



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Localización del epítipo del anticuerpo monoclonal RAC#25A-5E2D7
en la estructura primaria de la proteína inhibidora de la ATP sintasa
mitocondrial.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

Edgar Morales Ríos

Director de Tesis: Dr. José de Jesús García Trejo

México, D. F.

Septiembre de 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen	4
2. Introducción	6
2.1 Estructura y función de la ATP sintasa mitocondrial	6
2.2 La proteína inhibidora	10
2.2.1 Función y estructura de la proteína inhibidora	11
2.3 Localización en la F_0F_1 ATP sintasa	14
2.3.1 Uso de anticuerpos en el estudio de la proteína inhibidora de la ATP sintasa	15
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4. Material y métodos.	17
4.1 Análisis de secuencias por medio del software Peptide Cutter	17
4.2 Purificación de la IF_1 recombinante de corazón de bovino.	17
4.3 Proteólisis limitada de la proteína inhibidora (IF_1 , F_1) y partículas submitocondriales Mg-ATP) con tripsina, quimotripsina, proteinasa K y subtilisina.	18
4.4 SDS-PAGE de von Jagow.	18
4.5 SDS-PAGE de Laemmli.	21
4.6 Inmunodetección por medio de la transferencia de los fragmentos de IF_1 a membranas de PVDF en presencia de amortiguador CAPS.	23

4.7 Aislamiento de mitocondrias de corazón de bovino.	25
4.8 Obtención de partículas submitocondriales Mg-ATP.	26
4.9 Purificación de la F ₁ de mitocondrias de corazón de bovino	27
4.10 Activación de la F ₁ mitocondrial	27
5. Resultados	28
5.1 Predicción de cortes de proteasas para la IF ₁ mitocondrial de corazón de bovino	28
5.2 Purificación de la IF ₁ recombinante	30
5.3 Proteólisis limitada.	31
5.4 Inmunodetección de los productos de la hidrólisis de la IF ₁	34
5.5 Secuenciación de los fragmentos reconocidos por el anticuerpo	38
5.6 Proteólisis de la IF ₁ en el complejo F ₁ -I y en partículas submitocondriales Mg-ATP	40
6. Discusión	44
7. Conclusiones	47
8. Literatura citada	48

1. RESUMEN

La F_1F_0 -ATPasa funciona como un motor rotacional reversible que consume energía de un gradiente electroquímico de protones para sintetizar ATP. Cuando el gradiente se colapsa, la enzima cambia su actividad catalítica de ATP sintasa a ATPasa. En células eucariontes esta actividad es regulada por la proteína inhibidora (IF_1), la subunidad que unida a F_1F_0 , previene la hidrólisis. Para definir la orientación de la IF_1 unida al complejo F_1F_0 completo, se ha planteado el objetivo de definir si el epítipo accesible a un anticuerpo monoclonal anti- IF_1 se encuentra en la parte N-terminal, central o C-terminal de la proteína. Para esto realizamos proteólisis limitada con tripsina, quimiotripsina, subtilisina y proteinasa K para definir por medio de Western blot el fragmento más pequeño reconocido por el anticuerpo que pueda ser secuenciado posteriormente. A partir de proteólisis de IF_1 pura (mayor al 95%) todas las proteasas originaron péptidos de menor tamaño al de la IF_1 . Después de cursos temporales de proteólisis y la posterior inmuno-transferencia, encontramos que el péptido más pequeño reconocido por el anticuerpo fue originado por incubación con quimotipsina a los 20 minutos y después de secuenciar los diversos péptidos producidos por esta proteólisis obtuvimos que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal se encuentra dentro del fragmento $^{23}GKREQAEEERYF^{34}$. Al marcar este fragmento en experimentos *in silico* en la estructura del cristal del complejo F_1 -I, con el inhibidor reconstituido [35], se observa que el fragmento está parcialmente oculto a la acción de la proteasa. Esto se corroboró proteolizando al complejo F_1 purificado y al F_1F_0 en partículas submitocondriales nativos con el inhibidor unido o desprendido. Concluyendo la secuencia del fragmento que contiene el epítipo del anticuerpo que va del residuo 23 al 35 además de comprobar experimentalmente con

la IF₁ nativa que la posición de ésta proteína dentro de la F₁ es similar al encontrarse tanto en su forma nativa como reconstituida.

2. INTRODUCCIÓN

El complejo proceso de la producción de ATP, ocurrido durante la fosforilación oxidativa, requiere que se lleven a cabo cuatro eventos fundamentales:

1. Transporte de electrones,
2. generación de un gradiente de protones,
3. transporte de Pi y ADP; y
4. la síntesis de ATP.

El proceso de síntesis de ATP es catalizado por el complejo ATP sintasa [30], la cual funciona como un motor rotacional molecular reversible [23].

2.1 Estructura y función de la ATP sintasa mitocondrial.

La ATP sintasa mitocondrial, también llamada F_0F_1 -ATPasa, es una enzima ubicua que sintetiza la mayoría de ATP que la célula necesita para acoplar su hidrólisis a muchas reacciones endergónicas esenciales, así como para realizar cualquier tipo de trabajo químico, mecánico y osmótico. Esta síntesis de ATP ocurre en el último paso de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de animales, en membranas plasmáticas bacterianas y en las reacciones luminosas de la fotofosforilación en las membranas tilacoidales de los cloroplastos de plantas.

El complejo F_0F_1 -ATPasa puede ser separado experimentalmente en dos diferentes porciones o dominios (Fig. 1):

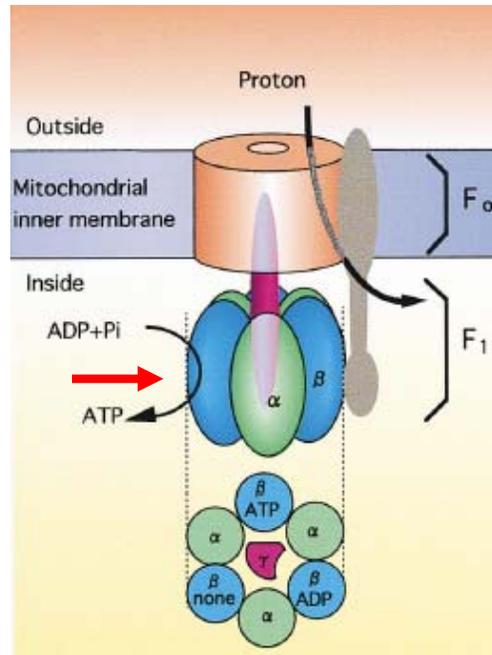


Figura 1. Estructura simplificada de la ATP-sintasa.

La F₁ consiste en α₃β₃γ (δ y ε no se muestran), la estructura más simple de F₀ (no mitocondrial) contiene a las subunidades ab₂C₉₋₁₂. La porción gris indica la posición sugerida de las subunidades δab₂ en el segundo cuello lateral del estator. La parte inferior muestra un corte transversal (flecha roja) visto desde la F₁.
Modificado de ref. 24

F₁-ATPasa.- Porción hidrosoluble que contiene los tres sitios catalíticos de la enzima. Puede ser desprendida de la membrana manteniendo únicamente su capacidad de hidrolizar ATP.

F₀.- Porción integral a la membrana, constituye el canal de protones.

En la tabla 1 se describe la composición de subunidades de la ATP sintasa en *Escherichia coli*, y en bovino [31].

Tabla 1. Composición de subunidades de las ATP sintasas mitocondriales en *E. coli* y bovino. Se tienen 8 y 16 subunidades en las enzimas *E. coli* y bovino, respectivamente. Se encuentran acomodadas con respecto a la similitud entre las subunidades; por ejemplo la subunidad homóloga de δ de *E. coli* en bovino, sería OSCP. Los pesos moleculares solo se muestran para la enzima de bovino.

	Subunidades <i>E. coli</i>	Subunidades Bovino	Peso molecular Bovino (kDa)		Subunidades <i>E. coli</i>	Subunidades Bovino	Peso molecular Bovino (kDa)
F₁	α^3	α^3	55	F₀	a^1	Sub. 6 ¹	25
	β^3	β^3	51		b^2	b^1	24
	γ^1	γ^1	30		c^{10-14}	c^{10-14}	8
	δ^1	OSCP ¹	21		-	d^1	19
	ε^1	δ^1	15		-	e^1	8
	-	ε^1	6		-	f^1	10
	-	IF ₁ ¹	10		-	g^1	11
					-	F6 ¹	9
				A6L ¹	8		

ⁿ.- Estequiometrías correspondientes.

Estudios biofísicos y bioquímicos muestran que el arreglo de las subunidades de la parte F₁ es un hetero-hexámero de las subunidades $\alpha_3\beta_3$ alternantes [31], una de las estructuras cristalográficas de la F₁ mitocondrial resolvió además el cuello formado por γ , δ y ε en donde γ penetra la cavidad central del hexámero $\alpha_3\beta_3$ para formar parte del rotor [15]. Por otra parte, la porción F₀ es el sector trans-membranal, que forma el canal de protones; y a su vez se compone de las subunidades 6, b, c₉₋₁₂, d, e, f, g, y A6L. Otra subunidad llamada OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein) conecta a un cuello periférico formado por la parte extra-membranal de la subunidad b con el extremo amino terminal del hexámero $\alpha_3\beta_3$ de la F₁ (ver figura 2). La función de la enzima depende de los cambios conformacionales y movimientos relativos de las subunidades del rotor que en el complejo F₀F₁ completo son γ , ε , δ y un anillo trans-membranal de 10 subunidades c [36], en el caso más sencillo. Este rotor gira impulsado por el flujo de protones, que en mitocondrias ocurre del espacio

intermembranal hacia la matriz mitocondrial. El anillo de subunidades c gira gracias a la protonación y desprotonación del ácido aspártico 61 en las subunidades c que al irse protonando secuencialmente de manera auxiliada por la arginina 210 de la subunidad a de F_0 , produce un movimiento rotatorio. La salida de los protones se da hacia la matriz mitocondrial por la otra parte de este canal de protones [25] mientras el anillo de subunidades c transmite el movimiento rotatorio a la subunidad γ . Esta última tiene una parte central que está en contacto secuencial con las subunidades β , las cuales cambian su conformación de manera alternada [11] a tres estados básicos en respuesta al giro de γ (fig.2).

