



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de modelado, acoplamiento y dinámica molecular de la subunidad ζ de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Jorge Emiliano Salinas López

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José de Jesús García Trejo
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Martín González Andrade
Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Abril, 2024



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Análisis de modelado, acoplamiento y dinámica molecular de la subunidad ζ de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*

que presenté para obtener el grado de ----Maestría-----es original, de mi autoría y lo realicé con

el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Una firma manuscrita en tinta que parece decir 'J. Salinas'.

**Bio. Mol. Jorge Emiliano Salinas López
No. de cuenta: 522007633**

Dedicatoria

A mi abuelo, Jorge Antonio Salinas Ortíz, fallecido durante el desarrollo de esta tesis.
Una gran persona y mejor padre, abuelo y amigo. Te amamos.

Agradecimientos

Para comenzar, me gustaría agradecer al Dr. José de Jesús García Trejo por ser mi tutor durante estos años de la Maestría, permitirme trabajar en su laboratorio y dejarme jugar con este mundo de la ATP sintasa y la bioenergética.

A mi comité tutor, conformado por la Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva y el Dr. Martín González Andrade, agradezco sus comentarios y sugerencias en cada una de las revisiones del trabajo, las cuales fueron valiosas aportaciones para el desarrollo del mismo.

También, agradezco a las y los miembros del jurado, las Doctoras Georgina Garza Ramos Martínez y Lilian González Segura, y los Doctores Rodrigo Aguayo Ortiz, Manuel Gutiérrez Aguilar y Salvador Uribe Carvajal. Gracias por sus comentarios y correcciones en esta tesis, además del tiempo que dedicaron para la evaluación, lo que sin duda ayudó a lograr una mejor versión de este trabajo.

Gracias también a Héctor Adán Martínez Torres y a la Mtra. Raquel Ortega Muñoz por toda su ayuda en el laboratorio. Desde la preparación de medios de cultivo, amortiguadores, material, soluciones, etc., hasta su compañía, apoyo y amistad.

A la Biol. Elizabeth Nallely Cabrera González por su asesoría técnica en la parte de biología molecular, al dedicar tiempo y paciencia en enseñarme y ayudarme a obtener las mutantes puntuales de la subunidad ζ .

Al Dr. Gerardo Pérez Hernández por acompañarme desde la licenciatura, además del apoyo brindado para la parte computacional de esta tesis, tanto en forma de recursos de cómputo/*software*, así como en las discusiones y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Agradezco al CONAHCYT por la beca de maestría otorgada para este trabajo.

A los compañeros Oliver, Gil, Jorge, Efraín y demás por su ayuda, compañía y enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, haciendo más divertido el tiempo que pasamos juntos.

Un especial agradecimiento al Mtro. Gilberto Garduño por enseñarme pacientemente muchas de las técnicas experimentales utilizadas en este trabajo.

A mi familia, mis papás, hermanos y abuelos, por siempre apoyarme en todas las cosas que se me ocurre hacer, sin ellos no sería posible haber llegado hasta donde estamos. Gracias.

A mis amistades, que siempre me apoyan y motivan. Aunque a veces no estemos en contacto frecuentemente, se que siempre están para mí, como yo para ustedes. Iván, Armando, Roberto, Rony, Rafa, Oliver, Arantxa, Emiliano, Andrés, Marco, Karol, Ismael, Daniel, Ilse, Patricio, José Pablo, y todos los demás que han estado conmigo en estos años, gracias.

A Naty, por estar conmigo siempre, evitar que enloqueciera y darnos tanto amor y cariño en estos años. Sin ti nunca hubiera terminado de escribir. Gracias.

Resumen

La F_1F_0 -ATP sintasa es una enzima ubicua cuya principal función es la producción de ATP y, bajo ciertas condiciones, también es capaz de catalizar la reacción inversa, hidrolizando el ATP. Para evitar esta última actividad, han evolucionado diversos mecanismos de regulación. En las α -proteobacterias la inhibición de la hidrólisis de ATP es causada por la subunidad ζ , la cual presenta una estructura diferente a la de otros inhibidores conocidos (IF1, ϵ), además de un sitio de unión a ADP/ATP que regula su actividad. Sin embargo, aún no existe una descripción detallada del sitio de unión a nucleótidos, ni del mecanismo de regulación de la actividad inhibitoria de la subunidad ζ . En este estudio, se caracterizó el sitio de unión de nucleótidos de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* computacional y experimentalmente. Se identificaron los residuos clave involucrados en la unión de nucleótidos, y se observaron cambios conformacionales en presencia del ligando causados por diferentes reorganizaciones del núcleo hidrófobo según se uniera ADP o ATP. Los experimentos de inhibición de hidrólisis de ATP demostraron que el ATP debe unirse a la subunidad ζ antes de que esta se una e inhiba la hidrólisis, y que la actividad inhibitoria disminuye al incrementar la concentración de ATP o la afinidad de la subunidad ζ por el mismo. También, simulaciones de dinámica molecular a pH constante no mostraron cambios en la unión de nucleótidos a pH 6.0, 7.0 y 8.0. Este último, facilita la formación del confórmelo inhibitorio de la subunidad ζ , sugiriendo una regulación adicional en función del pH. Los resultados apuntan a que la subunidad ζ regula su actividad inhibitoria en función del pH y la concentración de ATP.

Índice general

Abreviaturas	IX
1 Introducción	1
1.1 ATP sintasas	1
1.2 ATP sintasas tipo F	2
1.2.1 Fracción F_0	3
1.2.2 Fracción F_1	4
1.2.3 Brazo periférico	7
1.3 Mecanismo catalítico	7
1.4 Regulación de la F_1F_0 -ATPasa	9
1.4.1 Proteínas inhibitorias	10
1.5 La subunidad ζ	13
2 Objetivos	15
3 Metodología	16
3.1 Metodología <i>in silico</i>	16
3.1.1 Búsqueda de secuencias	16
3.1.2 Análisis de la conservación	16
3.1.3 Obtención de estructuras de Pd ζ y nucleótidos	16
3.1.4 Detección de cavidades	17

3.1.5	Preparación de Pd ζ silvestre y mutantes	17
3.1.6	Preparación de los nucleótidos	17
3.1.7	<i>Docking</i> ciego	18
3.1.8	<i>Docking</i> local	18
3.1.9	Dinámica molecular clásica	18
3.1.10	Dinámica molecular a pH constante	19
3.1.11	Análisis de datos	20
3.1.12	Visualización de datos	20
3.2	Metodología <i>in vitro</i>	20
3.2.1	Purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina	20
3.2.2	Preparación de células químicamente competentes	21
3.2.3	Transformación por choque térmico	21
3.2.4	Mutagénesis sitio dirigida de Pd ζ	22
3.2.5	Geles de acrilamida	23
3.2.6	Pruebas de inducción	23
3.2.7	Purificación de Pd ζ silvestre y mutantes	24
3.2.8	Purificación de PdF ₁	25
3.2.9	Cuantificación de proteínas	26
3.2.10	Ensayos de actividad de hidrólisis de ATP en medio regenerante	26
3.2.11	Proteólisis limitada	27
3.2.12	Dicroísmo circular	27
4	Resultados	29
4.1	Análisis de conservación en la subunidad ζ de α -proteobacterias	29
4.2	Detección de cavidades	29

4.3	Identificación del sitio de unión a nucleótidos en Pd ζ	31
4.4	Docking refinado (Local)	32
4.5	Fingerprint en MD	33
4.6	Dinámica molecular	35
4.7	Efecto de las mutaciones sobre Pd ζ	40
4.8	Efecto del pH en Pd ζ	44
4.9	Mutagénesis sitio dirigida	46
4.10	Purificación de Pd ζ WT y mutantes	48
4.11	Purificación de PdF ₁	49
4.12	Ensayos de actividad de la PdF ₁	49
4.13	Dicroísmo circular	53
4.14	Proteólisis limitada	53
5	Discusión de resultados	55
5.1	Los nucleótidos se unen en una región conservada de Pd ζ	55
5.2	Efecto de las mutaciones en la inhibición por Pd ζ	58
5.3	El pH modifica la conformación de Pd ζ	60
5.4	El ATP y pH regulan la inhibición de la subunidad ζ	61
6	Conclusiones	63
A	<i>Fingerprint</i> durante las simulaciones	64
B	Función de distribución espacial del ATP y ATP	65
C	<i>docking</i> en las mutantes	66
D	Estructura secundaria durante las simulaciones	68

