg de carne molida. Se recentrifugó la suspensión a 600 x g a 4 °C. Se descartó el precipitado blanco rojizo que contiene miosina. El sobrenadante se recentrifugó a 16000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante.

En la pastilla se encuentran las mitocondrias. Es recomendable resuspenderlas y mantenerlas muy concentradas (50 a 70 mg/ml). Antes de almacenarlas a -70° C, se determinó proteína por método de Biuret con alícuotas de 20 µl y en presencia de desoxicolato de sodio 0.33 % (w/v).

En estas condiciones las mitocondrias permanecieron por lo menos 6 meses sin perder sus propiedades.

Precauciones: El procedimiento mecánico para obtener mitocondrias de tejido debe ser tan suave como sea posible para preservar la integridad de la mitocondria y su grado de acoplamiento.

Amortiguador A:

Sacarosa	250 mM
Tris	5 mM
EDTA	15 mM
pH 7.4	

Amortiguador B:

Sacarosa	250 mM
Tris	5 mM
pH 7.4	

Obtención de partículas submitocondriales de MgATP.

Las mitocondrias se resuspendieron a 20 mg/ml en *Medio I*. El pH de la suspensión se ajustó a un intervalo de 6.9 a 7.1 con KOH saturado. Antes de la sonicación, a las mitocondrias se les agregó el ATP al *Medio I* y se sonicaron inmediatamente durante 45 segundos, en lotes de 15 ml.

Después de la sonicación, se centrifugó la suspensión a 22000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se guardó el sobrenadante (SN1), y los paquetes se resuspendieron en la mitad del volumen original en *Medio I*. El proceso se repitió para obtener el SN2.

Se juntaron los SN1 y el SN2 y se centrifugaron a 200000 x g por 45 minutos a 4 °C.

El paquete obtenido de esta centrifugación se lavó con un volumen equivalente de sacarosa 250 mM. Se centrifugó a 200000 x g por 45 minutos a 4 °C.

El paquete se resuspendió a 10 mg/ml en *Medio II* y se centrifugó a 200000 x g por 30 minutos, tras lo cual se guardó el paquete de partículas submitocondriales MgATP (MgATP SMP) a -75°C .

Medio I:

Sacarosa	250 mM
ATP	6 mM
Acetato de Mg	6 mM

Medio II:

Sacarosa	250 mM
MES-Tris	10 mM
KCl	100 mM

pH 6.8

Preparación de F_1 -IP.

El paquete de SMP-MgATP se resuspendió a 10 mg/ml en 25 ml de sacarosa 250 mM y se sonicó por 30 minutos manteniendo la temperatura en un intervalo de 10-15 $^{\circ}\text{C}$. Al sonicado se le añadió MES-Tris pH 6.8 a una concentración final de 10 mM y ADP a concentración final de 200 μM . Se centrifugó a 200000 x g por 30 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se guardó el sobrenadante (SN1). El paquete se resuspendió en 20 ml de sacarosa 250 mM. Ésta suspensión se sonicó 15 minutos manteniendo la temperatura en un intervalo de 10-15 $^{\circ}\text{C}$. Al sonicado se le añadió MES-Tris pH 6.8 a una concentración final de 10 mM y ADP a concentración final de 200 μM y se centrifugó a 200000 x g por 30 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se guardó el sobrenadante (SN2). Se juntaron los sobrenadantes SN1 y SN2 y se centrifugaron 60 minutos a 200000 x g. El sobrenadante (aproximadamente 30 ml) se aplicó a una columna de Sepharosa-hexil amonio (columna de afinidad, CA) equilibrada previamente con 40 ml de

Medio III, se lavó con 100 ml de *Medio III* y se eluyó con *Medio III* más 500 mM KCl. El eluato se recolectó en tubos en hielo, aproximadamente 3 ml por tubo. Posteriormente se determinó proteína de cada fracción con el método de Bradford. Se leyó a 595 nm, en cubeta de plástico de 1 ml.

Se seleccionaron y juntaron las fracciones que contenían proteína.

Se agitó la mezcla de las fracciones que contenían proteína en un baño a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se les añadió sulfato de amonio sólido hasta una saturación del 50%. Se dejó en agitación 30 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. La suspensión se centrifugó por 30 minutos a 34000 x g a 4 $^{\circ}\text{C}$ y el paquete resultante se resuspendió en 200 μl de *Medio III*. Ésta última resuspensión se centrifugó en tubos eppendorf por cinco minutos. El sobrenadante puede almacenarse a -70°C o procesarse en el FPLC.

La columna de FPLC que se utilizó para purificar fue la Superdex 200 (Pharmacia), con un límite de exclusión de 1×10^6 . La columna se equilibró con dos volúmenes (50 ml) del *Medio para FPLC* a pH 6.5. El flujo de la elución fue de 0.5 mL/min. Se colectaron en fracciones de 0.5 ml. Posteriormente se concentró por ultrafiltración (millipore, corte de exclusión de 10000 MWCO) a aproximadamente 10 mg/ml¹⁰⁹.

Medio III:

Sacarosa	250 mM
MES	10 mM
pH 6.8	
ADP	200 μM

Medio para FPLC

PMSF	0.001% (w/v)
NaH ₂ PO ₄	50 mM
pH 6.5	

Medio para HPLC

Tris-SO ₄	50 mM
Glicerol	10% (v/v)
Azida de sodio	0.02 mM
MgSO ₄	10 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0.001 % (w/v)
pH 6.5	

Los experimentos que utilizaron CEM en FPLC se realizaron con la columna Superdex 200 (Pharmacia). Los que utilizaron SEC en HPLC se realizaron con la columna SEC 4000 (Spheromex) se utilizó el *medio para HPLC*.

Calibración de la Cromatografía de Exclusión Molecular.