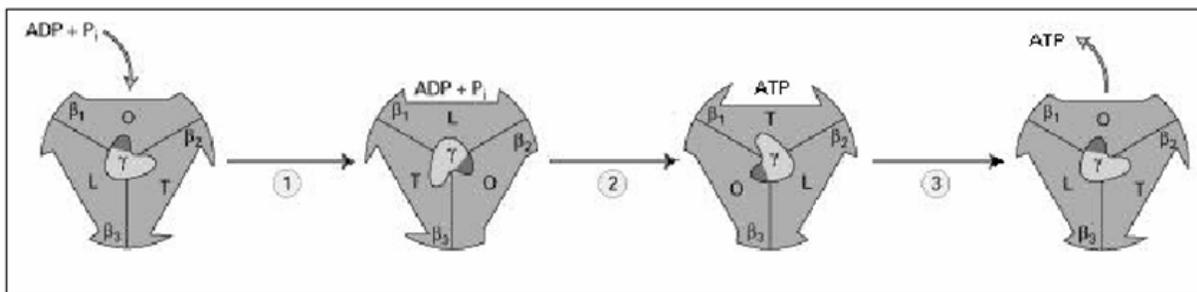


Figura 2. El mecanismo de unión alternante (The binding change mechanism). En la conformación "open" (O), la subunidad β_1 de F_1 esta vacía. En el paso (1) la subunidad γ rota 120° cambiando la conformación de β_1 a "loose" (L). En la conformación loose, a β_1 se le une ADP y Pi. En el paso (2) otra rotación de 120° de γ cambia la conformación de β_1 a "Tight" (T). En la conformación tight, el ADP y el Pi reaccionan para formar ATP. Otra rotación de 120° de γ en el paso (3) cambia la conformación de β_1 de nuevo a open, resultando en la liberación de la molécula de ATP recién sintetizada. Este mecanismo inicialmente propuesto por Boyer con base en reacciones de recambio [11] se corroboró con la estructura cristalográfica de la F_1 -ATPasa de bovino [15], y la demostración de la rotación de la subunidad γ [17, 33, 28].

La rotación de la enzima ocurre en el sentido de las manecillas del reloj, vista desde F_0 , para la síntesis y en el sentido contrario a las manecillas del reloj para la hidrólisis. Durante la catálisis, el rotor central gira respecto a un estator compuesto por las subunidades α y β de la F_1 , así como OSCP, b y la subunidad 6 que forman un tallo periférico que conecta a F_1 con F_0 (Fig.3).

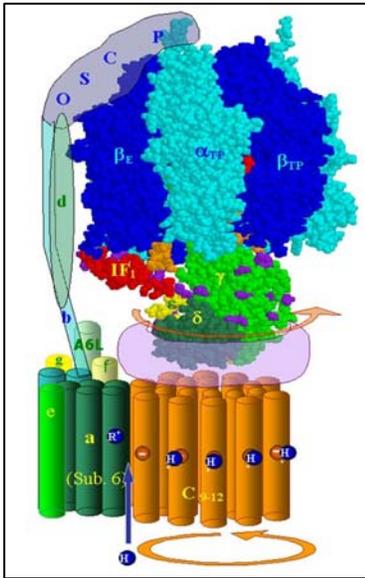


Figura 3. Estructura del motor F_0F_1 de acuerdo al modelo de la enzima. El “Estator” (subunidades 6, b, OSCP y d) mantiene fijos a los sitios catalíticos en las interfases α/β de la F_1 al unirlos a la subunidad 6 de F_0 a través del cuello periférico formado por las subunidades b y OSCP (δ en *E. coli*). El “Rotor” o tallo central (γ , δ y ϵ) es impulsado por el flujo de protones en la interfase c_{10-12}/a y este giro provoca los cambios conformacionales alternantes de las interfases catalíticas α/β para la síntesis y liberación de ATP al medio (detalles en texto). Se muestra también el fragmento N-terminal del inhibidor (IF_1) que en esta posición interferiría con la rotación del cuello central y por lo tanto con la síntesis de ATP. Los protones se transportan por la interfase a/c_{9-12} para impulsar el giro del rotor, y por lo tanto la síntesis de ATP en la F_1 , de acuerdo al sentido de la rotación indicada (ver texto). Modelo tomado de la ref. [31]

Los movimientos del rotor, o tallo central, son transmitidos al estator a través de cambios conformacionales que afectan la estructura de los sitios catalíticos que a su vez, alternan y cambian su afinidad por el sustrato y producto [31]. La síntesis de ATP es una reacción endergónica que requiere de 80-100pN nm de energía bajo condiciones fisiológicas [28].

2.2 La proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial.

Como se menciona en el apartado anterior, la F_0F_1 -ATPasa también funciona como un motor reversible. Cuando una célula es privada de oxígeno, como ocurre en la isquemia patológica o quirúrgica, el gradiente electroquímico se colapsa a lo largo de la membrana interna de la mitocondria y la enzima cambia su actividad catalítica, de ATP sintasa a ATPasa.

2.2.1 Función y estructura de la proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial.

En células eucariontes esta actividad está controlada por la proteína inhibidora (IF_1). En bovino, la IF_1 es una proteína compuesta por 84 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 10kDa [2]. Se trata de una subunidad que unida a F_0F_1 previene la hidrólisis de ATP, por lo que la forma biológica relevante es la que contiene a la IF_1 endógena, es decir el complejo F_0F_1I [16]. El efecto inhibitorio de la IF_1 en la F_0F_1 -ATPasa se ha demostrado fisiológicamente durante la isquemia cardiaca en varias especies de mamíferos, por lo tanto la IF_1 protege al miocardio isquémico al prevenir la disminución del ATP celular debida a la hidrólisis catalizada por el complejo F_0F_1 , como una regulación tejido-específica, la expresión de la IF_1 en relación a la ATP sintasa es mas alta en el corazón que en otros órganos [20]. La IF_1 se une a la parte F_1 con una estequiometría de 1:1 [4].

Se han caracterizado algunos homólogos de la IF_1 en mitocondrias de humano, bovino, rata, *Saccharomyces cerevisiae* y plantas; la secuencia primaria de estas proteínas esta bien conservada, particularmente en los residuos 14-47 (en la numeración de la secuencia de la IF_1 de bovino, figura 4). Van Raaij *et al.* en 1996 [22] concluyeron a partir de sus estudios con productos recombinantes de la IF_1 que la mínima secuencia inhibitoria consiste de los residuos 14-47. Por otra parte, un péptido con la secuencia Leu42-Lys58 en la numeración de la IF_1 de bovino, tiene la misma eficiencia, en cuanto a inhibición de la actividad de ATPasa, que la IF_1 completa, inhibiendo la actividad tanto del complejo F_1F_0 completo en membranas, como en la F_1 soluble [19]. La región C-terminal de la IF_1 (aproximadamente de los

residuos 39-84) forma una trenza de dos α -hélices que posiblemente lleven a la formación de dímeros u otros oligómeros fisiológicamente.



Figura 4. Secuencia de aminoácidos componentes de la IF₁ de mitocondrias de corazón de bovino. La caja continua indica la región mínima inhibitoria, residuos 14-47 [22]. La parte de la secuencia encerrada en cajas discontinuas muestra las regiones que parecen estar envueltas en la regulación de la proteína por pH (residuos 10-13 y 48-56). En la parte de debajo de la secuencia se muestran las letras a-g que se refieren a los motivos de la estructura de la α -hélice que se forma en la proteína, en este caso heptadas en donde el primer aminoácido (a) es en general hidrofóbico y que forman los sitios de contacto del dímero anti-paralelo de la IF₁.

La IF₁ de mitocondrias de corazón de bovino ha sido clonada y purificada. Su estructura ha sido estudiada en función del pH [14]. En un intervalo de 5.5-8.5 se ha observado que mientras el pH del medio se torna ácido decrece el contenido de α -hélice de la proteína inhibitoria. Tanto estudios en los que modifican químicamente las histidinas [9, 8] así como en los cuales se utiliza mutagénesis dirigida [21] y sustitución química de His48, 49, 55, 56 o de Lys46, 47, 58 en el péptido sintético 42-58 [22] muestran que esos residuos son directamente responsables de la actividad y dependencia al pH de la IF₁. También se tiene que se han realizado experimentos de mutagénesis dirigida mutando solo a la histidina 49 y sustituyéndola por K. Esta mutación anuló la sensibilidad al pH de la proteína, esto es, tanto a pH abajo de 6.7 como a pH arriba de 6.7 las IF₁ mutantes son capaces de inhibir a la F₁, mientras que la IF₁ silvestre es incapaz de inhibir a pH alcalino [18]. Esto es debido al estado de oligomerización de la IF₁; a pH 6.5 la proteína dimeriza formando una trenza de α -hélices antiparalela sobre su parte C-terminal dejando expuesta la mínima región

inhibitoria. Por otro lado, a pH 8.0 la IF₁ forma un tetrámero inactivo en el cual se cubren las regiones inhibitorias de los dímeros oligomerizados entre si, imposibilitando su acción sobre la F₁. La anulación de la sensibilidad al pH por la mutación de la H49 se explica ya que en estas mutantes se evita la formación de la trenza entre los residuos 32-43 previniendo la interacción entre dos diferentes dímeros. Esto produce que en el equilibrio predomina el estado dimérico, además de liberar la parte N-terminal inhibitoria, permitiéndole interactuar con la F₁ (Fig. 5). Algo similar ocurre con la IF₁ nativa, al descender el pH (6.5) la H49 se protona, entonces decrece la posibilidad de que se forme la estructura de trenza así que se pierde la capacidad de que dos dímeros interactúen [26].

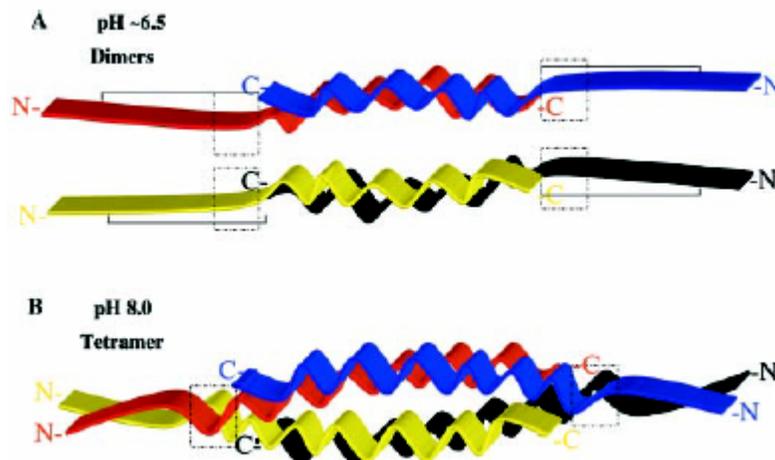


Figura 5. Modelo de la interconversión entre el estado dimérico activo y el tetramérico inactivo de la IF₁ regulado por pH. Las cuatro moléculas de las IF₁ están en color rojo, azul, amarillo y negro. (A) Dos dímeros separados cada uno compuesto de dos monómeros unidos formando una α-hélice coiled-coil antiparalela por la región C-terminal. Esto a pH 6.5. (B) A pH 8, dos dímeros asociados formando un tetrámero. La interacción entre dos dímeros involucra a los residuos entre ~35-47. Estos residuos están marcados con cajas discontinuas. A este pH, las regiones inhibitorias incluyendo los residuos 9-22 y 23-47, están cubiertos en el tetrámero.