E Resultados de secuenciación 69

F Aminoácidos mutados 71

G Proteólisis limitada 72

Índice de figuras

1.1	Subunidades de la F_1F_0 -ATP sintasa	2
1.2	Diversidad estructural de las ATP sintasas tipo F	3
1.3	Fracción F_0 de la F_1F_0 -ATP sintasa	5
1.4	Diferentes inhibidores de la F_0 de la F_1F_0 -ATPasa	10
1.5	Estructuras de Pd ζ resueltas por RMN	14
3.1	Mapa de los vectores de expresión	22
3.2	Esquema general de la mutagénesis sitio dirigida.	23
4.1	Análisis de la conservación por residuo en la subunidad ζ	30
4.2	Resultados de la detección de cavidades	31
4.3	Mejores 10 poses resultantes del <i>docking</i> ciego con FRED	32
4.4	<i>Fingerprint</i> del <i>docking</i> ciego de Pd ζ con ADP y ATP	33
4.5	Comparación de las mejores poses del <i>docking</i> con FRED y Vina	35
4.6	Análisis de las simulaciones de MD	36
4.7	Correlación cruzada por residuo	39
4.8	Cúmulos de residuos hidrófobos en 2LL0 y 2MDZ	40
4.9	RMSD y RMSF durante las simulaciones de Pd ζ mutantes	43
4.10	Puente de hidrógeno entre Y51 y D75 en 2LL0 (izquierda) y 2MDZ (derecha).	44
4.11	Análisis de las simulaciones pHMD	45

4.12	Estructuras de Pd ζ durante la simulación a pH 8.0	46
4.13	Análisis de los plásmidos de expresión en geles de agarosa	47
4.14	Purificación de Pd ζ WT y mutantes	48
4.15	Purificación de PdF ₁	50
4.16	Inhibición de la hidrólisis de ATP por Pd ζ WT y mutantes	51
4.17	Inhibición a diferentes concentraciones de ATP	52
4.18	Espectros de dicroísmo circular de Pd ζ WT y D75A	53
4.19	Porcentaje de Subunidad ζ de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa de <i>Paracoccus denitrificans</i> (Pd ζ) no proteolizada contra concentración de ADP y ATP	54
5.1	Comparación entre los resultados del <i>docking</i> y la respuesta a la unión Pd ζ -ADP en la RMN	56
A.1	Frecuencias de contactos de Pd ζ con ADP y ATP en la dinámica molecular	64
B.1	Función de distribución espacial del ATP y ATP en 2LL0 y 2MDZ	65
D.1	Porcentaje de estructura secundaria durante la dinámica molecular	68
D.2	Porcentaje de estructura secundaria de Pd ζ durante las simulaciones pHMD a pH 8	68
F.1	Posiciones de los aminoácidos mutados	71
G.1	SDS-PAGE de la proteólisis limitada de Pd ζ WT	72

Índice de tablas

3.1	Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida	23
4.1	Resultados del los acoplamientos locales con FRED y Vina	34
C.1	Resultados del <i>docking</i> en Vina para las mutantes en 2LL0	66
C.2	Resultados del <i>docking</i> en Vina para las mutantes en 2MDZ	67

Abreviaturas

ADP adenosín difosfato. 1, 6, 8–10, 12, 15–19, 25, 27, 29, 31–33, 35, 37–42, 46, 53–57, 62, 63, 65

AMP Ampicilina. 21–25

AS área superficial. 35

ATP adenosín trifosfato. 1, 3, 4, 6–15, 17–19, 25–27, 31–35, 37–42, 46, 49, 51–63, 65

CAM Cloramfenicol. 21, 23, 24

DNA Ácido desoxirribonucleico. 1

IC₅₀ Concentración inhibitoria media. 49, 51, 52, 58, 59

INGECORE *Inhibition General Core Region*. 11, 13

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido. 23–25, 48

KAN Kanamicina. 21, 23, 24

LDAO *N*-óxido de *N,N*-dimetildodecilamina. 9, 27

MD Dinámica molecular. 12, 16, 18–20, 33–36, 40, 41, 55–57, 59

OD₆₀₀ densidad óptica a 600 nm. 21, 23–25

PCR Reacción en Cadena de la polimerasa. 22, 46

Pd ζ Subunidad ζ de la F₁F₀-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*. 13–16, 19, 20, 22–25, 27, 29–31, 33–35, 37–44, 46–49, 51, 53–57, 59–63, 65, VII

Pd ζ WT Pd ζ silvestre. 17, 19, 22, 24, 27, 41, 42, 46–49, 51–53, 58, 59, 61

PDB *Protein Data Bank*. 16

PdF₁ Fracción F₁ de la F₁F₀-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*. 25, 27, 49–52, 58, 61, 63

pHMD Dinámica molecular a pH constante. 19, 20, 33, 34, 40, 44–46, 57, 60

Rgyr radio de giro. 37, 44, 45, 60

RIF Rifampicina. 23, 48

RMN Resonancia magnética nuclear. 14, 16, 56, 61

RMSD Desviación cuadrática media. 35–37, 41–45

RMSF Fluctuación cuadrática media. 36–38, 41–43

rpm revoluciones por minuto. 20, 21, 24–26

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. 23, 24, 27, 48, 50, 72

TET Tetraciclina. 21, 23, 24

1.

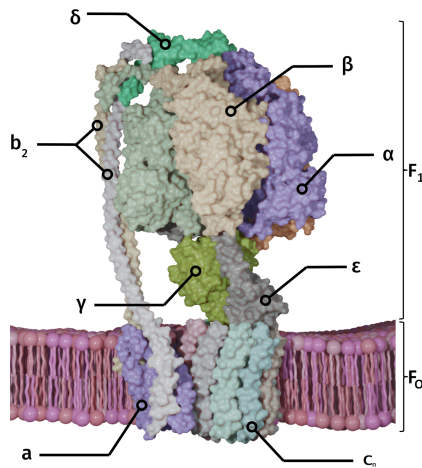
Introducción

1.1. ATP sintasas

El **adenosín trifosfato (ATP)** es una de las moléculas más importantes en los seres vivos. Cumple la función de moneda energética que impulsa los procesos biológicos endergónicos [1, 2]. Su papel se extiende a múltiples procesos, como lo son la síntesis del **Ácido desoxirribonucleico (DNA)** [3], señalización tanto intracelular como extracelular [4-6], la activación de aminoácidos [7] y la síntesis de metabolitos intermedios de alta energía [8]. A pesar de que existen diversas vías metabólicas que sintetizan **ATP** a nivel de sustrato, como las glucólisis o el ciclo de Krebs [9], la mayor parte de la producción es gracias a la ATP sintasa, durante la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación [10].

La ATP sintasa es una enzima ubicua, se localiza en la membrana plasmática de bacterias, así como en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos. Su principal función es la síntesis de **ATP** a partir de **adenosín difosfato (ADP)** y fosfato inorgánico, aprovechando la energía de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana [11]. Además, la enzima tiene la capacidad de catalizar la reacción inversa (ATPasa), hidrolizando el **ATP** para generar **ADP** y fosfato inorgánico, al tiempo que transporta protones hacia el lado opuesto de la membrana.

Se distinguen diferentes tipos de ATP sintasas: las tipo F y las de tipo V/A. Las primeras se hallan en bacterias, mitocondrias y cloroplastos. En cuanto a las del tipo V/A, únicamente las de tipo A funcionan como ATP sintasas en arqueas y ciertas bacterias extremófilas [12], mientras que las V-ATPasas actúan como bombas de protones en vacuolas de eucariontes [13]. Tanto las ATP sintasas tipo F como las de tipo A presentan un mecanismo rotacional y composición similares, diferenciándose en que las de tipo A cuentan con un mayor número de subunidades [14]. Todas las ATP sintasas contienen dos motores (F_0 y F_1 en las tipo F, y A_0 y A_1 en las tipo A), vinculados entre sí (Figura 1.1a), de modo que uno de estos motores puede activar al otro [15].