Para la obtención de los pesos moleculares aparentes mediante cromatografía de exclusión molecular se utilizaron los estándares de filtración de Bio-Rad, que contienen:

Tiroglobulina, de 670,000
γ- globulina, de 158,000
ovalbumina, de 44,000
Mioglobina, de 17,000
Vitamina B ₁₂ , de 1,300

El regráfico de calibración (figura 10 inserto) involucra el logaritmo (log) del peso molecular y el K_{av} . Este último

término se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

Donde V_e , V_0 y V_t son el volumen de elución de la proteína, el volumen vacío, y el volumen total, respectivamente.

Purificación de F₁.

SMP-Tris para F₁

Las mitocondrias se diluyeron a 30 mg/ml en Tris/HCl 10 mM, pH 7.4 y Sacarosa 250 mM (aproximadamente 100 ml). Esta suspensión se sonicó en lotes de 50 ml por 4 minutos a 30 °C. El sonicado se centrifugó 20 minutos a 34000 x g. Se guardó el SN1. Se resuspendió la pastilla en 50 ml de sacarosa 250 mM, Tris 10 mM pH 7.4. Se sonicó 4 minutos a 30 °C. El sonicado se centrifugó 20 minutos a 34000 x g. El sobrenadante obtenido (SN2) se juntó con el SN1 y se centrifugaron a 200000 x g por 45 minutos. La pastilla se resuspendió en 80 ml de sacarosa 250 mM, Tris 10 mM pH 7.4. Se sonicó 1 minuto en lotes de 20 ml. El sobrenadante se centrifugó a 200000 x g por 45 minutos.

La pastilla, que contiene las partículas submitocondriales, se guardó a -70°C.

Preparación de F₁.

Las SMP-Tris se resuspendieron a 30 mg/ml en 25 ml de *medio de ATP*.

Se ajustó el pH a 9.2 con NH₄-OH y se incubó toda la noche a temperatura ambiente, con agitación. Se reajustó el

pH a 9.2 con $\text{NH}_4\text{-OH}$. Se sonicó la suspensión 16 minutos a 30 °C. Se centrifugó a 200000 x g por 45 minutos a 25 °C y se guardó el sobrenadante, SN1. Se resuspendió la pastilla en 15 ml de medio de ATP y se ajustó el pH a 9.2 con $\text{NH}_4\text{-OH}$. La suspensión se sonicó 8 minutos a 30° C y después se centrifugó a 200000 x g por 45 minutos a 25 °C. Se juntó este sobrenadante con el SN1. Se les ajustó el pH a 5.4 con ácido acético 1 N y se centrifugaron rápidamente a 34000 x g por 1 minuto. Se reajustó el pH a 8.0 con Tris concentrado inmediatamente tras la centrifugación.

El sobrenadante obtenido se cargó a una columna de Sepharosa-hexil amonio (1.7 x 5 cm) preequilibrada con 40 ml de *medio de ATP*. Se lavó con 100 ml de *medio de ATP*, y se eluyó con medio de ATP más KCl 1 M. Durante la elución se colectaron fracciones de 3 ml. Se determinó actividad de ATPasa de cada fracción y se reunieron las fracciones con actividad. Éstas fracciones se precipitaron con un volumen de sulfato de amonio saturado, pH 7.4. La precipitación se incubó en hielo 45 minutos.

Tras esta incubación, se centrifugó la suspensión a 34000 x g 20 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió 200 µl de medio de ATP y se centrifugó 15 minutos a 3000 r.p.m. en una centrífuga clínica. El sobrenadante se precipitó con 1 volumen igual de sulfato de amonio saturado.

Este precipitado se almacenó en baño de hielo en el refrigerador. Para eliminar la sal, una alícuota se centrifuga a 1400 x g por 15 minutos. La pastilla se resuspende en *medio de ATP* (entre 25 y 100 µl) y carga en una columna de Penefsky (aproximadamente 1 ml de Sephadex G-50 fina). Se centrifuga 1 minuto a 3000 r.p.m. El eluato se usó para determinar la

concentración de proteína y su actividad de hidrólisis de ATP.

Medio de ATP:

Sacarosa	0.1 M
ATP	4 mM
EDTA	2 mM
pH 8.0	

Activación de Partículas Submitocondriales con KCl.

Las partículas submitocondriales MgATP se resuspendieron a una concentración de 1 mg/ml, en medio Sacarosa 250 mM, Tris- SO_4 20 mM, pH 8.0 y 100 mM de KCl. Para evaluar la actividad de ATPasa las partículas submitocondriales se incubaron en un baño con agitación a 40° C y se tomaron a alícuotas a diferentes tiempos. La actividad de hidrólisis se calculó a partir del cambio de absorbencia del NADH a 340 nm.

Medio de ATPasa-SMP

Sacarosa	250 mM
Tris-Acetato	50 mM
pH 7.4	
Mg-Acetato	3 mM
K-Acetato	30 mM
ATP	3 mM
PEP	1.5 mM
NADH	100 µM
PK	3 U
DHL	3 U
Rotenona	1 µg/ml (Nota: este es un inhibidor del Complejo I de la cadena respiratoria.)
FCCP	3 µM (Nota: este es un ionóforo.)

Activación de F₁-IP.

Una alícuota de enzima (dímero de F₁-IP, monómero de F₁-IP ó F₁) diluyó a la concentración de proteína requerida en *Medio de Activación*.

Medio de Activación:

ATP	10 mM
Tris-SO ₄	50 mM
EDTA	2 mM
KCl	100 mM
H ₂ O	
pH 8.0	

Medio de Actividad:

MgSO ₄	3 mM
Tris-SO ₄	25 mM
KSO ₄	30 mM
pH 8.0	

ATP	3 mM
PEP	1.5 mM
NADH	100 µM
PK	3 U
LDH	3 U

El NADH se preparó fresco para cada experimento además de que se agregó a la cubeta justo antes de empezar el trazo.

Tras determinar el tiempo cero, el *medio de activación* y la enzima se incubaron a 40 °C (con agitación) y se tomaron muestras a los tiempos requeridos. Cada alícuota se diluyó en el *medio de actividad* y se leyó en el espectrofotómetro a 340 nm. En caso de ser necesario, se diluyó una alícuota de la enzima incubada en Tris-SO₄ 50 mM antes de determinar actividad.