Se ha demostrado que el estado dimérico de la IF₁ puede inducir la dimerización de la F₁ tanto en su forma reconstituida como endógena [27,29].

2.3 Localización de la IF₁ en la F₁F₀-ATPasa mitocondrial.

Existen algunos reportes acerca de la ubicación y modo de unión de la IF₁ a la F₁. La evidencia estructural muestra que la IF₁ entrecruza con las subunidades α y β [13]. Sin embargo, otros experimentos de entrecruzamiento y ensamblaje de la enzima muestran evidencia de una posible interacción con subunidades de F₀ [12]. Por lo tanto, hasta el momento no se conoce con claridad cuál es la posición exacta de la IF₁ en el complejo F₁F₀ completo.

A pesar de que se han demostrado diferencias importantes entre la IF₁ endógena y la reconstituida, la mayoría de los datos experimentales se han hecho con esta última. En nuestro laboratorio se ha estudiado la ubicación de la IF₁ tanto en el complejo F₁I soluble como en el complejo F₁F₀ intacto. Se ha encontrado que la IF₁ endógena puede entrecruzar a una distancia de 12Å con las subunidades γ y ϵ en el rotor de la enzima [32], esto aunado a los resultados que indican que la IF₁ entrecruza con la subunidad OSCP [37], nos hace proponer un nuevo modelo para el mecanismo de inhibición de la proteína inhibidora. Es decir, esto sugiere que la IF₁ interfiere con la rotación intrínseca de la enzima [31, 32]. De estos resultados, se ha propuesto un modelo estructural tomando como base las estructuras cristalográficas de la F₁ y la región N-terminal de la IF₁, la cual es la región inhibitoria de la molécula [22]. En este modelo se observa que la región N-terminal de la IF₁ se puede acomodar en una cavidad formada por las subunidades γ , ϵ , y una interfase α/β tanto en la estructura cristalográfica de la F₁, como en un modelo del complejo F₁F₀I (Fig.3).

2.3.1 Uso de anticuerpos en el estudio de la IF₁.

Varios anticuerpos dirigidos contra la proteína inhibidora han sido usados en estudios de caracterización inmunológica de la proteína inhibidora de mitocondrias de corazón de bovino, de hígado de rata y de levadura, mostrando que las IF₁ de levadura y bovino tienen gran similitud inmunológica entre sí a pesar de su diferencia en cuanto a secuencia [7].

Además, se usaron anticuerpos contra la IF₁ para determinar que la proteína co-purifica con el complejo F₁F₀ para su posterior reconstitución en liposomas [16]. Anticuerpos monoclonales añadidos al complejo F₁-IF₁ no disminuyen la inhibición inducida por la IF₁. Por el contrario, estos anticuerpos incrementan la actividad de ATPasa de la enzima en partículas invertidas sin inducir una liberación significativa de la IF₁ en esas partículas. Esto ha llevado a sugerir que la IF₁ puede tener una interacción con alguna proteína de la membrana interna de la mitocondria de un peso entre 5 y 6 kDa [12]. Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el anticuerpo anti-IF₁ que se usó para este trabajo no incrementa la actividad de ATPasa de la enzima, sugiriendo que se une a un epítipo diferente en comparación con los anticuerpos anteriores [Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. y García, J. Resultados no publicados].

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Localizar el epítotope del anticuerpo monoclonal RAC#25A-5E2D7 en la estructura primaria de la proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial.

3.2 Objetivos particulares

1. A partir de células de *Escherichia coli* de la cepa BL21, transformadas con los plásmidos respectivos, sobre-expresar y purificar a las proteína inhibidora (IF₁) recombinante de corazón de bovino.
2. Realizar predicciones de patrones de proteólisis limitada por medio del software de internet denominado PeptideCutter, lo cual determinará cuáles proteasas son las indicadas para usarse experimentalmente para generar fragmentos de tamaños funcionales.
3. Realizar experimentalmente una proteólisis limitada para generar péptidos de tamaño y secuencia definidos. Separar estos fragmentos por medio de electroforesis desnaturizante en geles de gradiente de alta concentración de acrilamida.
4. Realizar inmunotransferencias de los fragmentos separados en los geles anteriores para determinar cual de estos es reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-IF₁.
5. De ser necesario, generar fragmentos más pequeños por medio de la subsecuente degradación con otra o más proteasas, para generar subfragmentos más pequeños al reconocido inicialmente por el monoclonal anti-IF₁.
6. Confirmar la secuencia del péptido más pequeño reconocido por el monoclonal anti IF₁, por medio de degradación de Edman.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Análisis de secuencias por medio del software Peptide Cutter disponible en la página <http://us.expasy.org/tools/peptidecutter/> de internet para decidir que proteasas utilizar.

4.2 Purificación de la IF₁ recombinante de corazón de bovino [14, 34]. Con el siguiente protocolo se purificó a la IF₁ recombinante a partir de 1 litro de células de *Escherichia coli* a las cuales se les sobre-expresó el gen de la IF₁ de mitocondria de corazón de bovino concentradas en un pellet de 7.5g en promedio. Resuspender el pellet celular en 4 ml de amortiguador K₂HPO₄ 20mM, (pH6.5), PMSF 0.001% y 1mM EDTA, diluir el pellet y llevarlo a 40ml totales. Sonicar 10X (10 veces; 10 segundos y dejar enfriar el sonicador durante 2 minutos). Agregar MgCl₂ 10mM, 5mg de DNAsa por cada 10g de células y centrifugar a 14000rpm 4°C 15 minutos. Al sobrenadante y agregar EDTA 10mM, precipitar con [(NH₄)₂SO₄] a una concentración saturante de 50% e incubar 20 minutos a 4°C. Centrifugar a 14000rpm, 4°C, 15min. Al sobrenadante agregarle 35% de [(NH₄)₂SO₄], para llevarlo a una concentración final de 85%, incubar la suspensión 20 minutos y centrifugar a 14000rpm, 4°C, 15min. Tomar el pellet y resuspenderlo en 1ml de amortiguador 20mM fosfatos pH 8.0 y concentrarlo a 500µl en una membrana Millipore con un poro de 10Kda. Pasar el concentrado por una columna de Carboxi-Metil Sefarosa CL-6B de intercambio catiónico, preequilibrada con el amortiguador 20mM fosfatos pH 6.5. Lavar con 10 veces el volumen de la columna usando el mismo amortiguador. Eluir con un gradiente de pH 6.5-8.7 y al mismo tiempo de fosfatos 20mM-300mM (2 volúmenes de ambos). Medir actividad inhibitoria a todas las fracciones, y las que tengan actividad inhibitoria se desalan en columnas de

Penefsky, se les determina proteína y se realiza un SDS-PAGE de gradiente de 10-22% de acrilamida de acuerdo a Laemmli [3]. Las fracciones con un mayor grado de pureza se concentran nuevamente ahora a aproximadamente 600 μ l. La determinación de la actividad inhibitoria de la ATPasa se llevó a cabo según Klein *et al.* [4]

4.3 Proteólisis limitada de la proteína inhibidora IF_1 , F_1I y partículas submitocondriales Mg-ATP con tripsina, quimiotripsina, proteinasa K y subtilisina. Se preparan stocks de las proteasas con la concentración de 1mg/ml determinadas por coeficiente de extinción y se guardan a -70°C para evitar la auto-hidrólisis. Todas las proteólisis se realizaron en un amortiguador K_2HPO_4 100mM y EDTA 1mM (pH 6.5) agregando una relación proteasa/proteína de 1:100, incubando la mezcla a 25°C . La reacción se detuvo agregando PMSF 5mM a alícuotas tomadas a los diferentes tiempos.

4.4 SDS-PAGE von Jagow [10]. Esta técnica de SDS-PAGE (por su abreviatura en inglés, geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio) permite separar las proteínas en base a la carga que les confiere el dodecilsulfato de sodio (SDS) y de manera aproximada a su peso molecular. La resolución es alta para proteínas de entre 50 y 5kDa, pero baja arriba de 50kDa.

Para preparar este tipo de geles se montan dos cristales separados entre sí con unos separadores de 1mm de espesor procurando que, ya estando montados, no se presenten fugas al agregar alguna solución en el espacio que quedó entre ellos. Se prepara el gel separador y se vierte dentro de los cristales aproximadamente 5.3ml e inmediatamente se agrega una capa de H_2O muy lentamente para que no se mezcle

con la solución del gel, esto para asegurar una superficie horizontal del gel. El proceso de gelificado es de aproximadamente 40 minutos.

Una vez gelificado el separador, se remueve el agua y se coloca en la parte de arriba de entre los cristales un peine de 1mm de espesor con los carriles deseados. El gel concentrador se vierte entre los vidrios hasta que alcanza el borde de estos, procurando no dejar burbujas de aire.

Ya que polimerizó el concentrador, aproximadamente 30 minutos, se retira el peine y se monta la cámara de corrida. La parte interna de la cámara se llena con amortiguador para el cátodo y la externa con al amortiguador para el ánodo procurando cubrir el filamento de platino. Las muestras se preparan mezclándolas volumen a volumen (concentración de 0.8 μ g a 20 μ g para Western-blot y de 3 μ g a 25 μ g para teñir con Coomassie) y el amortiguador para la muestra. Cada muestra se agrega en los diferentes carriles procurando que no se salgan de estos hacia los carriles laterales.

-Acrilamida 30% (100ml)

Acrilamida 30gr

bis acrilamida 0.8gr

-Amortiguador para el gel (100ml)

Tris 36.34gr

HCl 8.28ml

SDS 0.3gr

-Amortiguador de ánodo (1 litro)

Tris/HCl 24.06gr

pH 8.4

-Amortiguador de cátodo (1 litro)

Tris 12.11gr

Tricina 17.93gr

SDS 1gr

pH 8.25

Tabla 2. Protocolo de preparación de SDS-PAGE von Jagow al 4% y 16%.