(a) F_1F_0 -ATP sintasa

	Bacteria <i>E. coli</i>	α -proteobacteria <i>P. denitrificans</i>	Cloroplasto <i>S. oleracea</i>	Mitocondria <i>S. cerevisiae</i>
F_1	α_3	α_3	α_3	α_3
	β_3	β_3	β_3	β_3
	γ	γ	γ^*	γ
	δ	δ	δ	OSCP
	ϵ^*	ϵ	ϵ^*	δ
	-	-	-	ϵ
F_0	-	ζ^*	-	IF1*
	a	a	a	a
	b_2	b, b'	b, b'	b
	c_{10}	c_{12}	c_{14}	c_{10}
	-	-	-	d, e, f, g, h, j, k, 8
	-	-	-	-

(b) Composición en diferentes organismos

Figura 1.1. Subunidades de la F_1F_0 -ATP sintasa. **a)** Subunidades canónicas en la F_1F_0 -ATP sintasa de *Bacillus PS3* (PDB: 6N2Y) [16]. **b)** Composición de las F_1F_0 -ATP sintasas de diferentes grupos de organismos. Las filas representan las subunidades homólogas entre los diferentes organismos. El subíndice representa el número de copias de esa subunidad por cada ATP sintasa [17, 18]. Las ocho subunidades canónicas corresponden a las mostradas para la enzima de *E. coli*, mientras que para la de mitocondria se añaden las subunidades accesorias en la última fila [17]. *Subunidades inhibitorias.

1.2. ATP sintasas tipo F

Las ATP sintasas de tipo F son complejos multiproteicos compuestos por dos fracciones: F_0 y F_1 . La fracción F_0 se encuentra integrada en la membrana celular de bacterias, la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana del tilacoide en los cloroplastos, desempeñando la función de canal de protones. Por otro lado, F_1 se halla soluble en el citoplasma bacteriano, en la matriz mitocondrial y en los estromas en cloroplastos, siendo el sitio dónde tiene lugar la actividad catalítica de la enzima. Además, estas fracciones están interconectadas mediante un brazo periférico.

Todas las ATP sintasas constan de ocho subunidades canónicas (Figura 1.1), las cuales forman las ATP sintasas más simples en bacterias y cloroplastos [19, 20]. La fracción F_0 se compone de un número variable de subunidades c (entre 8 y 15), dependiendo de la especie [17], y la subunidad a . Por otro lado, F_1 está conformada por tres subunidades α , tres subunidades β , y una copia de las subunidades γ , δ y ϵ , siendo γ y ϵ las que constituyen el rotor central de la enzima. El brazo periférico conecta las fracciones F_1 y F_0 , con la participación de dos subunidades b en bacterias.

En mitocondrias, las ATP sintasas son estructuralmente más complejas, ya que además de las ocho subunidades canónicas, incorporan subunidades supernumerarias

que participan en la formación de dímeros, tetrámeros e incluso hexámeros de la ATP sintasa [21], lo cual resulta en una amplia diversidad estructural entre las ATP sintasas de diferentes organismos (Figura 1.2). La mayoría de estas subunidades supernumerarias son proteínas de membrana asociadas a la fracción F_0 [19], o con el brazo periférico. Estos estados oligoméricos de la ATP sintasa son responsables de la morfología de las crestas mitocondriales [22-25]. En el presente trabajo, se detallarán las subunidades correspondientes a las ATP sintasas bacterianas.

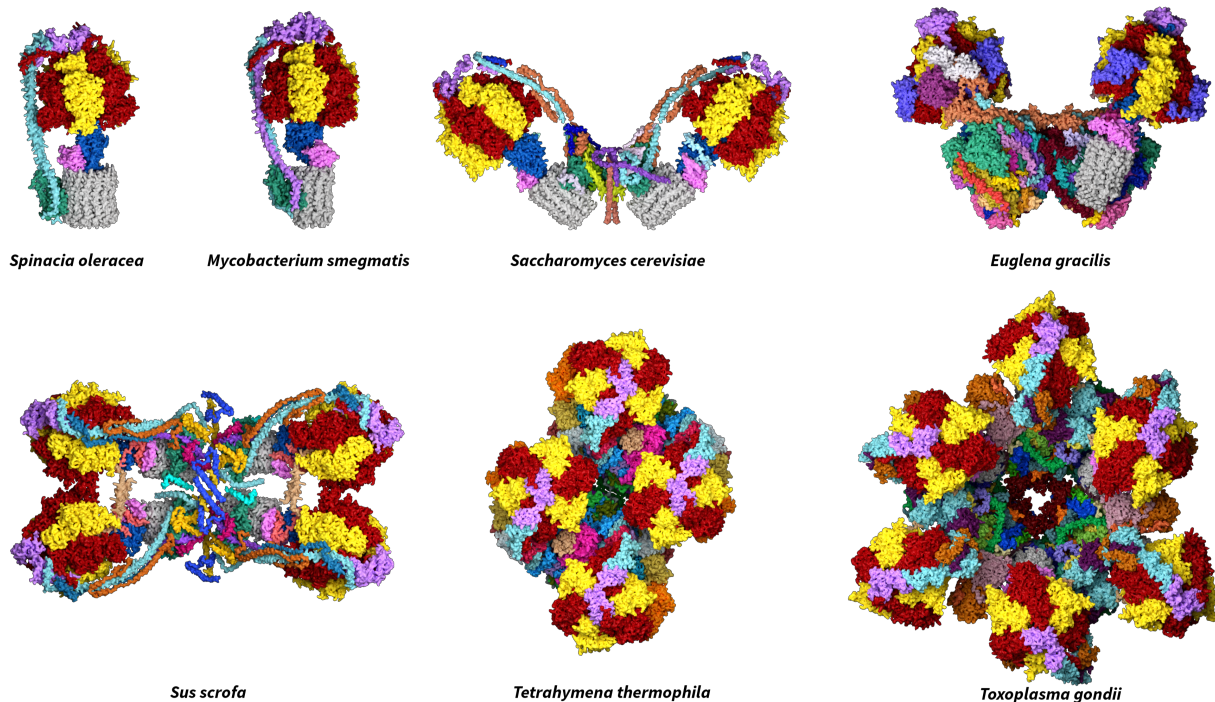


Figura 1.2. Diversidad estructural de las ATP sintasas tipo F. Las subunidades homólogas α (rojo), β (amarillo), γ (azul oscuro), δ (morado claro), ϵ (rosa), a (verde), b (azul claro) y c (gris) están coloreadas en todas las estructuras. De izquierda a derecha, de arriba a abajo: *Spinacia oleracea* (PDB: 6FKF), *Mycobacterium smegmatis* (PDB: 7G5J), *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 6B8H), *Euglena gracilis* (PDB: 6TDU), *Sus scrofa* (PDB: 6J5K), *Tetrahymena thermophila* (PDB: 6YNZ) y *Toxoplasma gondii* (PDB: 6TML). Basada en [21].

1.2.1. Fracción F_0

Para sintetizar el ATP, la ATP sintasa utiliza un gradiente electroquímico de protones que impulsa la rotación del eje central y promueve la catálisis. La fracción F_0 funciona como un canal para el flujo de protones, a través de dos hemicanales que se forman en la interfaz de las subunidades c y a que la componen.

La subunidad c está formada por dos α -hélices antiparalelas, las cuales se asocian para formar un anillo de subunidades c . El número de estas subunidades en el anillo varía

según la especie [17], y determina los protones necesarios para una rotación completa de 360° , lo que equivale a la síntesis de 3 moléculas de ATP. De la misma forma, la hidrólisis de 3 moléculas de ATP bombea ese número de protones a través de la membrana. El número de subunidades c parece resultar de una adaptación a las condiciones óptimas de crecimiento del organismo, o al ambiente fisiológico de la ATP sintasa [17, 26]. Por ejemplo, hay 8 subunidades c en mitocondrias bovinas [27], 10 en *Escherichia coli* [28], 12 en *Paracoccus denitrificans* [18] y 15 en la cianobacteria *Spirulina platensis* [29, 30].

Una de las α -hélices de la subunidad c (la que se encuentra orientada hacia el exterior del anillo) contiene un residuo ácido (ácido aspártico o glutámico, dependiendo de la especie), en el cual se unen los protones para poder ser transportados a través de la membrana durante la rotación del anillo c de un hemicanal hasta el segundo, antes de ser liberados [17].