Nota: Cuando se requirió cuantificar la activación en función del pH, se sustituyó

el Tris-SO₄ 50 mM por Bis-Tris 25 mM y Tris-SO₄ 25 mM en el medio de activación. Cuando la activación se siguió con CEM, se utilizó el amortiguador de Tris-SO₄ 50 mM, pH 8.0, durante la activación. Durante la cromatografía se utilizó el mismo amortiguador que en la purificación de F₁-IP (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6.5 PMSF 0.001 %).

Determinación de proteína por BCA.

Para la determinación de la concentración de proteína por este método se realizó una curva de concentración estándar, utilizando una solución de proteína de concentración conocida y calibrada por absorbencia a 280 nm. Se utilizó Albúmina de Suero Bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/ml. Se determinó la absorbencia de este estándar para 5 concentraciones diferentes de proteína (ej. 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml), de una regresión lineal se interpoló la concentración de la muestra problema. Se tomó un volumen de la muestra o el estándar y se llevó a 50 µl con H₂O. A este volumen se le agregó 1 ml de una mezcla 1:50 de los reactivos A y B, respectivamente, del kit^{116,117}. Después de esta adición se incubó a 30 °C durante media hora, o a temperatura ambiente por dos horas. Finalmente, la absorbencia se cuantificó a 562 nm.

Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se utilizó la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN 3 de Bio-Rad. Se preparó el gel separador y con ayuda de una pipeta Pasteur, se

vertió la mezcla dentro de la cámara llenando 3/4 partes de ella. Con cuidado, se agregó una capa de etanol a la superficie del gel para asegurar su gelificado horizontal. Se recomienda dejar gelificando toda la noche, a 4 °C.

Una vez gelificado el separador, se removió el etanol y se colocó el peine con los carriles deseados sobre la cámara. El gel concentrador se vertió en la cámara con una pipeta Pasteur hasta que se alcanzó el borde de la cámara, procurando no dejar burbujas. Una vez gelificado, se retiró el peine y se montó la cámara de corrida. La cámara interna se llenó de *amortiguador superior* y la externa de *amortiguador inferior*, procurando cubrir el filamento de platino.

Las muestras se prepararon mezclando 1:1 la muestra de proteína (concentración de entre 5 µg a 25 µg) y la *mezcla de carga*. Cada muestra se vertió en un carril con ayuda de una jeringa Hamilton, enjuagada previamente tres veces en la *mezcla de carga*.

Mezcla Acrilamida-bis:

49.5% T, 3% C

Acrilamida 6.75 M
-bis 97.2 mM

Amortiguador del gel:

Tris 3 M
HCl 8.28 % (w/v)
SDS 0.3%

Amortiguador inferior, ánodo:

Tris/HCl 1.98 M
pH 8.4

Amortiguador superior, cátodo:

Tris 1 M
Tricina 100 mM
SDS 1 %
pH 8.25

Para proteínas de pesos moleculares entre 90,000 y 15,000:

	16.5 % (separador)	4% T (concentrador)
Mezcla	2 ml	0.32 ml
Archilamida-Bis		
Amortiguador	2 ml	0.992 ml
Glicerol (w/v0.9 ml 80%)		-
Agua	1 ml	2.655 ml
PSA	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Para proteínas de pesos moleculares entre 60,000 y 5,000:

	20 % T (separador)	4% T (concentrador)
Mezcla	2.4 ml	0.32 ml
Archilamida-Bis		
Amortiguador	2 ml	0.992 ml
Glicerol (w/v0.9 ml 80%)		-
Agua	0.6 ml	2.655 ml
PSA	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Este protocolo se basa en el método de von-Jagow¹¹⁸.

Mezcla de carga (para gel desnaturalizante):

H₂O 3.0 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.0 ml
Glicerol 1.6 ml
SDS 10% 1.6 ml
2-mercaptoetanol 0.4 ml
0.5 % Azul de bromofenol 0.4 ml
Urea 30% (w/v)

Esta mezcla de carga no debe hervirse.

Tinción con Azul de Coomassie de proteínas en SDS-PAGE.

Para teñir las proteína en geles desnaturalizantes se utilizó la siguiente solución:

Serva Blue G	0.2 % (w/v)
Ácido Acético	10 % (v/v)
Etanol	50 % (v/v)

Una incubación de una hora en esta solución es suficiente. Para desteñir se usó la siguiente solución:

Etanol	40 % (v/v)
Ácido Acético	10 % (v/v)

Dos incubaciones de 1 hora cada una fueron suficientes para desteñir un gel.

Tinción por plata de proteínas en SDS-PAGE.

Se incubó el gel en *solución fijadora* por 10 minutos. Después se lavó dos veces con agua destilada, cada lavado de 5 minutos. Se pretrató con *solución de pretratamiento* por 1 minuto. Se enjuagó dos veces con agua destilada. Se incubó por 15 minutos en *solución de plata*. Se enjuagó con agua destilada y con *solución de pretratamiento*. Se bañó en *solución reveladora* y, cuando se alcanzó la tinción requerida se detuvo reacción con ácido cítrico 2.3 M.

Solución fijadora:

MeOH	40 %
Formaldehído	5 %

Solución de pretratamiento:

Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	0.02 %
--	--------

Solución de plata (1 litro):

AgNO ₃	0.1 %
-------------------	-------

Solución reveladora (1 litro):

Na ₂ CO ₃	3 %
Formalina	0.05 % (se agrega fresca).
Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	0.0004 %

Determinación de proteína con Biuret.

El reactivo de Biuret ¹¹⁹ se preparó disolviendo 1.5 g de CuSO₄ · 5H₂O más 6 g de tartrato de sodio-potasio en 500 ml de H₂O hervida por al menos 20 minutos. Se le añadieron 300 ml de NaOH al 10% preparado también con H₂O hervida. Se aforó a un litro.