	Gel 16% (separador)	Gel 4% (concentrador)
Acilamida	3.2ml	0.533ml
Amortiguador	2ml	1ml
Glicerol 80%	0.8ml	-----
Agua	-----	2.466ml
Persulfato de amonio 10%	30µl	30µl
TEMED	3µl	3µl

-Amortiguador para la muestra

H ₂ O	3ml
Tris/HCl	1ml
Glicerol	1.6ml
SDS10%	1.6ml
Azul de bromofenol 0.5%	0.5ml

Una vez mezclados la muestra con el amortiguador para la muestra se incuban durante 5 minutos a 100°C antes de ser cargados en el gel. Este amortiguador sirve para dar mayor densidad a la muestra además de desnaturalizarla debido a la presencia de SDS y el seguimiento del frente de las muestras en la electroforesis por el azul de bromofenol.

Los geles preparados con esta técnica se corren a 80mV durante 30 minutos y luego a 95mV durante aproximadamente 2 o 2.5 horas.

4.5 SDS-PAGE Laemmli [3]. Los geles preparados con esta técnica poseen alta resolución para proteínas de entre 70 y 5kDa.

Para este tipo de geles se montan los cristales procurando que sellen y que no se presenten fugas. Se prepara el gel separador y se vierte dentro de los geles, que se encuentran separados entre sí por un separador de 1mm de espesor, aproximadamente 5.2ml del separador. Lentamente se agrega una capa de SDS 10% para asegurar un gelificado horizontal. Estos geles gelifican en alrededor de 30 minutos a 4°C. Una vez gelificado el separador se remueve el SDS enjuagando con H₂O destilada y se coloca en la parte superior, entre ambos vidrios, un peine de 1mm de espesor con la cantidad de carriles deseada (10 ó 15). El gel concentrador se agrega hasta que alcanza el borde de los cristales, procurando no dejar burbujas. Una vez gelificado, se retira el peine y se monta en la cámara de corrida. Ambas partes de la cámara se llenan con el amortiguador de corrida. Las muestras se preparan (una cantidad aproximada de entre 4µg y 25µg) mezclando volumen a volumen con el amortiguador para la muestra. Cada muestra se agrega a un carril diferente, procurando no se salga de uno y se pase al otro.

Tinción por azul de Coomassie para geles de poliacrilamida.

Inmediatamente después de sacar el gel de la electroforesis, se sumerge en la solución de azul de Coomassie y se deja en agitación por al menos una hora, aunque este tiempo puede incrementarse a varias horas para geles cargados con cantidades limitadas de proteína. Después de esto, para desteñir el fondo y dejar las bandas de proteína intactas, se agrega la solución desteñidora.

-Azul de Coomassie (1litro)

Coomassie brilliant blue R-250 500mg

Metanol 250ml

Ácido acético glacial 100ml

H₂O 650ml

Tabla 3. Protocolo de preparación de SDS-PAGE Laemmli a los porcentajes 10%, 22% y 4%.

	10% (15ml)	22% (15ml)	Empacador 4% (2.5ml)
H ₂ O	6.2ml	-----	1.4ml
Mezcla acrilamida-bisacrilamida	4.8ml	11ml	0.420ml
Amortiguador separador	3.8	3.8	-----
Amortiguador empacador	-----	-----	0.625
Persulfato de amonio 10%	120µl	120µl	16µl
TEMED	7.5µl	7.5µl	4µl

-Amortiguador separador (100ml)

Tris 18.17g

SDS 10% 4ml

pH 8.8 con HCl 12N

-Amortiguador de la muestra (10ml)

Glicerol 1ml

SDS 10% 2ml

Azul bromofenol 2mg

Amortiguador empacador 1.25ml

-Amortiguador empacador (100ml)

Tris 6.06g

SDS 10% 4ml

pH 6.8 con HCl 12N

-Amortiguador de corrida (1litro)

Glicina 14.4g

Tris 3g

SDS 1g

Aforar con H₂O a 1 litro

-Mezcla acrilamida-bis-acrilamida 30% (100ml)

Acrilamida 30g

bis-acrilamida 0.8g

Aforar con H₂O

Para todos los experimentos, la concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry *et al.* [1].

4.6 Inmunodetección por medio de la transferencia de los fragmentos de IF₁ a membranas de PVDF en presencia de amortiguador CAPS [32]. Después de realizar un SDS-PAGE se omite el paso de tinción y se procede a incubar al gel durante 30 minutos en el amortiguador de transferencia con agitación suave. Previamente se debió de haber cortado un trozo de membrana (PVDF) del tamaño aproximado del gel que se va a transferir, incubando este en metanol durante 5 minutos con agitación suave y posteriormente en el amortiguador CAPS por 10 minutos.

En la rejilla de transferencia se coloca una esponja gruesa previamente empapada con el amortiguador de transferencia y encima un papel filtro del tamaño de la esponja, también mojado en el amortiguador. Sobre este papel se coloca, con ayuda de unos guantes de látex, el gel que se va a transferir y encima la membrana hacia donde se transferirán las proteínas que se encuentran en el gel, por la cara que se encuentra doblada hacia atrás, procurando que no se formen burbujas entre ellos con ayuda de un tubo de vidrio pequeño lleno del amortiguador de transferencia. Se pone otro papel filtro, otra esponja, ambos mojados y se cierra la rejilla. La rejilla se inserta en la cámara de transferencia, la cual se llena con el amortiguador de transferencia, se pone un agitador, se inserta una cámara con hielo y se corre durante 2 horas a 100mA. Todo el sistema se encuentra sobre un agitador magnético

y dentro de un recipiente con hielo y agua, esto para mantener una temperatura de ~4°C.

Posteriormente, usando guantes, se saca el gel que se desecha, y la membrana que se incuba en una solución leche baja en grasas-PBST 5% para bloquear los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo en la membrana durante 2 horas. Después se agrega el anticuerpo primario anti-IF₁ RAC#25A-5E2D7 (obtenido por el doctor José de Jesús García, tutor de este trabajo de tesis en su estancia posdoctoral en Oregon, USA) a una concentración de 0.5µg/ml, y se deja incubar durante toda la noche. Luego se lava con PBS-T 3 veces por 5 minutos y se agrega nuevamente leche al 5% con el anticuerpo secundario durante 2 horas. Después se lava una vez con PBS-T y dos veces con PBS cada una durante 5 minutos. Se elimina el exceso de PBS secando parcialmente la membrana en medio de una placa de acetato doblada por la mitad. Enseguida, sin dejar que se seque completamente la membrana, se agrega la mezcla de revelado por quimio-luminiscencia de Amersham-Biosciences (ECL Plus), y se incuba durante 5 minutos. La quimioluminiscencia generada por la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, se revela en placas KODAK BIOMAX ML, exponiéndolas durante distintos tiempos que van desde 30 segundos hasta 10 minutos. Posteriormente, las placas se revelan automáticamente en un sistema KODAK de revelado. Una vez obtenidas las bandas específicas en la placa, se toma una foto digital o un scan de la placa y se realiza la densitometría para conocer la densidad de cada banda, así como su peso molecular con la ayuda del software "Alpha Digi Doc" de Alpha Inotech Corporation.

-Amortiguador CAPS (2 litros)

CAPS	4.4g
Metanol	200ml
	2.68mM
H ₂ O	1800ml
pH11 con NaOH 4N	

-Amortiguador PBS

NaCl	136mM
KCl	
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	1.76mM
*Tween20	1%
pH 7.2	
*Solo para PBST.	

4.7 Aislamiento de mitocondrias de corazón de bovino. Se limpia el corazón de grasa, del tejido conectivo y de coágulos de sangre, cortando el músculo en cuadros de aproximadamente 5 por 5 cm de espesor. Se muele el tejido en un molino de carne y se pesa el producto; generalmente se obtiene un peso promedio de entre 350 y 600g de producto de corazones de tamaño regular.

Por cada Kg de tejido obtenido, se agregan 4 litros de amortiguador A y se ajusta el pH a 7.4 con Tris saturado. Se licua la mezcla durante un minuto y se vuelve a ajustar el pH a 7.4 con Tris saturado. Se coloca el licuado en botellas para centrifuga de 500ml de capacidad y se centrifuga a 2,500rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decanta filtrándolo mediante el uso de una gasa sobre un vaso de 5 litros de capacidad. El precipitado se desecha y el filtrado se centrifuga a 10,000rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido son las mitocondrias, las cuales se resuspenden en 350ml del amortiguador B. Se centrifuga esta solución a 2,000rpm durante 10 minutos a 4°C, se toma el sobrenadante tratando de despegar del precipitado la fase menos densa y dejando la más densa. La suspensión se

centrifuga ahora a 10,000rpm durante 10 minutos a 4°C y se desecha el sobrenadante. El precipitado se resuspende en amortiguador B agregando la mínima cantidad de este amortiguador como sea posible, para que las mitocondrias queden mas concentradas. Se toma una alícuota para la determinación de proteína por el método de Lowry [1].

Amortiguador A		Amortiguador B	
-Sacarosa	250mM	-Sacarosa	250mM
-Tris	5mM	-Tris	5mM
-EDTA	15mM		-pH 7.4
	-pH 7.4 ajustando con HCl		

1.8 Obtención de partículas submitocondriales Mg-ATP (PSM Mg-ATP). Las mitocondrias se preparan como se indica en el apartado anterior, se diluyen a 10-20mg/ml en el medio 1, separando en lotes de aproximadamente 10ml. Después, justo antes de sonicar, se agregan el MgCl₂ y el ATP ambos a una concentración de 6mM para posteriormente sonicar cada alícuota 7 veces por 17 segundos, dejando enfriar la punta del sonicador entre cada una de ellas durante 43 segundos. Posteriormente, ajustando el pH a 7.4 con Tris saturado, se centrifuga a 10,000rpm durante 10 minutos a 4°C recuperando el sobrenadante que contiene las PSM. Este último se vuelve a centrifugar ahora a 45,000rpm por 45 minutos recuperando el precipitado para resuspenderlo en el medio 1. A continuación, a esta suspensión se le agrega medio 1 para hacer un total de aproximadamente 10ml. Se centrifuga nuevamente a 45,000rpm

durante 45 minutos. Se recupera el precipitado para resuspenderlo en el menor volumen posible del medio B (ver aislamiento de mitocondrias).

1.9 Purificación de la F₁ mitocondrial de corazón de bovino.

A partir de mitocondrias diluidas a una concentración de 10mg/ml en el buffer A (ver obtención de mitocondrias) se sonicán en 10 intervalos de 30 segundos cada uno, en baño hielo, dejando enfriar tanto la solución como la punta entre cada sonicación 1:30 minutos, después se centrifuga durante 1 hora a 45000rpm a 4°C y finalmente el sobrenadante es sometido a una cromatografía de intercambio aniónico mediante una columna de DEAE eluyendo con dos volúmenes de la columna de un gradiente de KCl que va de 0 a 0.75M, se colectan fracciones de aproximadamente 1.5ml cargando 30µl de cada una en un SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli [3] y finalmente se concentran las fracciones que se observen puras en el gel mediante un filtro Amicon® con poro de 30 kDa.