Este anillo se asocia con la subunidad a y forman así los hemicanales para el transporte de los protones. La subunidad a está conformada por α -hélices transmembranales. De éstas, una horquilla de 2 α -hélices forma un ángulo de aproximadamente 70° con el anillo de subunidades c , un elemento conservado en todas las ATP sintasas [12]. Esta interacción resulta crucial para acoplar la translocación de protones con la síntesis de ATP, ya que en esta región se encuentra un residuo esencial de arginina que separa los hemicanales y contacta al residuo ácido cargado de la subunidad c , lo que permite la liberación de los protones. Además, la cadena lateral voluminosa y con carga positiva de esta arginina evita la fuga de protones desde el hemicanal de entrada al de salida, previniendo un corto circuito y el flujo de protones en favor del gradiente de concentración, sin inducir la rotación del anillo [31-34].

1.2.2. Fracción F_1

La fracción F_1 constituye la región catalítica de la enzima. Esta fracción hidrosoluble se encuentra proyectada hacia el citoplasma en bacterias, la matriz mitocondrial y los estromas en cloroplastos. F_1 se compone de tres subunidades α , tres β , una subunidad γ , una δ y una ϵ . Las subunidades α y β se organizan de forma intercalada ($\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$) formando un anillo hexamérico de simetría triple, con la subunidad γ insertada en el centro del anillo. La subunidad ϵ se asocia con la subunidad γ y juntas forman el rotor central de la enzima. Por su parte, la subunidad δ es la encargada de conectar el brazo periférico con F_1 (Figuras 1.1, 1.2, 1.3).

Las subunidades α y β presentan similitudes en secuencia y estructura. Cada una consta de tres dominios estructurales [35-37]: un dominio N-terminal conformado por un

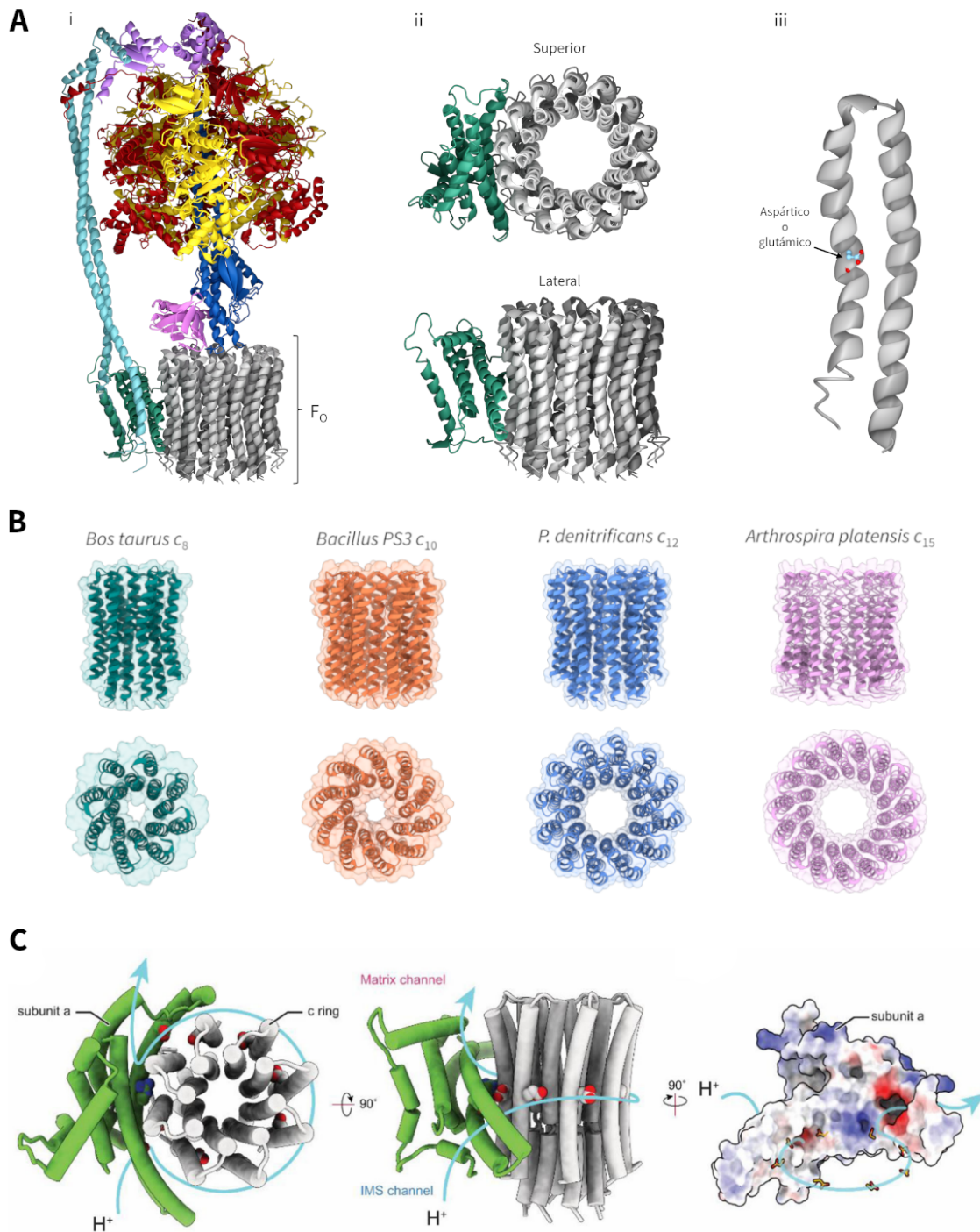


Figura 1.3. Fracción F_0 de la F_1F_0 -ATP sintasa. **A) i.** F_1F_0 -ATP sintasa de *Spinacia oleracea* (PDB: 6FKF). **ii.** Subunidad *a* (verde) y anillo de subunidades *c* (gris) en vista superior y lateral. **iii.** Subunidad *c*, se muestra el residuo protonable (aspartato o glutamato). **B)** Anillos de subunidades *c* de *Bos taurus* (verde, PDB: 6ZPO), *Bacillus PS3* (naranja, PDB: 6N2Y), *Paracoccus denitrificans* (azul, PDB: 5DN6) y *Arthrospira platensis* (rosa, PDB: 2WIE). **C)** Translocación de protones en la ATP sintasa (PDB: 6ZPO). La flecha azul indica el camino de los protones en la interfaz de las subunidades *a* y *c*. La arginina conservada de la subunidad *a* y los residuos ácidos en *c* están representados en esferas. En la derecha se muestra la superficie electrostática de la subunidad *a*, con las cargas positiva y negativa en colores azul y rojo, respectivamente. Tomada de [21]

barril β , un dominio de unión a nucleótidos formado por hebras- β rodeadas de α -hélices, y un dominio C-terminal compuesto por α -hélices. En la subunidad β , se encuentra la secuencia DELSEED (nombrado así por su secuencia conservada de aminoácidos), esencial para la transmisión del torque entre γ y β [38, 39].

Cada copia de las subunidades α y β tiene un sitio de unión a nucleótidos, pero sólo los sitios en β poseen actividad catalítica. Estos sitios de unión se encuentran en la interfaz entre estas subunidades. Los tres sitios de unión a nucleótidos no catalíticos presentes en las subunidades α unen Mg-ATP, y tienen un papel estructural y de regulación de la enzima [40-42]. Los sitios catalíticos se encuentran en las subunidades β , con una arginina esencial que forma parte de α . En el mecanismo catalítico descrito por Boyer [11], el cual se explicará más adelante (Sección 1.3), estos sitios de unión alternan entre tres conformaciones, la primera con el sitio vacío (β_E) en el que no hay nucleótidos unidos, después con el Mg-ADP y fosfato unidos (β_{DP}), los cuales se condensan para formar el Mg-ATP unido en el sitio (β_{TP}). Estas transiciones en las conformaciones del sitio de unión se dan en dirección de la síntesis de ATP, mientras que cuando este se hidroliza las transiciones se dan en el sentido opuesto ($\beta_E \rightarrow \beta_{TP} \rightarrow \beta_{DP}$). Un motivo Walker A con secuencia GxxxxGK(T/S) [43] en el asa-P (*P-loop*) se une a los oxígenos de los fosfatos mediante lisina y serina/treonina conservadas.