La calibración del estándar de albúmina (BSA) se realizó a 280 nm (UV, usando cubetas de cuarzo) tomando 10 µl de la solución de albúmina. Se utilizó el valor de ε=0.557 para 1g/l. Se leyó primero el blanco carente de proteína y luego la albúmina, a la lectura de esta última se le restó la del blanco y se utilizó ε para conocer la concentración de proteína.

Se agregó primero un volumen de la muestra (entre 25 y 100 µl).

Se agregaron 0.2 ml de DOC 1%

Se aforó a 0.8 ml con H₂O

Se agregó Biuret 2.0 ml, al mismo tiempo para todos los tubos.

Como estándar se utiliza BSA de 10 mg/ml, se lee a 540 nm después de 20 o 30 minutos.

Cuantificación de Dicroísmo Circular en el UV lejano.

Los barridos de longitud de onda se realizaron desde 185 nm a 260 nm en un espectropolarímetro Jasco J-715, y cada trazo representa tres colecciones de datos consecutivas de la misma muestra. Durante los espectros, la temperatura se mantuvo a 20 °C. La muestra se diluyó a 1 mg/ml en amortiguador de NaH₂PO₄ 20 mM a pH 6.5. Para los cálculos de elipticidad molar y $\Delta\epsilon$ de los complejos enzimáticos, se utilizaron los siguientes parámetros:

Subunidad α 510 aminoácidos (total de 1530 α).

Subunidad β 480 aminoácidos (total de 1440, por tres β)

Subunidad γ 273 aminoácidos.

Subunidad OSCP aminoácidos.

Subunidad δ 146 aminoácidos.

Subunidad ϵ 50 aminoácidos.

IP 84 aminoácidos.

Por lo tanto:

F₁-IP monomérica 3523 aminoácidos.

F₁-IP dimerica 7046 aminoácidos.

Fórmulas:

$$[\Theta] = \frac{\Theta * 100 * Mr}{c * l}$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta * 100 * MRW}{c * l}$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta * 100 * Mr}{c * l * N_a}$$

y

$$\Delta\epsilon = \frac{[\Theta]}{3300}$$

Cuantificación de la Fluorescencia intrínseca.

Se usó el ISS Photon Counting Spectrofluorometer con lámpara ajustada a 18 Amperes. La temperatura fue mantenida a 20 °C con un baño de agua. La apertura para la excitación (bandwidth) fue de 0.5 nm y la de emisión fue 1.0 nm. Cuando se excitó a 280 nm, los espectros se tomaron en un intervalo de 290 a 400 nm; cuando se excitó a 295 nm, los espectros se tomaron de 310 a 410 nm.

La muestra se diluyó a 1 mg/ml en amortiguador de NaH₂PO₄ 20 mM a pH 6.5.

Deconvolución de los cromatogramas.

La deconvolución de los datos cromatográficos se realizó con el programa PeakFit (Jandel). En este programa se utiliza la ecuación:

$$y = (a_0 / \sqrt{2\pi a_2}) \exp(-1/2(x - a_1 / a_2)^2)$$

donde y es la absorbencia, a_0 es el área de la curva gaussiana, a_1 el centro de la curva gaussiana, a_2 el ancho y x es el volumen de elución. Esta ecuación permitió el ajuste iterativo de curvas gaussianas. Para la estimación de los contenidos de dímero y monómero, se asumió que el área total del cromatograma corresponde al 100% de la muestra. El área resultante de la deconvolución se utilizó para calcular el porcentaje de cada fracción.

Determinación de Dominios Dinámicos utilizando el programa “DynDom”.

Para este análisis se usó el programa DynDom v1.5^{103,104}. El código fuente, programado en Fortran, se distribuye en la página <http://www.cmp.uea.ac.uk/dyndom/dyndomMain.do> sin costo pero bajo una licencia restrictiva de distribución e ingeniería reversa. Se compiló en Mac OS X 10.3, y se ejecutó en interfase de texto. También se puede obtener como parte del suite CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, <http://www.ccp4.ac.uk/main.html>).

Al programa se proporcionaron dos archivos de estructura a comparar (los PDBs con extensión .pdb o .ent) así como un script donde se definió la ventana de residuos, el mínimo tamaño de dominio y una proporción mínima de desplazamiento externo vs. interno. Los valores por defecto de estos parámetros son 5, 20 y 1.0 respectivamente (ver Apéndice I, poner el script). Estos valores también son utilizados en la versión en-línea del programa, así como su base de datos no-redundante (<http://www.cmp.uea.ac.uk/dyndom/nrdbDescription.do>). Sólo para el análisis del péptido de la IP residuos 36-61 se utilizó un tamaño mínimo de dominio de 9.

Uso del servidor de Análisis de Modos Normales (NMA) “elNémo”.

elNémo¹⁰⁵ es una interfase en-línea de un *Modelo de Redes Elásticas*^{120,121}. Este modelo es una herramienta rápida y simple para la determinación de los modos normales de baja frecuencia de las proteínas. Se puede acceder en la dirección: [\[server.cnrs-mrs.fr/elnemo/index.html\]\(http://server.cnrs-mrs.fr/elnemo/index.html\). El servidor trabaja con una estructura base \(un PDB con extensión .pdb o .ent, por ejemplo\). Por defecto, el servidor calcula 5 modos normales de baja frecuencia, con base en el intervalo de perturbaciones de \$DQMIN = -100\$ a \$DQMAX = 100\$, con un tamaño de paso \$DQSTEP = 20\$. El programa calcula un coeficiente de correlación entre los factores B observados y los predichos por el NMA, este coeficiente debe ser mayor a 0.6 para ser significativo. También proporciona un archivo de PDB por cada modo normal calculado. Estos se visualizaron como animaciones dentro de la misma página de resultados ó mediante el programa VMD¹²².](http://igs-</p></div><div data-bbox=)

Uso del servidor de determinación de Knobs-into-Holes “SOCKET”.