1.10 Activación de la F₁ mitocondrial.

Ya purificada la F₁ se diluye en medio Klein 2x (200mM KCl pH8) y se incuba a 40°C durante 2 horas y se vuelve a concentrar por el filtro Amicon® con poro de 30kDa para así la IF₁ que se desprende al activarse, pasa a través del filtro y la F₁ que queda concentrada ya no tiene unida a su proteína inhibidora endógena.

5.RESULTADOS

5.1 Predicción de cortes de proteasas para IF₁ mitocondrial de corazón de bovino: Se escogieron 60 posibles proteasas disponibles para conocer, virtualmente, cuales de ellas proteolizaban a la proteína. Las proteasas resultantes se enumeran a continuación. De acuerdo a las predicciones de proteólisis originadas por el software de uso libre Peptide Cutter <http://us.expasy.org/tools/peptidecutter/> disponible en internet, se obtuvo la tabla 4 a continuación:

Tabla 4. Cortes predichos por el software Peptide cutter comparados con los cortes obtenidos en estudios anteriores [5] y con los obtenidos en este trabajo. N. D. Hidrólisis de IF₁ no determinada, ya que en dicho estudio no se utilizó esa proteasa para proteolizar a la IF₁.

Proteasa	No. de cortes predichos	No. de residuo	Sitios de corte observados [5]	No. de residuo
Asp-N endopeptidasa	4	D ⁶ -N ⁷ D ¹⁷ -A ¹⁸ D ⁸² -D ⁸³ D ⁸³ -D ⁸⁴	N. D.	N. D.
Arg-C proteinasa	8	R ⁹ -S ¹⁰ R ¹⁶ -D ¹⁷ R ²⁵ -E ²⁶ R ³² -Y ³³ R ³⁵ -A ³⁶ R ³⁷ -A ³⁸ R ⁶² -L ⁶³ R ⁶⁹ -H ⁷⁰	N. D.	N. D.
Quimotripsina de baja especificidad	12	Diversos	N. D.	N. D.
Quimotripsina de alta especificidad	3	F ²² -G ²³ Y ³³ -F ³⁴ F ³⁴ -R ³⁵	3	F ²² -G ^{23*} Y ³³ -F ^{34*} F ³⁴ -R ^{35*}
Clostripain	8	R ⁹ -S ¹⁰ R ¹⁶ -D ¹⁷ R ²⁵ -E ²⁶ R ³² -Y ³³ R ³⁵ -A ³⁶ R ³⁷ -A ³⁸ R ⁶² -L ⁶³ R ⁶⁹ -H ⁷⁰	N. D.	N. D.
Glutamil endopeptidasa	13	Diversos	N. D.	N. D.
LysC	10	Diversos	N. D.	N. D.
Pepsina (pH>2)	8	A ²¹ -F ²² F ²² -G ²³ Y ³² -F ³³ L ⁴² -A ⁴³ A ⁴⁴ -L ⁴⁵ L ⁴⁵ -K ⁴⁶ L ⁶³ -Q ⁶⁴ K ⁷⁶ -L ⁷⁷	N. D.	N. D.
Pepsina (pH1.3)	8	A ²¹ -F ²² F ²² -G ²³ Y ³² -F ³³ L ⁴² -A ⁴³ A ⁴⁴ -L ⁴⁵ L ⁴⁵ -K ⁴⁶ L ⁶³ -Q ⁶⁴ K ⁷⁶ -L ⁷⁷	N. D.	N. D.
Proteinasa K	23	Diversos	4	N. D.
Staphylococcal peptidase I	11	Diversos	N. D.	N. D.
Termolisina	18	Diversos	N. D.	N. D.
Tripsina	18	Diversos	3	R ⁹ -S ¹⁰ R ¹⁶ -D ¹⁷

5.2 Purificación de la IF₁ recombinante de corazón de bovino: A partir de un cultivo de un litro de bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21, se tiene un rendimiento promedio de 8 mg por litro de cultivo en el total de las purificaciones llevadas a cabo.

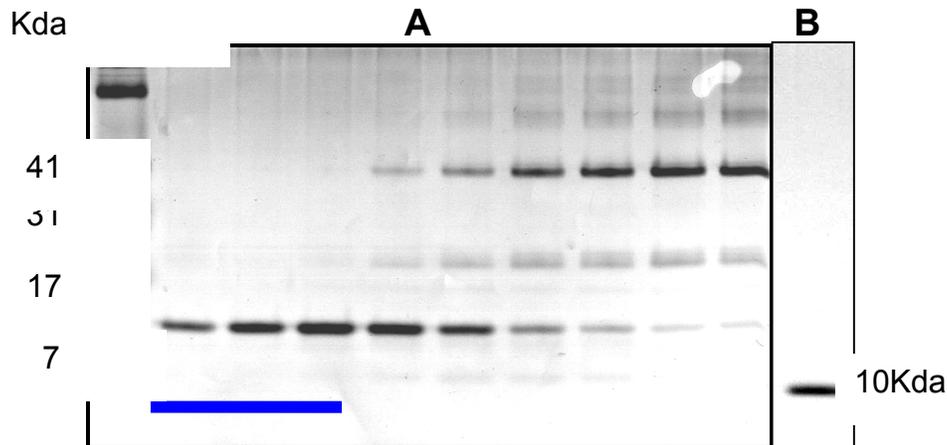


Figura 6. (A) SDS-PAGE 16%, el primer carril contiene los estándares de peso molecular, los demás carriles contienen las fracciones de una purificación a partir de un litro de células cultivadas. Las fracciones marcadas con la línea azul fueron concentradas y almacenadas a -70°C. (B) Muestra que el concentrado de estas 3 fracciones da como resultado una sola banda de una pureza mayor al 90% en un SDS-PAGE 16%.

Analizando por densitometría estas tinciones por Coomassie de la banda más pura en la figura 6 (B), tenemos que nuestra proteína esta a una pureza mayor a 95%. Al concentrado de estas fracciones se le realizó un Western-blot (WB) dando como resultado la figura 7 donde se observan dos bandas correspondientes al dímero y al monómero de la proteína inhibidora de la ATPasa, corresponden a los pesos moleculares aproximados de 21kDa y 10kDa respectivamente.



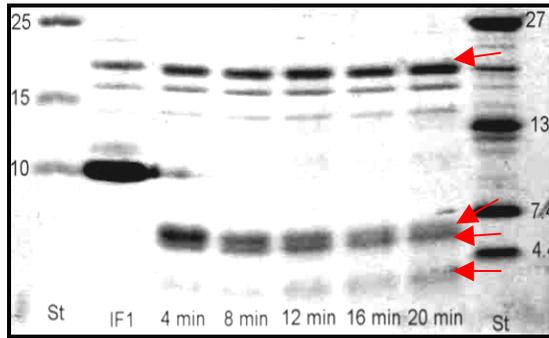
Figura 7. Western-blot de las fracciones concentradas. El carril contiene 1µg de la proteína inhibidora que en los geles apareció como una sola banda. Aquí se observan dos bandas debido a que la banda superior nos indica al dímero de la IF₁ y la banda inferior al monómero.

5.3 Proteólisis limitada

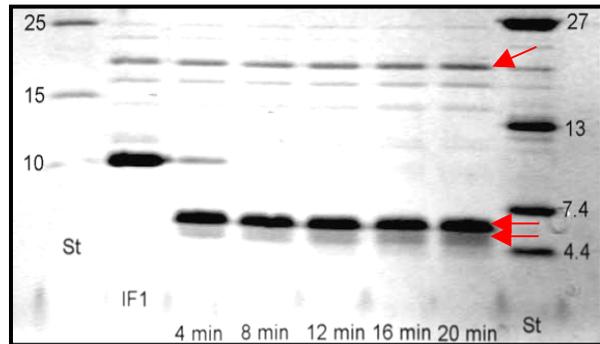
El software Peptide cutter predijo 13 posibles proteasas que, virtualmente, degradarían a la IF₁ (tabla 4). De estas, se eligieron las proteasas indicadas debido a antecedentes de previas proteólisis limitadas reportadas con la IF₁ endógena purificada a partir de mitocondrias de corazón de bovino [5]. Por lo tanto, de acuerdo a las predicciones del Peptide Cutter, y de estos antecedentes, se escogieron tripsina, quimotripsina y proteinasa k, además de la subtilisina por la disponibilidad de las mismas en el laboratorio de bioquímica genética del Instituto Nacional de Pediatría, dado que estos experimentos se realizaron en colaboración con el Doctor Horacio Reyes Vivas de ese departamento. Las condiciones de proteólisis se detallan en Material y Métodos, y en general, se usó una relación de proteasa:IF₁ de 1:100.

En estas condiciones, todas las proteasas generaron fragmentos de la IF₁ de 4.02-9.2 kDa, los cuales pudieron resolverse por SDS-PAGE desnaturalizante von Jagow a una concentración de 16% (Figura 8). Por lo tanto, las proteólisis con las cuatro proteasas se utilizaron para análisis de inmunotransferencia con el objetivo de encontrar algún fragmento reconocido por el monoclonal anti-IF₁. El tamaño aproximado de cada fragmento se estimó con el Software Alpha DigiDoc por medio de una interpolación lineal de las distancias recorridas por los estándares de peso molecular (Tabla 5). A partir de los resultados mostrados por los geles desnaturalizantes (Figura 8), se eligió el tiempo de proteólisis adecuado, siendo éste el tiempo en el cual todos los distintos fragmentos producidos se observaran nítidamente para la inmunolocalización por medio del análisis por Western-blot. Los tiempos elegidos se muestran en la tabla 6.