En el centro del anillo $\alpha_3\beta_3$ se inserta la subunidad γ . Esta subunidad es asimétrica, por lo que la orientación de γ respecto a α y β provoca cambios conformacionales en estas subunidades, lo que afecta las afinidades por el ATP o ADP y fosfato. Por lo tanto, la orientación de γ está correlacionada con la conformación que adoptan los sitios de unión catalíticos (β_E , β_{DP} o β_{TP}). Esta asimetría se debe a que los extremos N- y C-terminal forman dos α -hélices que interaccionan entre si. La hélice N-terminal es más corta que la C-terminal, y ambas se encuentran conectadas por un dominio globular compuesto por α -hélices y hebras- β . Esta última región se encuentra firme pero reversiblemente unida al anillo de subunidades c por medio de puentes salinos [17], además de interaccionar con la subunidad ϵ , lo que refuerza la interacción con las subunidades c [44].

La subunidad ϵ está compuesta por un sándwich- β de 10 hebras- β y una horquilla de dos α -hélices en el extremo C-terminal. Estas hélices pueden adoptar una conformación compacta (horquilla), o extenderse hacia el resto de F_1 en algunos organismos, inhibiendo la hidrólisis de ATP, como se describirá en la sección 1.4.1. Esta subunidad juega un papel importante en el ensamblaje del complejo F_1F_0 [45, 46], en la catálisis [47-49] y, como ya se mencionó, en la inhibición de la actividad de ATPasa en algunos organismos [50, 51].

Por último, la subunidad δ es la encargada de conectar a F_1 con el brazo periférico de la

enzima. Esta subunidad consiste en un dominio N-terminal compuesto por α -hélices conectado con un dominio C-terminal que contiene una hoja- β central rodeada de α -hélices. El dominio N-terminal interactúa con α -hélices encontradas en las subunidades α [52], mientras que el C-terminal con las subunidades b del brazo periférico [53]. La subunidad δ no forma una unión rígida entre el brazo periférico y F_1 , sino que actúa como un asa, con el dominio N-terminal moviéndose de 20° a 30° respecto al dominio C-terminal [54]. Este movimiento de asa permite la rotación conjunta entre F_1 y el rotor central de la enzima durante los primeros 20° a 30° por cada 120° de rotación en γ [54].

1.2.3. Brazo periférico

Para conectar a las fracciones F_1 y F_0 , se encuentra el brazo periférico. Este se compone de α -hélices extensas, que corresponden a las subunidades b y b' , que en ciertas bacterias como *E. coli* son idénticas, mientras que en otros casos, como *P. denitrificans*, presentan variaciones [18]. Ambas subunidades están ancladas a la membrana, interactuando con la subunidad a , extendiéndose hasta la subunidad δ en F_1 . Su función principal es impedir la rotación entre las secciones inmóviles de la enzima (subunidad a y el anillo $\alpha_3\beta_3$), y el anillo de subunidades c , en junto con el rotor central (γ y ϵ) [55]. A pesar de esto, el brazo periférico no se mantiene estático, sino que puede flexionarse hasta 12° durante la rotación [56, 57], lo que colabora con el acoplamiento flexible entre F_0 y F_1 [17].

1.3. Mecanismo catalítico

Para sintetizar ATP, la F_1F_0 -ATP sintasa aprovecha la fuerza protón-motriz, un gradiente electroquímico de protones que impulsa la rotación del anillo de subunidades c . La fracción F_0 se encarga de translocar los protones desde el espacio intermembranal al citoplasma en bacterias, mediante los hemicanales presentes en la interfaz entre las subunidades a y c . Durante la síntesis de ATP, las subunidades c rotan en sentido antihorario (hacia la izquierda) desde la perspectiva de F_1 , lo que causa que se aproximen a la interfaz con la subunidad a . En este proceso, los protones del espacio intermembranal ingresan por el hemicanal y protonan el residuo ácido cargado en la subunidad c próxima (aspartato en *E. coli*, glutamato en *P. denitrificans*), neutralizando su carga. La subunidad c protonada y sin carga entra al entorno hidrófobo de la membrana, moviéndose en sentido antihorario. Esto aproxima el residuo ácido de la siguiente subunidad c al hemicanal, y el ciclo se repite. Una vez que $n - 1$ subunidades han sido protonadas (n es el número de subunidades c en el anillo), el residuo ácido protonado se encuentra

con el hemicanal de salida y el protón se libera hacia el medio con pH más elevado del citoplasma.

Utilizando estructuras de alta resolución resueltas por cristalografía de rayos X y simulaciones de dinámica molecular, se demostró que la cadena lateral de los residuos ácidos puede adoptar dos conformaciones diferentes dependiendo del entorno en que este presente [30, 58-61]. Cuando la cadena lateral se encuentra en un ambiente hidrofílico adopta una conformación abierta que permite el intercambio de protones. En un ambiente hidrófobo, la cadena lateral se encuentra protonada y en una conformación cerrada. Cuando una subunidad *c* protonada llega al hemicanal de salida (citoplasma), su cadena lateral adopta la conformación abierta, lo que permite la liberación del protón. En esta conformación desprotonada se puede establecer una interacción con la arginina conservada de la subunidad *a*, lo cual libera la cadena lateral ácida de la subunidad *c* anterior y permite la protonación de esa subunidad, por lo tanto el cambio a la conformación cerrada. Una vez protonada y en esta conformación, esa subunidad puede volver a entrar a la interfaz hidrófoba entre el anillo de subunidades *c* y la membrana lipídica, y el siguiente ciclo de translocación de protones comienza [60].

La rotación del anillo de subunidades *c* también causa la rotación de las subunidades γ y ϵ , las cuales conforman el rotor central de la enzima, y son las encargadas de transferir el torque generado por la translocación de protones a la fracción F_1 . La orientación de la subunidad γ va a determinar los estados conformacionales de α y β . La interacción de γ con la región DELSEED en el dominio C-terminal de la subunidad β genera un movimiento de bisagra entre este y el dominio de unión a nucleótidos [35, 39]. Las propiedades dinámicas de cada una de las subunidades β son fundamentales para el funcionamiento de la enzima [35, 62, 63], ya que estos cambios conformacionales suceden de forma alternada durante la rotación de γ , dando lugar a las conformaciones del sitio de unión a nucleótidos mencionadas previamente: β_E , β_{DP} y β_{TP} . Mientras uno de los sitios se encuentra en la conformación β_E , el siguiente se encontrará en β_{DP} y el tercero como β_{TP} . Durante la transición de β_{DP} a β_{TP} se condensan el Mg-ADP y el fosfato formando Mg-ATP. Entonces, por cada 360° de rotación de γ , cada subunidad β habrá pasado por los 3 estados, sintetizando 3 moléculas de ATP durante la rotación. A este mecanismo se le conoce como el mecanismo de cambio de unión o de sitios alternantes [11].

La síntesis de una molécula de ATP está asociada entonces con una rotación de $\sim 120^\circ$ de la subunidad γ . Esta rotación se descompone en dos pasos: un giro de $\sim 80^\circ$ en el que se unen el Mg-ADP y el fosfato (*binding dwell*), y un giro de $\sim 40^\circ$ en el que se lleva a cabo la catálisis (*catalytic dwell*) [64-69]. Esto se ha estudiado principalmente durante la hidrólisis de ATP, la cual se mencionará enseguida. Además, no en todos los organismos está presente este comportamiento. En *P. denitrificans*, se dan únicamente tres

pasos de 120° , a diferencia de los seis mencionados previamente [70].

También, existe un desfase entre los seis pasos en F_1 y el número de pasos en F_0 , correspondiente con el número de subunidades c . Esto sugiere que la enzima alterna entre una conformación tensa y relajada durante el ciclo catalítico [71, 72]. El torque aplicado por el rotor, causado por la translocación de protones en F_0 , tendería a rotar al hexámero $\alpha_3\beta_3$ en la misma dirección. Para evitarlo, el brazo periférico de la enzima junto con la subunidad δ previenen la rotación en F_1 .