El programa SOCKET¹⁰⁶ (<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/research/woolfson/html/coiledcoils/socket/server.html>) determina el empaquetamiento de las hélices enrolladas en base a la estructura atómica. Al servidor se le proporcionó una estructura base (un PDB con extensión .pdb o .ent). Por defecto, el servidor asignó un corte de empaquetamiento de 7.0 Å, una extensión de hélice de 0 residuos. El programa calculó y entregó tres tipos de datos: un texto que muestra la secuencia junto con la correspondencia de las heptadas, un script para Rasmol¹²³ que despliega la misma información y un archivo del proceso.

El código C de este programa está disponible, pero en este trabajo se usó la versión en línea.

Dinámicas Moleculares utilizando el programa “GROMACS”.

El programa GROMACS¹²⁴ es una suite para realizar Dinámicas Moleculares basadas en ecuaciones newtonianas. Se distribuye bajo la licencia GNU GPL en la página <http://www.gromacs.org/>. La hélice correspondiente a los residuos 36-61 de la IP fue solvatada en una caja rectangular de 6 x 4 x 3 nm, con 3130 moléculas de agua (SPC, single point charge) y dos cloros (Cl-) para neutralizar el sistema que constó de un total de 9681 átomos. Se realizó una minimización de energía de 100 pasos previa a una dinámica de posiciones restringidas de 20 picosegundos. Durante la dinámica de posiciones restringidas, el péptido 36-61 se mantuvo restringido armónicamente a su posición cristalográfica con una fuerza constante de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$. Esto permite la relajación de las moléculas de agua. La temperatura se mantuvo a 300 K mediante un acoplamiento débil a un termostato de Berendsen¹²⁵ (con tiempo de acoplamiento de 0.1 ps). La presión se mantuvo constantemente a 1 bar mediante un relajamiento exponencial acoplado al tiempo (tiempo de acoplamiento de 0.5 ps).

En la dinámica molecular libre, la proteína, el agua y los cloros se acoplaron al un termostato de Berendsen independientemente, con las mismas temperatura y presión que la dinámica de posiciones restringidas. El campo de fuerza utilizado fue el GROMOS96 43a1. El tiempo de integración fue de 2 fs, tanto el corte de distancias de interacciones electrostáticas como de VdW fue de 1.0 nm. Las interacciones electrostáticas se trataron mediante el método de Fast Particle-Mesh Ewald (PME) en un espacio de Fourier de 1.5 nm.

La dinámica molecular libre utilizó 108 horas en un doble procesador G5 de 2 Ghz con 2.5 Gbs de RAM.

Los análisis de Dinámica Esencial (ED) se realizaron con los ajustes por defecto de GROMACS.

Referencias.

1. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961;191:144-148.
2. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J* 2002;21(7):1616-1627.
3. Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. An Inhibitor of the F1 Subunit of ATP Synthase (IF1) Modulates the Activity of Angiostatin on the Endothelial Cell Surface. *J Biol Chem* 2005;280(3):1740-1745.
4. Cortes-Hernandez P, Dominguez-Ramirez L, Estrada-Bernal A, Montes-Sanchez DG, Zentella-Dehesa A, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A, Garcia JJ. The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(3):844-849.
5. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(6):2811-2816.
6. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Terce F, Collet X, Perret B, Barbaras R. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003;421(6918):75-79.
7. Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 2003;546(2-3):355-358.
8. Brdiczka D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* 1991;1071(3):291-312.
9. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 1997;119(3):260-272.
10. Allen RD. Membrane Tubulation and Proton Pumps. *Protoplasma* 1995;189(1-2):1-8.
11. Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J* 1998;17(24):7170-7178.
12. Paumard P, Vaillier J, Coulyar B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J* 2002;21(3):221-230.
13. Krause F, Reifschneider NH, Goto S, Dencher NA. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329(2):583-590.
14. Chen C, Ko YH, Delannoy M, Ludtke SJ, Chiu W, Pedersen PL. Mitochondrial ATP synthasome three dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 2004.
15. Ko YH, Delannoy M, Hüllihen J, Chiu W, Pedersen PL. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 2003;278(14):12305-12309.
16. Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Biol* 2000;7(11):1055-1061.
17. Stock D, Leslie AG, Walker JE. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 1999;286(5445):1700-1705.
18. Collinson IR, Skehel JM, Fearnley IM, Runswick MJ, Walker JE. The F1F0-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the

- F1 and F0 domains. *Biochemistry* 1996;35(38):12640-12646.
19. Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *Embo J* 2003;22(23):6182-6192.
 20. Hisabori T, Konno H, Ichimura H, Strotmann H, Bald D. Molecular devices of chloroplast F(1)-ATP synthase for the regulation. *Biochim Biophys Acta* 2002;1555(1-3):140-146.
 21. Green DW, Grover GJ. The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1458(2-3):343-355.
 22. Pullman ME, Monroy GC. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem* 1963;238(11):3762-3769.
 23. de Gomez-Puyou MT, Dominguez-Ramirez L, Perez-Hernandez G, Gomez-Puyou A. Effect of denaturants on multisite and unisite ATP hydrolysis by bovine heart submitochondrial particles with and without inhibitor protein. *Arch Biochem Biophys* 2005;439(1):129-137.
 24. Di Pietro A, Penin F, Godinot C, Gautheron DC. "Hysteric" behavior and nucleotide binding sites of pig heart mitochondrial F1 adenosine 5'-triphosphatase. *Biochemistry* 1980;19(25):5671-5678.
 25. Fornells LA, Guimaraes-Motta H, Nehme JS, Martins OB, Silva JL. Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F1-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1998;349(2):304-312.
 26. Cabezon E, Runswick MJ, Leslie AGW, Walker JE. The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *Embo J* 2001;20(24):6990-6996.
 27. Cabezon E, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* 2003;10(9):744-750.
 28. Gordon-Smith DJ, Carbajo RJ, Yang JC, Videler H, Runswick MJ, Walker JE, Neuhaus D. Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF(1): the inhibitor protein of F(1) ATPase. *J Mol Biol* 2001;308(2):325-339.
 29. Tanabe M, Nishio K, Iko Y, Sambongi Y, Iwamoto-Kihara A, Wada Y, Futai M. Rotation of a complex of the gamma subunit and c ring of *Escherichia coli* ATP synthase. The rotor and stator are interchangeable. *J Biol Chem* 2001;276(18):15269-15274.
 30. Minauro-Sanmiguel F, Bravo C, Garcia JJ. Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34(6):433-443.
 31. Boyer PD. Energy transduction and proton translocation by adenosine triphosphatases. *FEBS Lett* 1975;50(2):91-94.
 32. Boyer PD. Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis. *Biochemistry-Moscow* 2001;66(10):1058-1066.
 33. Boyer PD. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Letters* 2002;512(1-3):29-32.
 34. Weber J, Senior AE. Bi-site catalysis in F-1-ATPase: Does it exist? *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(38):35422-35428.
 35. Karrasch S, Walker JE. Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol* 1999;290(2):379-384.
 36. Power J, Cross RL, Harris DA. Interaction of F1-ATPase, from ox heart mitochondria with its naturally occurring inhibitor protein. Studies using radio-iodinated inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* 1983;724(1):128-141.
 37. Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT, Ernster L. Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1979;547(2):252-257.
 38. Corvest V, Sigalat C, Venard R, Falson P, Mueller DM, Haraux F. The binding mechanism of the yeast F1-ATPase inhibitory peptide: role of catalytic intermediates and enzyme turnover. *J Biol Chem* 2005;280(11):9927-9936.
 39. van Raaij MJ, Abrahams JP, Leslie AG, Walker JE. The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(14):6913-6917.