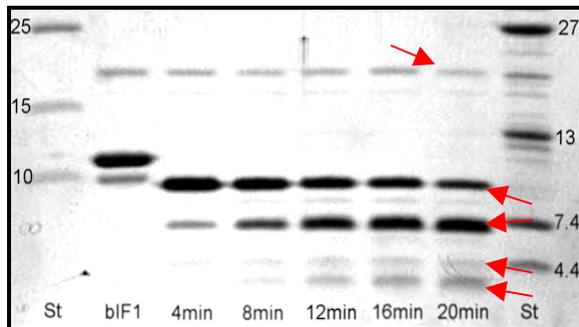
Tripsina / IF₁ Bovino



Quimotripsina / IF₁ Bovino



Proteinasa K /IF₁ Bovino



Subtilisina / IF₁ Bovino

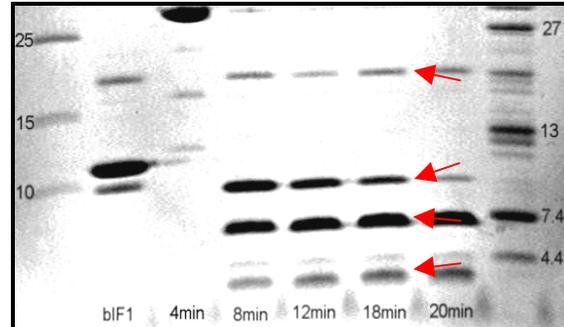


Figura 8. SDS-PAGE 16% de los productos obtenidos de la proteólisis de la IF₁ recombinante de mitocondrias de corazón de bovino. El medio de incubación está descrito en la sección de métodos, al igual que los estándares de pesos moleculares. (St) Son estándares de peso molecular (biorad); (IF₁) es la proteína inhibidora incubada durante 20 minutos sin agregar proteasa; (4min-20min) son los distintos tiempos de incubación con la proteasa indicada en la parte superior de cada figura; (St) del octavo carril son productos de hidrólisis de la Tb TIM usados como marcadores de peso molecular (más detalles en material y métodos). Los péptidos a los que se les determinó el peso molecular están marcados con una flecha roja. Se muestra la tinción con Coomassie de cada gel.

Tabla 5. Tamaño de los péptidos producidos a partir de la proteólisis parcial de la IF₁ de bovino con tripsina, quimotripsina, proteinasa K y subtilisina. En azul se señala el tamaño del péptido más pequeño resultante de la incubación con la proteasa correspondiente.

Proteasa	Tiempo de incubación (minutos)	Peso molecular aproximado (de abajo hacia arriba) kDa
Tripsina	20	4.29
		5.83
		6.29
		20.2
Quimotripsina	16	5.6
		8.8
		20.27
Proteinasa K	20	4.02
		4.3
		7.32
		10
		19.46
Subtilisina	12	4.23
		6.94
		9.20
		20.05

Tabla 6. Tiempo de hidrólisis elegido para la inmunodetección con el anticuerpo anti-IF₁

Proteasa	Tiempo de incubación de la IF ₁ de bovino (minutos)
Tripsina	20
Quimotripsina	20
Subtilisina	12
Proteinasa k	20

Datos no mostrados nos indican que al incubar entre 35 y 65 minutos (dependiendo de la proteasa) los productos formados por acción de la proteólisis van desapareciendo; es decir, ya no son detectables ni por Coomassie ni por Western blot.

5.4 Inmunodetección de los productos de la hidrólisis de la IF₁

La figura 9 nos ilustra el Western blot de la IF₁ recombinante de mitocondrias de corazón de bovino con las diversas proteasas a los diferentes minutos de incubación, mostrados en la tabla 6.

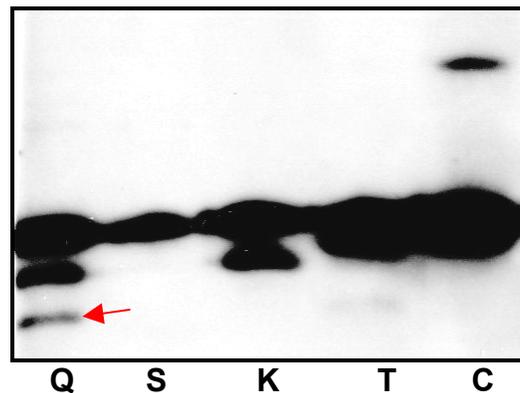


Figura 9. Inmunolocalización de los distintos fragmentos derivados de la proteólisis de la IF₁ de mitocondrias de corazón de bovino. (C) IF₁ incubada 20 minutos sin agregar proteasa; (T) IF₁ incubada 20 minutos con tripsina; (K) 20 minutos con proteinasa K; (S) 12 minutos con subtilisina; y (Q) 20 minutos con quimotripsina. Con una flecha roja se señala el producto más pequeño reconocido por el anticuerpo anti-IF₁.

Al observar que el fragmento más pequeño fue producido por la hidrólisis con quimotripsina al minuto 20, se realizó un curso temporal de la quimotripsinólisis, para luego elaborar la inmunodetección (figura 10).

La banda de menor peso molecular obtenida por quimotripsinólisis, la cual es débilmente reconocida por el anticuerpo monoclonal, tiene un peso aproximado de 5.5 kDa (figura 11, flecha roja). Esta curva de tiempo de proteólisis con quimotripsina se llevó a cabo incubando a la IF₁ 1, 2, 3, 4, 5 y 10 minutos y deteniendo la reacción con 5mM de PMSF (ver detalles en Material y Métodos). Para identificar los fragmentos teñidos con Coomassie con aquellos reconocidos por el anticuerpo, se realizaron, simultáneamente, una tinción con Coomassie y una inmunodetección de los fragmentos de la IF₁ generados con quimotripsina a partir de un mismo gel cargando la mitad del mismo con 4.5 µg de proteína por carril y la otra mitad con 0.25 µg del control, y 1.5 µg de las distintas muestras proteolizadas para inmunodetectar. El gel completo se transfirió a membranas de PVDF, se cortó por la mitad para que una parte fuera teñida con azul de Coomassie, y la otra mitad se usara para la inmuno-detección. Esto se realizó para poder sobreponer las membranas teñidas con las placas donde se realizaron las inmuno-detecciones y no tener diferencias debidas a la elaboración de los geles o a la electroforesis.

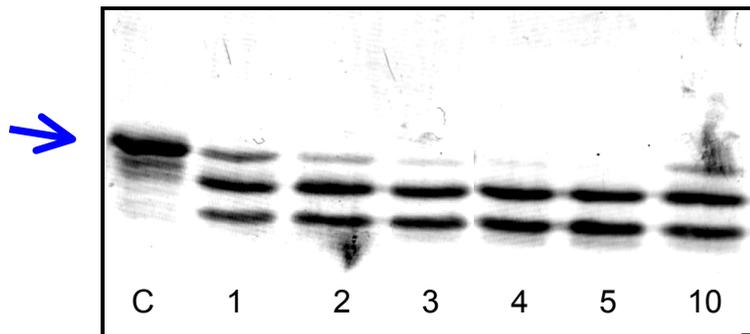


Figura 10. Proteólisis de la IF₁ de corazón de bovino. Membrana teñida con Coomassie. Los números indican los distintos minutos a los cuales se detuvo la proteólisis. La flecha azul señala a la IF₁ sin proteolizar.

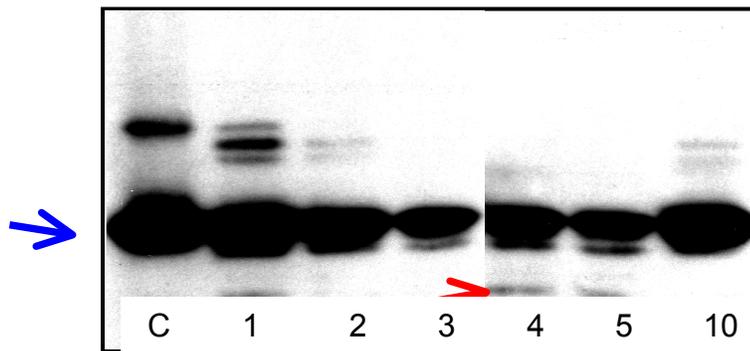


Figura 11. Proteólisis de IF₁ de corazón de bovino. Western-blot con los distintos tiempos de proteólisis. La flecha azul señala a la IF₁ sin proteolizar, la roja al péptido más pequeño reconocido por el monoclonal.

La banda que representa a la IF₁ completa (sin proteolizar) señalada con una flecha azul, va disminuyendo en la membrana teñida con los diferentes tiempos de proteólisis (figura 11). Sin embargo, a pesar de esto, la IF₁ no proteolizada residual sigue mostrando un reconocimiento considerable por el anticuerpo monoclonal en el WB, debido a que la proteína en esta parte está sobrecargada para poder observar las bandas más pequeñas.

Con la flecha roja se señala al péptido más pequeño reconocido por el monoclonal, siendo éste un fragmento de aproximadamente 5.5 kDa de peso molecular. Al tener estos fragmentos tan pequeños se consideró la posibilidad de que al transferirse durante 2 horas (ver material y métodos), estos fragmentos pudieran atravesar la membrana. Para probar esta posibilidad se realizó una curva de tiempo de transferencia (datos no mostrados) con 4 distintos tiempos de transferencia; 30, 60, 90 y 120 minutos, resultando el mejor tiempo 90 minutos, aunque las densitometrías de las bandas no dieron una diferencia significativa entre los minutos 60, 90 y 120; solamente resultó una diferencia significativa entre los minutos 30 y 120. Así mismo, se probó el uso de una segunda membrana además de la primera para poder capturar a los posibles fragmentos que pudieran atravesar la primera, sin detectarse reconocimiento alguno en esta segunda membrana, indicando esto que ningún fragmento antigénico pasa a través de la primera membrana (datos no mostrados).

Una vez encontrado el mejor tiempo de transferencia se procedió a hallar la cantidad de proteína cargada en el gel que fuera adecuada para poder detectar los fragmentos proteolíticos de la IF₁ en la membrana de PVDF, tanto en la inmunodetección, como en la tinción por Coomassie. Después de cargar diferentes cantidades de IF₁, se encontró que las cantidades adecuadas fueron, 10µg de IF₁ proteolizada por carril para la parte de la tinción de la membrana; por otro lado, 3 µg de la IF₁ proteolizada y 0.5 µg de la IF₁ control fueron suficientes para la parte de Western-blot. Estos ensayos de titulación de proteína fueron también útiles para posteriormente mandar a secuenciar las bandas que reaccionaran con el monoclonal (figura 12).

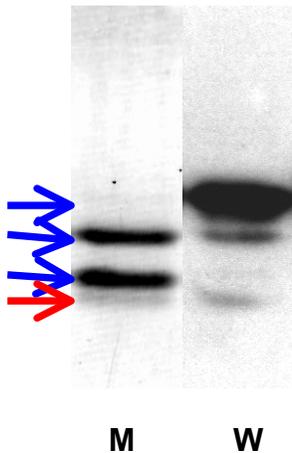


Figura 12. Comparación entre la membrana teñida (M) con el Western-blot (W) de una proteólisis con quimotripsina a los 4 minutos de incubación. Las flechas azules señalan los fragmentos de la IF₁ a los que se les secuenció la parte amino terminal, la flecha roja señala una banda que no se pudo secuenciar.