En la hidrólisis de **ATP**, el mecanismo es semejante al de la síntesis, pero en sentido opuesto. Aquí, la unión del **ATP** en la subunidad β_E genera cambios conformacionales en esa subunidad, por lo que ahora el movimiento del dominio C-terminal va a promover la rotación en la subunidad γ . Este ciclo de unión e hidrólisis de **ATP** generará torque que va a impulsar la rotación del anillo de subunidades c en sentido de las manecillas del reloj (hacia la derecha), por lo que ahora bombeará protones desde el citoplasma hacia el espacio intermembranal utilizando el mismo mecanismo que en la dirección de la síntesis. Esta actividad de ATPasa se encuentra regulada para prevenir el consumo total del **ATP** intracelular, lo que causaría la muerte celular. Existen diversos mecanismos de regulación, los cuales se describirán a continuación.

1.4. Regulación de la F_1F_0 -ATPasa

Debido a que la F_1F_0 -ATP sintasa es completamente reversible, debe de ser regulada cuando se detenga la síntesis para prevenir la hidrólisis total del **ATP** intracelular. Existen condiciones en las que no es posible mantener el gradiente electroquímico de protones, como la ausencia de un aceptor final de electrones, oscuridad o baja luminosidad, o anoxia [73].

Existen diversos mecanismos para la regulación de la actividad de ATPasa. La forma de regulación más común, y que se ha descrito en F_1F_0 -ATPasas de cloroplastos [74-77], bacterias [78, 79] y mitocondrias [80-82], es la inhibición por **Mg-ADP**. Este actúa como un inhibidor competitivo, y es probablemente el mecanismo más ancestral y conservado de regulación, funcionando incluso en el complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ aislado [83]. La inhibición por este mecanismo se da por la unión del **Mg-ADP** a un sitio catalítico (β_{TP}) en ausencia de fosfato [84, 85]. Esto detiene la rotación en el ángulo correspondiente al *catalytic dwell*, y se requiere una rotación en γ de $\sim 40^\circ$ para volver a activar la enzima [86]. La activación también es posible en presencia del **N-óxido de N,N-dimetildodecilamina (LDAO)** [87, 88]. Cabe mencionar que nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Hiroyuki Noji, demostraron que esta inhibición por **Mg-ADP** es parcial, pues no detie-

ne del todo la rotación de la subunidad γ , sino que la hace mas lenta. Esto hace a este mecanismo insuficiente para detener por completo la actividad de la ATPasa, por lo cual a lo largo de la evolución biológica se han adquirido las proteínas inhibitoras de la F₁F₀-ATPasa en los diferentes organismos [70].

Además de la regulación por Mg-ADP, existen otros mecanismos de regulación que no requieren de proteínas inhibitoras accesorias. En la F₁F₀-ATPasa de cloroplastos, la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína de la subunidad γ en condiciones oxidantes (oscuridad) bloquea la rotación y previene la hidrólisis de ATP por interacciones de esta subunidad con el DELSEED en β_E . Cuando se reanuda la exposición a la luz, el puente disulfuro es reducido por la tiorredoxina, y la subunidad γ puede volver a rotar [89-91].

También, se ha identificado que la F₁F₀-ATPasa de la bacteria *Micrococcus luteus* es inhibida por la subunidad δ [92, 93]. La secuencia de aminoácidos de esta subunidad diverge de las de otras bacterias. Otro mecanismo de inhibición también se encontró en la bacteria *Mycobacterium smegmatis*, en el que la presencia de un asa adicional en la subunidad γ , junto con un dominio adicional en su subunidad α inhiben la rotación en el sentido de la hidrólisis de ATP [94, 95].

1.4.1. Proteínas inhibitoras

Existen otros mecanismos de inhibición que, a diferencia de los ya mencionados, utilizan diferentes proteínas inhibitoras (Figura 1.4): IF1 en mitocondrias, la subunidad ϵ en cloroplastos y algunas bacterias, Atp[⊖] en cianobacterias, y la que es de mayor interés para este trabajo: la subunidad ζ en α -proteobacterias (Sección 1.5).

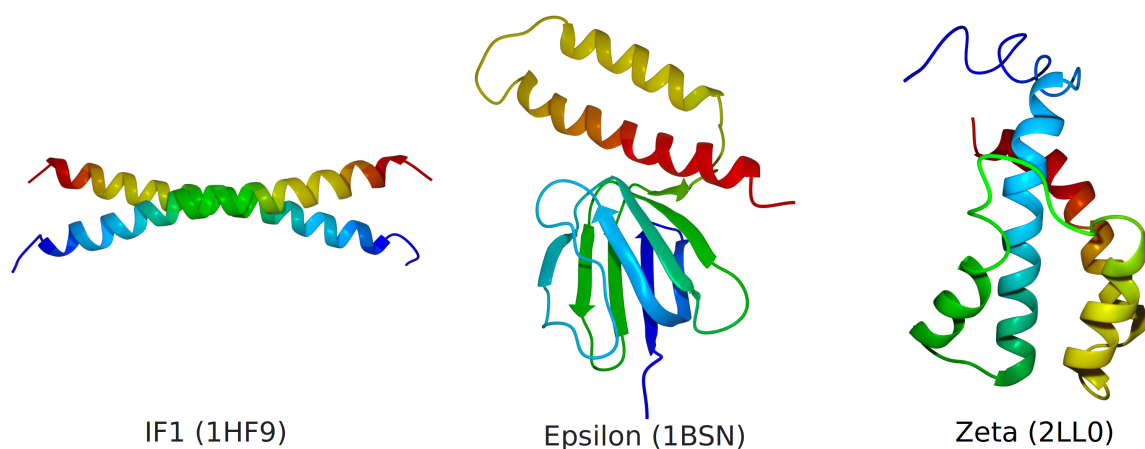


Figura 1.4. Diferentes inhibidores de la F₀ de la F₁F₀-ATPasa. Para cada proteína, se muestra su PDBid entre paréntesis. La coloración va del extremo N-terminal (azul) al C-terminal (rojo).

Factor inhibitorio de ATPasa 1 (IF1)

En mitocondrias, cuando la fuerza protón motriz se pierde, por ejemplo durante la isquemia o el desacoplamiento, la hidrólisis de **ATP** por la F_1F_0 -ATPasa es inhibida por el Factor inhibitorio 1 (IF1) [96]. Esta es una proteína pequeña, de alrededor de 10 kDa, cuyo extremo N-terminal se encuentra intrínsecamente desordenado, mientras que el C-terminal se estructura como α -hélice y funciona como un dominio de dimerización [97, 98]. En su forma activa, IF1 forma homodímeros donde las α -hélices de la región C-terminal en cada monomero interactúan formando una hélice superenrollada (*coiled coil*). La dimerización y la actividad inhibitoria son dependientes del pH. La máxima inhibición se da a pH 6 [99], y va disminuyendo gradualmente conforme aumenta el pH [97, 99, 100], lo que causa que IF1 tienda a formar tetrámeros con dos pares de dímeros por medio de su extremo N-terminal, la cual es la región encargada de la inhibición [98, 101, 102]. La formación de los dímeros promueve la dimerización de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial [23, 103]

El mecanismo de inhibición se da en dos pasos. Primero, el dominio N-terminal entra en la interfaz α_E/β_E . Después de una rotación de 120° en γ , IF1 se incorpora más profundamente hasta la interfaz entre α_{DP} , β_{DP} y γ , la cual se conoce como *Inhibition General Core Region (INGECORE)*. Al mismo tiempo, el dominio intrínsecamente desordenado de IF1 transiciona a una estructura ordenada en forma de α -hélice, bloqueando la rotación y logrando así la inhibición [104-107], tanto de la síntesis como de la hidrólisis de **ATP** [108, 109].

Subunidad ϵ

Como ya se mencionó, la subunidad ϵ juega un papel estructural en la F_1F_0 -ATPasa [45-49]. Adicionalmente, en cloroplastos y la mayoría de las bacterias esta subunidad puede inhibir la hidrólisis de **ATP** [50, 51, 110]. La inhibición se da a causa de cambios conformacionales en la subunidad ϵ [111], en los que las dos α -hélices del dominio C-terminal pueden adoptar tanto una conformación compacta, en la que se encuentran paralelas, o una conformación extendida [112].