40. Abrahams JP, Buchanan SK, Van Raaij MJ, Fearnley IM, Leslie AG, Walker JE. The structure of bovine F1-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9420-9424.
41. Orriss GL, Leslie AG, Braig K, Walker JE. Bovine F1-ATPase covalently inhibited with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: the structure provides further support for a rotary catalytic mechanism. *Structure* 1998;6(7):831-837.
42. Groth G. Structure of spinach chloroplast F1-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3464-3468.
43. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K, Jr. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 1997;386(6622):299-302.
44. Rondelez Y, Tresset G, Nakashima T, Kato-Yamada Y, Fujita H, Takeuchi S, Noji H. Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature* 2005;433(7027):773-777.
45. Kaim G, Prummer M, Sick B, Zumofen G, Renn A, Wild UP, Dimroth P. Coupled rotation within single F0F1 enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis. *FEBS Letters* 2002;525(1-3):156-163.
46. Meier T, Polzer P, Diederichs K, Welte W, Dimroth P. Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* 2005;308(5722):659-662.
47. Singh S, Turina P, Bustamante CJ, Keller DJ, Capaldi R. Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase in aqueous buffer. *FEBS Lett* 1996;397(1):30-34.
48. Fillingame RH, Angevine CM, Dmitriev OY. Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *FEBS Lett* 2003;555(1):29-34.
49. Fillingame RH, Dmitriev OY. Structural model of the transmembrane F_o rotary sector of H⁺-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking in situ. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565(2):232-245.
50. von Ballmoos C, Appoldt Y, Brunner J, Granier T, Vasella A, Dimroth P. Membrane topography of the coupling ion binding site in Na⁺-translocating F1F0 ATP synthase. *J Biol Chem* 2002;277(5):3504-3510.
51. Dimroth P. Operation of the F(0) motor of the ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1458(2-3):374-386.
52. Fillingame RH, Girvin ME, Jiang W, Valiyaveetil F, Hermolin J. Subunit interactions coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F1F0 ATP synthase. *Acta Physiol Scand Suppl* 1998;643:163-168.
53. Girvin ME, Rastogi VK, Abildgaard F, Markley JL, Fillingame RH. Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F1F0 ATP synthase. *Biochemistry* 1998;37(25):8817-8824.
54. Greie JC, Deckers-Hebestreit G, Altendorf K. Subunit organization of the stator part of the F₀ complex from *Escherichia coli* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32(4):357-364.
55. Rexroth S, Meyer Zu Tittingdorf JM, Schwassmann HJ, Krause F, Seelert H, Dencher NA. Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 2004;1658(3):202-211.
56. Zanotti F, Raho G, Gaballo A, Papa S. Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36(5):447-457.
57. Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994;370(6491):621-628.
58. Boyer PD. A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. *FEBS Lett* 1975;58(1):1-6.
59. Dittrich M, Hayashi S, Schulten K. ATP hydrolysis in the betaTP and betaDP catalytic sites of F1-ATPase. *Biophys J* 2004;87(5):2954-2967.
60. Menz RI, Walker JE, Leslie AG. Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the