La figura 12 muestra los resultados más concluyentes respecto a la identidad de los fragmentos inmuno-reactivos al anticuerpo monoclonal. En primer término, se observa nuevamente que a pesar de que después de la proteólisis existe solamente una cantidad residual de IF₁ completa (flecha azul superior), el anticuerpo monoclonal reconoce con gran afinidad esta IF₁ residual. Sin embargo, los fragmentos de la IF₁ que se generan, aun cuando se encuentran en mayor cantidad que la IF₁ residual de acuerdo a la tinción por Coomassie (siguientes dos flechas azules, bandas del lado izquierdo), pierden en su mayoría el reconocimiento por el anticuerpo monoclonal (WB del lado izquierdo). Únicamente los fragmentos de 8.8 y 5.6 kDa (Tabla 5) conservan un débil reconocimiento por el monoclonal, sin embargo el fragmento intermedio de 6.5 kDa no es reconocido por este anticuerpo.

5.5 Secuenciación de los fragmentos reconocidos por el anticuerpo monoclonal.

La secuenciación fue llevada a cabo por degradación de Edman en colaboración con el doctor Guillermo Mendoza de la Facultad de medicina en la UNAM.

En la figura 12 se señalan con flechas azules las bandas que fueron secuenciadas dando los resultados descritos en la tabla 7. La banda de 5.5 kDa señalada con la

flecha roja, debido a que esta compuesta por diversos fragmentos con diversos residuos de aminoácidos en la parte amino terminal, no se pudo secuenciar.

Tabla 7. Distintos sitios de hidrólisis utilizando quimotripsina sobre la IF₁.

Producto	Secuencia del N-terminal	Peso molecular aproximado (kDa)
IF ₁	GSESG	10
Q ₁	GKREQA	8.8
Q ₂	RARAKEQLAA	6.5
Q ₃	No determinada	5.5

Al secuenciar la banda de 10kDa se obtiene la secuencia reportada para el N-terminal del inhibidor, el primer sitio de corte de la quimotripsina (Q₁) coincide con lo reportado por Dianoux *et al*, 1982 [5], pero el segundo (Q₂) en el que ellos encuentran el corte entre la Tyr 33 y la Phe 34; en este trabajo se encuentra entre la Phe 34 y la Arg 35; aunque los dos resultados son predichos por el software de internet Peptide-cutter.

En resumen, estos resultados indican que el epítotope del anticuerpo monoclonal anti IF₁ se pierde durante los cortes que hace la quimo tripsina en los sitios 23 y 35 del lado N-terminal de la IF₁. En consecuencia, este epítotope se debe localizar en la secuencia ²³GKREQAEEERYF³⁴, de la IF₁, o extenderse hacia aminoácidos contiguos a ambos extremos de esta secuencia.

Una coincidencia importante, es que este segmento de la IF₁ se encuentra localizado dentro de la mínima región inhibitoria descrita por el grupo de Walker [22] y otros [19]. Esto implicaría que esta región sensible a la quimotripsina y que reconoce al anticuerpo monoclonal se encontraría semi-oculta dentro de la estructura terciaria de

la F_1 soluble o de la F_1F_0 -ATP sintasa completa, de acuerdo a la estructura cristalina de la IF_1 unida a la F_1 -ATPasa de bovino (Ver Fig. 13). En amarillo se destaca esta región entre los dos cortes de la quimotripsina, en el modelo basado en las coordenadas del cristal publicado por Cabezón, *et al.* en 2003 [35] con la IF_1 recombinante reconstituida.

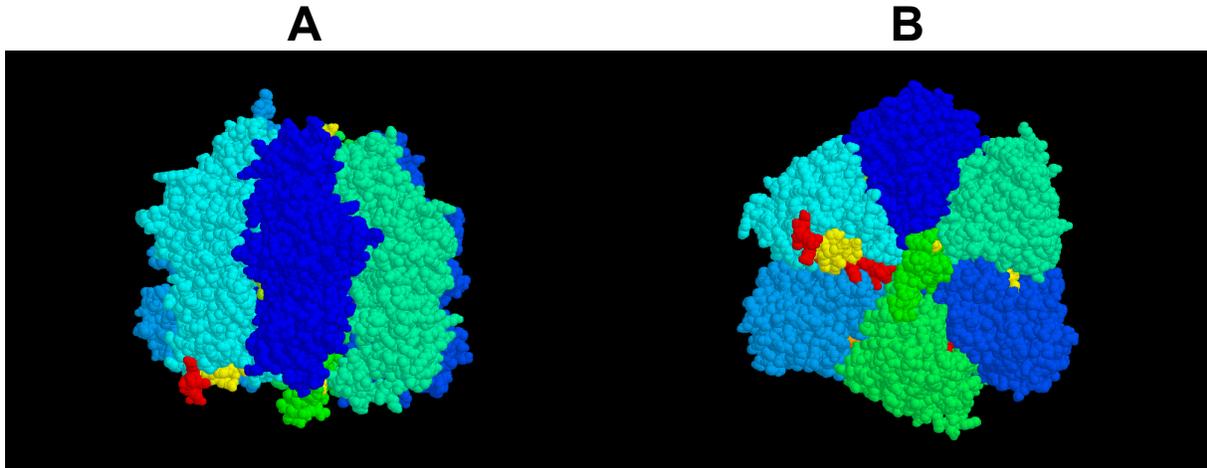


Figura 13. Modelo tridimensional de la F_1 . A partir del cristal de la referencia 35. en rojo-amarillo se muestra la parte amino terminal de la IF_1 . En amarillo se encuentra la localización predicha del epítipo del monoclonal. (A) Vista lateral del complejo. (B) vista inferior (desde F_0) de la F_1 .

5.6 Proteólisis de la IF_1 nativa en el complejo F_1 -I y en partículas submitocondriales

Mg-ATP.

Para corroborar esta predicción, se procedió a proteolizar a la IF_1 nativa tanto en el complejo F_1 -I como en partículas submitocondriales Mg-ATP, es decir con inhibidor endógeno, para saber si los sitios de corte de la quimotripsina, en las condiciones de estas moléculas endógenas, quedan o no expuestos a la acción de la quimotripsina (Fig. 14). Las condiciones de proteólisis fueron las mismas que se utilizaron para la proteólisis de la IF_1 . (Ver material y métodos). Como puede observarse en la Fig. 17, la IF_1 endógena es totalmente resistente a la hidrólisis con quimotripsina en el complejo F_1 -I.

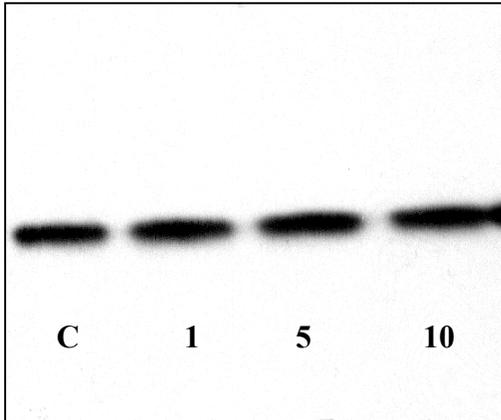


Figura 14. Proteólisis del complejo F_1 . (C) Es la F_1 sin proteolizar, (1, 5, 10) son los diferentes minutos de incubación con quimotripsina. $7\mu\text{g}$ de proteína en cada carril.

Asimismo, se repitió este experimento pero ahora usando partículas submitocondriales de corazón de bovino (Fig. 17), que al igual que en el caso de la hidrólisis con quimotripsina a F_1 -I, no se observa una disminución significativa entre las diferentes bandas; o sea los diferentes tiempos de proteólisis.

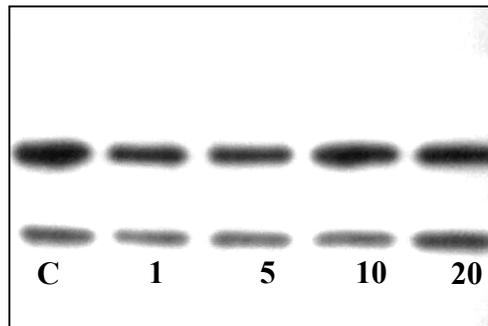


Figura 15. Proteólisis de Partículas submitocondriales de mitocondrias de corazón de bovino. La (C) son partículas submitocondriales sin proteolizar, y (1, 5, 10, 20) son los distintos tiempos de incubación con quimotripsina. $20\mu\text{g}$ de proteína por carril.

Como se observa en las figuras 14 y 15, la(s) bandas que representan a la IF_1 no sufren un cambio de intensidad. Esto se corroboró por análisis densitométricos que indicaron que no hay diferencias significativas entre la intensidad de ninguna de las bandas.

Como un control positivo de este experimento, la quimotripsinólisis se ensayó después de liberar a la IF₁ endógena en condiciones que activan al complejo F₁-I y que liberan a una cantidad significativa de la IF₁ al medio [6]. Se esperaba que este procedimiento aumentara la quimotripsinólisis de la IF₁ del complejo F₁-I. En la figura 16, resultante de la proteólisis de la F₁-I activada en medio Klein (ver detalles en materiales y métodos), se observa que la IF₁ se vuelve sensible a la quimotripsinólisis en un curso temporal de 2-20 minutos de proteólisis solamente cuando el complejo F₁-I es activado en condiciones que liberan a la IF₁ del complejo F₁-I al medio. Estos resultados corroboraron completamente la predicción de que los sitios de corte de la quimotripsina G23 y R34 (y en consecuencia el epítopo del anticuerpo monoclonal anti-IF₁) se encuentran ocultos dentro de la estructura del complejo F₁-I, ya que al liberar a la IF₁ al medio estos sitios se exponen a la proteasa.

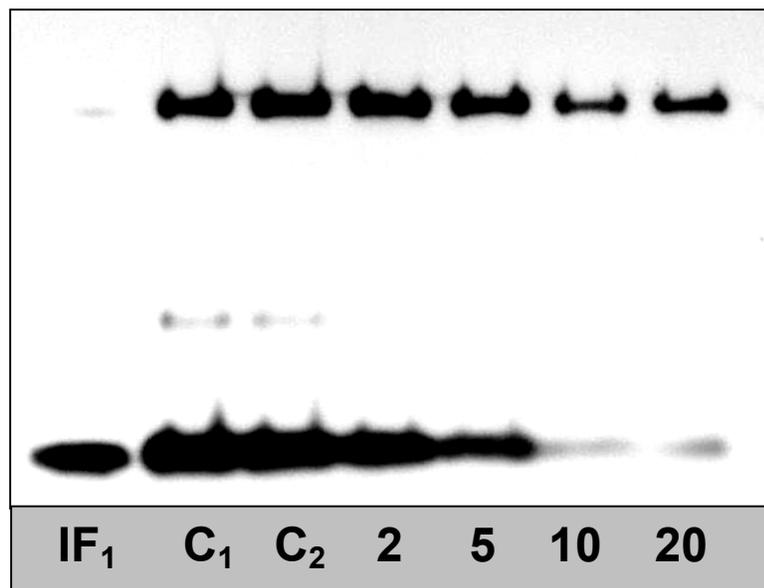


Figura16. Proteólisis del complejo F₁-I con una activación previa en medio Klein durante 1:30hrs a 40°C. (IF₁) 2μg de IF₁ recombinante; (C₁) F₁-I activada e incubada 20 minutos en presencia de quimotripsina y PMSF 5mM, (C₂) F₁-I activada e incubada sin la presencia de quimotripsina, (2, 5, 10 y 20) son los minutos de incubación con quimotripsina de la F₁-I activada, la reacción es detenida al final de estos tiempos añadiendo PMSF 5mM.