En la conformación extendida o inhibitoria, ambas hélices se encuentran completamente extendidas y paralelas a la subunidad γ , y el extremo C-terminal se inserta en la región *INGECORE* [57, 113], al igual que IF1, inhibiendo únicamente la actividad de ATPasa, sin inhibir síntesis de **ATP**, por lo que la subunidad ϵ funciona como un inhibidor unidireccional de la F_1F_0 -ATPasa [112]. Cuando las α -hélices se encuentran en la conformación compacta o no inhibitoria, estas forman una horquilla espacialmente orientada hacia el dominio N-terminal de la subunidad ϵ . La transición entre los

estados compacto y extendido está regulada por la unión de Mg-ATP [114]. Cuando la concentración de ATP intracelular es alta, se une el Mg-ATP interaccionando con residuos de ambas α -hélices y el dominio N-terminal, por lo que la unión sólo es posible en la conformación compacta. Esta interacción es altamente específica [115], además de que la afinidad cambia entre organismos en el intervalo micro a milimolar ($K_d = 4.3 \mu\text{M}$ en *Bacillus* PS3 [116], $K_d = 2.1 \text{ mM}$ en *Bacillus subtilis* [117] y $K_d = 22 \text{ mM}$ en *E. coli* [114]). Cuando la concentración de ATP disminuye, el dominio C-terminal puede adoptar la conformación extendida e inhibir la hidrólisis. Entonces, la subunidad ϵ funciona como un sensor de ATP, inhibiendo su hidrólisis cuando la concentración es baja.

A pesar de que la secuencia primaria del sitio de unión de nucleótidos en ϵ es igual en *B. subtilis* y *Bacillus* PS3, la afinidad por el Mg-ATP difiere en órdenes de magnitud [116, 117]. Para explorar el origen de estas diferencias se ha utilizado simulaciones de Dinámica molecular (MD), en las cuales se identificó un ácido glutámico fuera del sitio de unión de *B. subtilis* (E102) con alta influencia en la afinidad [118]. Las simulaciones permitieron identificar que este residuo secuestra a una arginina (R99) involucrada directamente en la interacción con el nucleótido, formando un puente salino entre estos residuos. Cuando se mutó a E102 por alanina (E102A), la afinidad incremento ~ 10 veces, mientras que al mutarlo por arginina (E102R), esta incremento ~ 54 veces [118]. Esto sugiere que residuos de la segunda capa de interacción, fuera del sitio de unión, son capaces de regular la unión del Mg-ATP con las subunidad ϵ . Recientemente, se describió otra forma de regulación por residuos de la segunda capa, en la que el estado de protonación de dos histidinas fuera del sitio de unión modula la interacción con el ATP, causando que la unión de este sea dependiente del pH [119]. Lo anterior sugiere que existe una diversidad en la regulación funcional de la subunidad ϵ en bacterias.

A pesar de que el sitio de unión a Mg-ATP se encuentra presente en la mayoría de las bacterias, tanto en la subunidad δ en mitocondrias (homóloga de ϵ en bacterias) como en α -proteobacterias este sitio se perdió, además de que la subunidad ϵ carece completamente de actividad inhibitoria [49].

Subunidad Atp^\ominus

A diferencia de los cloroplastos, en las cianobacterias las cadenas fotosintéticas y de transporte de electrones están ubicadas en la misma membrana, los tilacoides, y comparten componentes [120], por lo que no es posible regular a la ATPasa como en los cloroplastos, ya que ambas vías generan un gradiente de protones. Entonces, la F_1F_0 -ATPasa de cianobacterias no pueden controlarse con el mismo mecanismo redox de los cloroplastos. Además de la regulación por Mg-ADP [121] y por la subunidad ϵ [122],

la proteína $\text{Atp}\Theta$ actúa como un inhibidor de la hidrólisis de **ATP** en cianobacterias. Esta pequeña proteína (48 aminoácidos) se expresa durante condiciones de oscuridad o choque térmico, e interacciona con la ATPasa en la región F_0 con las subunidades a y c . Se propone que la inhibición se da debido a que $\text{Atp}\Theta$ bloquea la rotación del anillo de subunidades c por medio de interacciones con la subunidad a . La ubicación e interacciones precisas de $\text{Atp}\Theta$ con F_0 aún no se conocen [123].

1.5. La subunidad ζ

En las bacterias de la clase α -proteobacteria la subunidad ε , como ya se mencionó, no presenta actividad inhibitoria. En cambio, en estas bacterias se ha estudiado una nueva proteína inhibitoria de la F_1F_0 -ATPasa, conocida como subunidad ζ , descrita por primera vez en *P. denitrificans* [124, 125]. Esta subunidad de 104 residuos y 11.7 kDa de peso (en *P. denitrificans*) está conformada por 4 α -hélices y un dominio N-terminal intrínsecamente desordenado en los primeros dieciocho residuos (Figura 1.5) [49, 126]. La subunidad ζ , a pesar de tener una estructura diferente a la de los otros inhibidores conocidos, bloquea la rotación con un mecanismo similar, insertando su dominio inhibitorio en la interfaz α_E/β_E al igual IF1, acoplado la rotación en γ con la reestructuración de su dominio N-terminal desordenado a una α -hélice [18], la cual bloquea la rotación de γ en la región **INGECORE** ($\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$) [127]. A su vez, la parte globular de ζ se ancla en la interfaz cerrada de α_{DP}/β_{DP} . A diferencia de IF1, que algunos autores sugieren que bloquea la rotación en ambos sentidos [96, 108, 109], ζ es un inhibidor unidireccional de la hidrólisis de **ATP** [128, 129] de forma análoga a un trinquete [127]. Además, el dominio N-terminal de la subunidad ζ presenta similitud con el dominio inhibitorio de IF1 [127, 130].

En el dominio globular de la subunidad ζ se ha identificado un sitio de unión a ADP o ATP, el cual es de baja afinidad y parece regular la actividad inhibitoria de ζ [49, 126], ya que al incrementar la concentración de ATP, la actividad inhibitoria de la subunidad ζ se ve disminuida [131]. Utilizando calorimetría de titulación isotérmica, se ha calculado la constante de disociación del **ATP** con la **Subunidad ζ de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* (Pd ζ)**, resultando en una $K_d = 11.4$ mM, lo que corresponde a una energía libre de unión $\Delta G = -2.65$ kcal/mol [49]. Es importante mencionar que aunque esta afinidad es relativamente baja, en nuestro laboratorio se ha medido la concentración de **ATP** intracelular en *P. denitrificans*, encontrándose una concentración de 11.5 mM cuando la bacteria se crece en medio respiratorio aeróbico [129]. Esto tiene la implicación de que esta unión de **ATP** a la subunidad Pd ζ tiene relevancia fisiológica, pues debe promover una regulación de la subunidad ζ , además de que ésta misma

debe funcionar como sensor del ATP intracelular *in vivo*, y muy posiblemente no sólo en *P. denitrificans* sino también en el resto de las α -proteobacterias donde se conserva la subunidad ζ . También, por medio de Resonancia magnética nuclear (RMN) se ha resuelto la estructura de Pd ζ libre (PDB: 2LL0), y en presencia de ADP (PDB: 2MDZ). En esta última, Pd ζ experimentó una serie de cambios conformacionales en respuesta a la unión del ligando (Figura 1.5) [126]. Sin embargo, no existe una descripción detallada del sitio de unión a ADP/ATP, ni de cómo la unión de estos nucleótidos regula la actividad inhibitoria de Pd ζ .