- mechanism of rotary catalysis. *Cell* 2001;106(3):331-341.
61. Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. The net energetic contribution of interhelical electrostatic attractions to coiled-coil stability. *Protein Eng* 1994;7(11):1365-1372.
 62. Cohen C, Parry DA. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* 1990;7(1):1-15.
 63. Zhu H, Celinski SA, Scholtz JM, Hu JC. The contribution of buried polar groups to the conformational stability of the GCN4 coiled coil. *J Mol Biol* 2000;300(5):1377-1387.
 64. Henrick K, Thornton JM. PQS: a protein quaternary structure file server. *Trends Biochem Sci* 1998;23(9):358-361.
 65. **Dominguez-Ramirez L, Mendoza-Hernandez G, Carabez-Trejo A, Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT. Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F1-inhibitor protein complexes. *FEBS Letters* 2001;507(2):191-194.**
 66. Cabezon E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem* 2000;275(33):25460-25464.
 67. Bockmann RA, Grubmuller H. Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F1-ATP synthase. *Nat Struct Biol* 2002;9(3):198-202.
 68. Bockmann RA, Grubmuller H. Conformational dynamics of the F1-ATPase beta-subunit: a molecular dynamics study. *Biophys J* 2003;85(3):1482-1491.
 69. Perez-Hernandez G, Garcia-Hernandez E, Zubillaga RA, de Gomez-Puyou MT. Structural energetics of MgADP binding to the isolated beta subunit of F1-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3*. *Arch Biochem Biophys* 2002;408(2):177-183.
 70. Dittrich M, Hayashi S, Schulten K. On the mechanism of ATP hydrolysis in F1-ATPase. *Biophys J* 2003;85(4):2253-2266.
 71. Ma J, Flynn TC, Cui Q, Leslie AG, Walker JE, Karplus M. A dynamic analysis of the rotation mechanism for conformational change in F(1)-ATPase. *Structure (Camb)* 2002;10(7):921-931.
 72. Cui Q, Li G, Ma J, Karplus M. A normal mode analysis of structural plasticity in the biomolecular motor F(1)-ATPase. *J Mol Biol* 2004;340(2):345-372.
 73. Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinoshita K, Jr., Itoh H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature* 2001;410(6831):898-904.
 74. Klein G, Satre M, Dianoux AC, Vignais PV. Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14C)isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* 1980;19(13):2919-2925.
 75. Wong SY, Galante YM, Hatefi Y. Equilibrium binding of 125I-labeled adenosinetriphosphatase inhibitor protein to complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Biochemistry* 1982;21(23):5781-5787.
 76. Jackson PJ, Harris DA. Binding of mitochondrial ATPase from ox heart to its naturally occurring inhibitor protein: localization by antibody binding. *Biosci Rep* 1983;3(10):921-926.
 77. Dominguez Ramirez JL. Purificación y caracterización del complejo F1I endógeno y del complejo F1I entrecruzado con EEDQ (N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina) [Licenciatura]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2000. 85 p.
 78. Vazquez-Laslop N, Dreyfus G. The native mitochondrial F1-inhibitor protein complex carries out uni- and multisite ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 1990;265(31):19002-19006.
 79. Harris DA, Husain I, Jackson PJ, Lunsdorf H, Schafer G, Tiedge H. Interaction between the soluble F1 ATPase and its naturally occurring inhibitor protein. Studies using hydrophilic high-performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. *Eur J Biochem* 1986;157(1):181-186.
 80. Nowak KF, McCarty RE. Regulatory role of the C-terminus of the epsilon

- subunit from the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry* 2004;43(11):3273-3279.
81. Konno H, Suzuki T, Bald D, Yoshida M, Hisabori T. Significance of the epsilon subunit in the thiol modulation of chloroplast ATP synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(1):17-24.
 82. Hisabori T, Ueoka-Nakanishi H, Konno H, Koyama F. Molecular evolution of the modulator of chloroplast ATP synthase: origin of the conformational change dependent regulation. *FEBS Lett* 2003;545(1):71-75.
 83. Bulygin VV, Duncan TM, Cross RL. Rotor/Stator interactions of the epsilon subunit in *Escherichia coli* ATP synthase and implications for enzyme regulation. *J Biol Chem* 2004;279(34):35616-35621.
 84. Suzuki T, Murakami T, Iino R, Suzuki J, Ono S, Shirakihara Y, Yoshida M. F₀F₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *J Biol Chem* 2003;278(47):46840-46846.
 85. Vik SB. What Is the Role of epsilon in the *Escherichia coli* ATP Synthase? *J Bioenerg Biomembr* 2000;32(5):485-491.
 86. Rodgers AJ, Wilce MC. Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nat Struct Biol* 2000;7(11):1051-1054.
 87. Jackson PJ, Harris DA. The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F₁ beta-subunit. *FEBS Lett* 1988;229(1):224-228.
 88. van Raaij MJ, Orriss GL, Montgomery MG, Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM, Walker JE. The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* 1996;35(49):15618-15625.
 89. Ichikawa N, Ogura C. Overexpression, purification, and characterization of human and bovine mitochondrial ATPase inhibitors: comparison of the properties of mammalian and yeast ATPase inhibitors. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35(5):399-407.
 90. Sah JF, Kumar C, Mohanty P. pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194(3):1521-1528.
 91. Panchenko MV, Vinogradov AD. Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett* 1985;184(2):226-230.
 92. Ichikawa N, Karaki A, Kawabata M, Ushida S, Mizushima M, Hashimoto T. The region from phenylalanine-17 to phenylalanine-28 of a yeast mitochondrial ATPase inhibitor is essential for its ATPase inhibitory activity. *J Biochem-Tokyo* 2001;130(5):687-693.
 93. Schnizer R, Van Heeke G, Amatore D, Schuster SM. Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* 1996;1292(2):241-248.
 94. Harris DA, von Tscharn V, Radda GK. The ATPase inhibitor protein in oxidative phosphorylation. The rate-limiting factor to phosphorylation in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* 1979;548(1):72-84.
 95. Beltran C, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A, Darszon A. Release of the inhibitory action of the natural ATPase inhibitor protein on the mitochondrial ATPase. *Eur J Biochem* 1984;144(1):151-157.
 96. Schwerzmann K, Pedersen PL. Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch Biochem Biophys* 1986;250(1):1-18.
 97. Cabezon E, Arechaga I, Jonathan P, Butler G, Walker JE. Dimerization of bovine F₁-ATPase by binding the inhibitor protein, IF₁. *J Biol Chem* 2000;275(37):28353-28355.
 98. Feinstein DL, Moudrianakis EN. Response of the adenosine triphosphatase activity of the soluble latent F₁ enzyme from beef heart mitochondria to changes in Mg²⁺ and H⁺ concentrations. *J Biol Chem* 1984;259(7):4230-4236.
 99. SaadNehme J, Bezerra AL, Fornells LAM, Silva JL, MeyerFernandes JR. A contribution of the mitochondrial