Otra implicación importante de estos resultados, es que corroboran que la estructura del segmento N-terminal de la IF₁ endógena, debe adquirir una estructura similar a la observada para la IF₁ reconstituida a la F₁-ATPasa dimérica de bovino resuelta por cristalografía de rayos-X. Esto se puede concluir dado que la accesibilidad a la tripsina de la IF₁ endógena concuerda con el acomodo de la región N-terminal inhibitoria de la IF₁ reconstituida a la F₁-ATPasa de bovino [35].

Por último, cabe mencionar que se hicieron experimentos para tratar de unir el anticuerpo monoclonal a la IF₁ endógena del complejo F₁-I o de la F₁F₀-ATP sintasa completa conteniendo su IF₁ endógeno (datos no mostrados). En ambos casos, se obtuvo un rendimiento muy bajo de unión del anticuerpo, y en algunos casos se observó que este, indujo la separación de la IF₁ del complejo F₁F₀-I completo. Estos resultados también concuerdan con la conclusión de que el epítipo del anticuerpo monoclonal se encuentra oculto en el segmento N-terminal inhibitorio de la IF₁ que se introduce en una interfase α/β y llega a tocar a la subunidad γ del rotor de la enzima.

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo permite localizar un epítipo de la proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial a partir de una IF₁ recombinante con una pureza mayor al 95% con las proteasas tripsina, proteinasa k, subtilisina y quimotripsina. Los cortes con la tripsina y con la proteinasa K son muy inespecíficos según el software de internet Peptide Cutter. La subtilisina no está incluida en este software pero se eligió debido a su disponibilidad en el laboratorio de bioquímica genética del Instituto Nacional de Pediatría ya que los experimentos de proteólisis se realizaron en colaboración con el Dr. Horacio Reyes Vivas de este instituto. Proteólisis previas de esta proteína [5] reportan el primer sitio de corte con quimotripsina son entre la Phe22 y la Gly23 (fig.17 no.1 color rojo y verde) y un segundo entre la Tyr33 y la Phe34 (fig.17 no.2 color rojo), con nuestras condiciones obtuvimos el primer corte en la misma posición a diferencia de lo que ocurre con el segundo corte (fig. 17 no.2 color verde) que a diferencia de estos autores resulta entre Phe34 y Arg35. Ambos sitios son descritos en los cortes predichos por el software de internet. Como la quimotripsina tiende a proteolizar en residuos aromáticos en la secuencia primaria de la proteína este lote de proteasa tiene preferencia por hacer las proteólisis en residuos de Phe.

en medio Klein (ver material y métodos) se observa que ahora ya no está protegida de la acción de la proteasa.

Estos resultados indican que la unión del mAb anti IF₁ debe ocurrir mejor en la IF₁ libre y preferentemente en su forma desnaturalizada o extendida, que en su forma nativa e inhibitoria unida a la F₁ o al complejo F₁F₀ completo. Esto se ha corroborado en otros experimentos de este laboratorio en donde se ha encontrado que este mAb anti-IF₁ inmunoprecipita a estos complejos con muy baja eficiencia, y no se ha podido aislar un complejo F₁-I-mAb o F₁F₀-I-mAb a partir de mezclar a las moléculas individuales en sus formas nativas.

7. CONCLUSIONES

A partir de proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial recombinante purificada con más de 90% de pureza, se obtuvo el fragmento RDAGGAFGKR EQAEEERYFR, como la mínima región antigénica reconocida por el anticuerpo monoclonal RAC#25A-5E2D7 con la ayuda de proteólisis con la proteasa quimotripsina. Esta región se encuentra dentro de la mínima secuencia inhibitoria de la proteína, dentro del heterohexámero de subunidades α/β , en su forma nativa, protegida de la acción de la quimotripsina. Además se corrobora la posición de la IF_1 en el cristal utilizando IF_1 reconstituida en el complejo F_1-I anteriormente publicada [35], con datos obtenidos con el complejo F_1-I nativo.

8. LITERATURA CITADA

1. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
2. Pullman, M. E. y Monroy, G. C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 238: 3762-3769
3. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
4. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C. y Vignais, P. V. (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphate inhibitor with phenyl (¹⁴C) isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry.* 20, 2919-2925
5. Dianoux, A., Tsugita, A., Klein, G. y Vignais, P. (1982). Effects of proteolytic fragmentations on the activity of the mitochondrial natural ATPase inhibitor. *Biochemistry.* 140, 223-228.
6. Klein, G., Satre, M. Zaccari, G. y Vignais, P. (1982). Spontaneous aggregation of the mitochondrial natural ATPase inhibitor in salt solutions as demonstrated by gel filtration and neutron scattering. Application to the concomitant purification of the ATPase inhibitor and F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 681, 226-232
7. Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Devars, S., Nava, A. y Deyfus, G. (1982). Functional and immunological characterization of ATPase inhibitor proteins from heart, liver and yeast mitochondria. *FEBS letters.* 146, 168-172

8. Panchenko, M. V. y Vinogradov, A. D. (1985). Interaction between the mitochondrial ATP synthase and ATPase inhibitor protein active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett.* 184, 226-230
9. Guerreri, F., Zanotti, F, Che, Y. W., Scarfò, R. y Papa, S. (1987). Inactivation of the mitochondrial ATPase inhibitor protein by chemical modificaton with diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta.* 892, 284-293
10. Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. biochem.* 166, 368-379.
11. Boyer, P. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase, some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta.* 1140, 215-50
12. López-Mediavilla, C., Vigny, H. y Godinot, C. (1993). Docking the mitochondrial inhibitor protein IF1 to a membrane receptor diferent from the F1-ATPase beta subunit. *Eur. J. Biochem.* 215, 487-496.
13. Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N. y Tagawa, K. (1993). Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between α - and β - subunits of F₁F₀ATPase upon de-energization of mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* 113, 350-354
14. Van Heeke, G., Deforce, L., Schnizer, R., Shaw, R., Couton, M. Shaw, G., Song. P. y Shuster, S. (1993). Recombinant bovine heart mitochondrial F₁-ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification, and structural studies. 32, 10140-10149

15. Abrahams, J., Leslie, A., Lutter, R. y Walker, J. (1994). Structure at 2.8Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370, 621-628.
16. Vázquez-Contreras, E., Vázquez-Laslop, N. y Dreyfus, G. (1994). The native F_0F_1 -inhibitor protein complex from beef heart mitochondria and its reconstitution in liposomes. *J. bioenerg. biomembr.* 27, 109-116
17. Duncan, M., Bulygin, V., Zhou, Y., Hutcheon, M. y Cross, R. (1995). Rotation of subunits during catalysis by *E. coli* F_1 -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10964-10968.
18. Lebowitz, M. y Pedersen L. (1996). Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: Relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. *Arch Biochem Biophys.* 330: 342-354
19. Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perucci, C., Candita, C. y Minuto, M. (1996). Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphate inhibitor protein of mitochondrial F_0F_1 ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 240, 461-467
20. Rouslin, W y Broge, W. (1996). IF1 Function in Situ in uncoupler-challenged ischemic rabbit, rat and pigeon hearts. *J. Biol. Chem.* 271: 23638-23641.
21. Shnizer, R., Van Heeke, G., Amaturro, D. y Shuster, S. (1996). Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F_1 -ATPase inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1292, 241-248

22. Van Raaij, M., Orriss, G., Montgomery, M., Runswick, M., Fearnley, I., Skehel, J., y Walker, J. (1996). The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* 35: 15618–15625
23. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. y Kinoshita, K. Jr. (1997). Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature*. 386, 299-302
24. Kinoshita, K. Jr., Yasuda R., Noji H., Ishiwata S. y Yoshida M. (1998). F₁-ATPase: A rotary motor made of a single molecule. *Cell*. 93, 21-24
25. Rastogi, V. y Girvin, E. (1999). Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*. 402, 263-268
26. Cabezon, E., Butler, P., Runswick M. y Walker J. (2000a). Modulation of the oligomerization state of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein, IF₁, by pH. *J Biol Chem*. 275: 25460-25464
27. Cabezón, E., Butler, P., Runswick, M., y Walker, J. (2000b). Dimerization of bovine F₁-ATPase by binding the inhibitor protein, IF₁ *J. Biol. Chem*. 275, 25460-25464
28. Kinoshita, K. Jr, Yasuda, R., Noji, H. y Adachi, K. (2000). A rotary molecular motor that can work near 100% efficiency. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 355, 473-489
29. Domínguez-Ramírez, L., Mendoza-Hernández, G., Cárabez-Trejo, A., Gómez-Puyou, A. y Tuena de Gómez-Puyou, M. (2001). Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F₁-inhibitor protein complexes. *FEBS Lett*. 507: 191-194.
30. Capaldi, R. A. y Aggeler, R. (2002). Mechanism of the F₀F₁ type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci*. 27, 154-160

31. García, J.J., Minauro-Sanmiguel, F. y C. Bravo. (2002). Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6. En: Recent Research Developments in Bioenergetics. Vol. 2. Research Signpost. Trivandrum, India. Pp 127-150
32. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., y García, J.J. (2002). Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF₁) with the rotor (α, ϵ) and the stator (α) subunits of the mitochondrial ATP syntase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34, 433-443.
33. Muller, M., Panke, O., Junge, W. y Engelbrecht, S. (2002). F1-ATPase, the C-terminal end of subunit gamma is not required for ATP hydrolysis-driven rotation. *J. Biol. chem.* 277, 23308-23313
34. Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Ríos, E., Rodríguez-Zavala, J. S. y García, J. J. (2003). Overexpression of the inhibitor protein (IF1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared with normal rat liver: functional and cross-linking studies. *Bioenerg. Biomembr.* 36: 257-264
35. Cabezón, E., Montgomery, M., Leslie, A. y Walker, J. (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature Struct. Biol.* 10, 744-750
36. Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S. y Yoshida, M. (2004). Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: Indication of noninteger 10:3 H⁺/ATP ratio and permissive elastic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 12159-12164

37. Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A. y Papa S. (2004). Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J. bioenerg. biomembr.* 34, 433-44