- adenosinetriphosphatase inhibitor protein to the thermal stability of the F₀F₁-ATPase complex. *Z Naturforsch C* 1997;52(7-8):459-465.
100. Gomez Puyou A, Tuena de Gomez Puyou M, de Meis L. Synthesis of ATP by soluble mitochondrial F₁ ATPase and F₁-inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur J Biochem* 1986;159(1):133-140.
101. Bohm G, Muhr R, Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 1992;5(3):191-195.
102. Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 2001;11(2):82-88.
103. Lee RA, Razaz M, Hayward S. The DynDom database of protein domain motions. *Bioinformatics* 2003;19(10):1290-1291.
104. Hayward S, Lee RA. Improvements in the analysis of domain motions in proteins from conformational change: DynDom version 1.50. *J Mol Graph Model* 2002;21(3):181-183.
105. Suhre K, Sanejouand YH. ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Web Server issue):W610-614.
106. Walshaw J, Woolfson DN. Socket: a program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures. *J Mol Biol* 2001;307(5):1427-1450.
107. Valdes AM, Dreyfus G. Structural and functional differences in H⁺-ATPases with native and reconstituted inhibitor protein. *Biochem Int* 1987;15(2):459-466.
108. Galante YM, Wong SY, Hatefi Y. Mitochondrial adenosinetriphosphatase inhibitor protein: reversible interaction with complex V (ATP synthetase complex). *Biochemistry* 1981;20(9):2671-2678.
109. **Dominguez-Ramirez L, Garza-Ramos G, Najera H, Mendoza-Hernandez G, Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT. Interconversion between dimers and monomers of endogenous mitochondrial F₁-inhibitor protein complexes and the release of the inhibitor protein. Spectroscopic characteristics of the complexes. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36(6):503-513.**
110. Masaïke T, Mitome N, Noji H, Muneyuki E, Yasuda R, Kinoshita K, Yoshida M. Rotation of F(1)-ATPase and the hinge residues of the beta subunit. *J Exp Biol* 2000;203(Pt 1):1-8.
111. Kursula I, Salin M, Sun J, Norledge BV, Haapalainen AM, Sampson NS, Wierenga RK. Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng Des Sel* 2004;17(4):375-382.
112. Arnold GE, Ornstein RL. Protein hinge bending as seen in molecular dynamics simulations of native and M61 mutant T4 lysozymes. *Biopolymers* 1997;41(5):533-544.
113. Sinha N, Tsa CJ, Nussinov R. Building blocks, hinge-bending motions and protein topology. *J Biomol Struct Dyn* 2001;19(3):369-380.
114. Dobson CM. Protein conformation. Hinge-bending and folding. *Nature* 1990;348(6298):198-199.
115. Papa S, Zanotti F, Gaballo A. The structural and functional connection between the catalytic and proton translocating sectors of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2000;32(4):401-411.
116. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 1989;180(1):136-139.
117. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.
118. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987;166(2):368-379.
119. Levin R, Brauer RW. The biuret reaction for the determination of proteins; an improved reagent and its

-
- application. *J Lab Clin Med* 1951;38(3):474-480.
120. Valadie H, Lacapre JJ, Sanejouand YH, Etchebest C. Dynamical properties of the MscL of *Escherichia coli*: a normal mode analysis. *J Mol Biol* 2003;332(3):657-674.
121. Tama F, Gadea FX, Marques O, Sanejouand YH. Building-block approach for determining low-frequency normal modes of macromolecules. *Proteins* 2000;41(1):1-7.
122. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996;14(1):33-38, 27-38.
123. Sayle RA, Milner-White EJ. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* 1995;20(9):374.
124. Berendsen HJC, van der Spoel, D., van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Comm* 1995;91:43-56.
125. Golo VL, Shaitan KV. [Dynamic attractor for the Berendsen thermostat an the slow dynamics of biomacromolecules]. *Biofizika* 2002;47(4):611-617.
126. Cox DLNaMM. *Lehninger Principles of Biochemistry.*: Worth Publishers; 2000.

Nota: Las referencias en negritas son publicaciones originadas de este trabajo.

APENDICE I: Script para el DynDom.

La siguiente es una muestra del script que usa el DynDom en su versión 1.5 compilada localmente. Las líneas que comienzan con un símbolo # son comentarios que pueden ir dentro del script los cuales el programa ignora. El resto son parámetros indispensables para el programa.

```
#
# ESTE ES UN EJEMPLO DEL SCRIPT DE COMANDOS PARA EL ANALISIS
# DEL CAMBIO CONFORMACIONAL DE LOS MONOMEROS DE LA IP
# A PARTIR DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRAFICA CUYO CODIGO DE
# PDB ES 1GMJ
#
# DEFINICION DEL TITULO (REQUERIDO PARA NOMBRAR LOS ARCHIVOS DE SALIDA)
#
title=IP-A/D
#
# NOMBRE DE ARCHIVO DE LA PRIMERA CADENA POLIPEPTIDICA
#
filename1=1GMJ.pdb
#
# CODIGO DE LETRA PARA LA PRIMERA CADENA, EN CASO DE QUE NO SE HAYA
#DEFINIDO DEJAR EN BLANCO
#
chain1id=A
#
# NOMBRE DE ARCHIVO DE LA SEGUNDA CADENA POLIPEPTIDICA, PUEDE SER EL
# MISMO QUE EL DE LA PRIMERA CADENA
#
filename2=1GMJ.pdb
#
# CODIGO DE LETRA PARA LA SEGUNDA CADENA
#
chain2id=B
#
# TAMAÑO DE VENTANA EN NUMERO DE RESIDUOS (POR DEFECTO 5 RESIDUOS)
#
window=5
#
# TAMAÑO DE DOMINIO MINIMO EN MUNERO DE RESIDUOS (POR DEFECTO 20
#RESIDUOS)
#
domain=20
#
# PROPORCION MINIMA ENTRE EL DESPLAZAMIENTO EXTERNO E INTERNO (POR
# DEFECTO 1.0)
#
ratio=1.0
```

APENDICE II: ¿ATP sintasa o ATP sintetasa?:

Las enzimas llamadas **sintasas** son aquellas que catalizan reacciones de condensación en las que no se requiere ningún nucleosido trifosfatado como fuente de energía. Por el contrario, las enzimas que requieren del ATP u otro nucleosido trifosfatado para llevar a cabo la condensación se les llama **sintetasas**. Un ejemplo de este tipo de enzima es la succinil-CoA sintetasa. A las sintetetasas también se les conoce como **ligasas**¹²⁶.