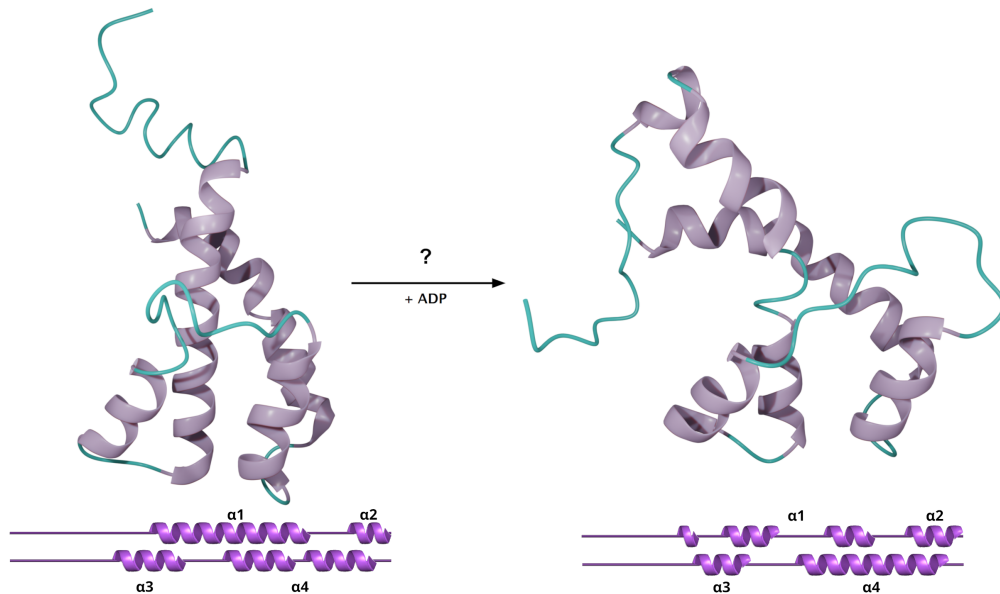


Figura 1.5. Estructuras de Pd ζ resueltas por RMN. Se muestra un esquema de la topología de la subunidad ζ para 2LL0 (Izquierda) y 2MDZ (Derecha). A pesar de los cambios en las hélices, se mantienen los nombres de las estructuras secundarias con un fin comparativo. Los cambios conformacionales son generados por la unión del ADP a Pd ζ , identificados por RMN [126].

Por otro lado, se ha observado que la mayor capacidad inhibitoria de Pd ζ se da en pH 8.0 [132], lo que contrasta con IF $_1$, donde la mejor inhibición ocurre en valores de pH 6.5 [96]. Además, al analizar a Pd ζ mediante filtración molecular, se observaron cambios en el volumen de retención dependientes del pH, presentando un radio hidrodinámico mayor a pH 8.0, con respecto al observado con un pH de 7.5 [132]. Este cambio en el volumen de Pd ζ podría tener un efecto en la inhibición que ejerce sobre la F $_1$ F $_0$ -ATPasa.

2.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el sitio de unión a [ATP](#) y [ADP](#) de [Pdζ](#) utilizando estrategias computacionales y experimentales

Objetivos específicos

- Identificar los residuos involucrados en la unión de nucleótidos
- Evaluar probables cambios conformacionales causados por la unión de nucleótidos, y su relación con la actividad biológica de [Pdζ](#)
- Entender el papel de los nucleótidos en la inhibición causada por [Pdζ](#)
- Producir mutantes puntuales de [Pdζ](#) para aumentar y disminuir la afinidad por los nucleótidos

3.

Metodología

3.1. Metodología *in silico*

3.1.1. Búsqueda de secuencias

Con el fin de realizar un análisis de la conservación por residuo de la subunidad ζ , se llevo a cabo una búsqueda de secuencias homólogas de Pd ζ en la base de datos de UniProtKB [133] utilizando el algoritmo phmmer en el servidor web de HMMER [134]. De las 6745 secuencias encontradas, todas etiquetadas como DUF1476, se realizó un *clustering* de las secuencias con al menos el 95 % de identidad con el fin de eliminar secuencias redundantes, utilizando el programa CD-Hit [135]. Para la selección de homólogos, se eligieron únicamente las secuencias con una cobertura e identidad mínimas del 60 % y 35 %, respectivamente, resultando en 4546 secuencias diferentes, de las cuales se recuperaron 1000 secuencias representativas.

3.1.2. Análisis de la conservación

Las secuencias recuperadas se alinearon utilizando MAFFT [136]. Para calcular la puntuación de la conservación por residuo se utilizó el método ConSurf, implementado en el servidor web ConSurf [137]. Los alineamientos se visualizaron utilizando UCSF-Chimera 1.16 [138].

3.1.3. Obtención de estructuras de Pd ζ y nucleótidos

Para llevar a cabo los experimentos de *docking* y MD, se obtuvieron las estructuras de Pd ζ en ausencia y presencia de ADP, las cuales se encuentran depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) (PDB ID 2LL0 y 2MDZ, respectivamente). Por cada una de las estructuras, resueltas por RMN, se encuentran disponibles 20 conformeros diferentes. Las coordenadas de los seis nucleótidos fueron obtenidas de la base de datos PubChem. Para la generación de las mutantes R29A, N30A, R31A, L33A, V55A, T57A, T57K, D59K,

D61K, E62R, D65K, V68A, K71A, D75A, R86A, R93A, R29A/R93A, R29A/N30A/R93A y N30A/E62R se utilizó el programa PyMOL 2.4.1 [139], seguido de una minimización de energía con 100 pasos con el algoritmo de *steepest descent* [140] y 10 pasos del algoritmo de gradiente conjugado [141].

3.1.4. Detección de cavidades

Con el fin de tener un primer acercamiento a los posibles sitios de unión de los nucleótidos en Pdζ silvestre (PdζWT), se utilizó el programa FTSite[142, 143] para identificar cavidades donde se podrían unir los nucleótidos. Se probaron cada uno de los 20 conformeros disponibles para ambas estructuras.

3.1.5. Preparación de Pdζ silvestre y mutantes

Antes de realizar el *docking*, es necesario corregir los estados de protonación de los receptores (PdζWT y mutantes). Se utilizó el servidor web H++ [144], el cual agrega los protones faltantes a la estructura utilizando los parámetros del campo de fuerza Amberff19SB, además de determinar el estado de protonación de los grupos titulables utilizando una metodología estándar de solvente continuo en un modelo de Poisson-Boltzmann para predecir los pK_a de estos grupos. Se ajustó la protonación a un pH 7.0. Posteriormente, para el *docking* con FRED [145] se prepararon los receptores utilizando el programa Make Receptor 4.0.0.0 de OpenEye [146], asegurándose de que la región de muestreo cubriera las cavidades previamente identificadas. Para los *dockings* en Auto-dock Vina 1.2 (referido aquí como Vina) [147], se prepararon los receptores utilizando AutoDockTools 1.5.7 [148].

3.1.6. Preparación de los nucleótidos

Se ajustó la protonación de los nucleótidos a pH 7.0 con el software Avogadro 1.2 [149]. Posteriormente, se asignaron las cargas parciales de los átomos para cada nucleótido, empleando el modelo semiempírico AM1-BCC [150] incorporado en el programa molcharge 2.1.1.0 del paquete QUAPAC 2.1.2.1 de Openeye [151]. Para los *dockings* con FRED se generó una biblioteca de 1000 conformeros diferentes para cada nucleótido, utilizando los parámetros del campo de fuerza MMFF94 en el programa OMEGA 4.1.0.0 [152]. En el caso de Vina, para el ADP y ATP se aplicó una minimización de energía con 1500 pasos del método *steepest descent* [140] utilizando el campo de fuerza GAFF [153]

en Open Babel 2.4.0 [154], y de igual manera se asignaron las cargas parciales con el modelo AM1-BCC.

3.1.7. *Docking* ciego

Una vez preparados los receptores y ligandos, se llevó a cabo un *docking* ciego secuencial en el programa FRED 4.0.0.0 [145]. Se utilizaron los 20 conformeros de 2LL0 y 2MDZ, y para cada uno se acoplaron las bibliotecas de conformeros de ambos nucleótidos, resultando en 80 acoplamientos diferentes. Se recuperaron las 100 mejores poses de cada *docking*, clasificándolas con la función de puntuación Chemgauss4.

3.1.8. *Docking* local

Con el fin de refinar el *docking* ciego, además de llevar a cabo los acoplamientos con las mutantes, se muestreó únicamente en el sitio de unión previamente identificado con el *docking* ciego para el *docking* local. Para FRED, se acoplaron las bibliotecas de conformeros de cada nucleótido con únicamente un conformero por sistema. Al igual que con el *docking* ciego, se guardaron las 100 mejores poses según la puntuación de la función Chemgauss4.

Para el *docking* refinado con Vina, se utilizó un espacio de búsqueda de 17 Å x 17 Å x 17 Å con un espaciamiento de 1 Å, centrado en el sitio de unión identificado en el *docking* ciego con FRED. Se acoplaron el ADP y ATP en cada uno de los 20 conformeros de 2LL0 y 2MDZ, recuperando las 10 mejores poses obtenidas utilizando la función de puntuación de Vina.

3.1.9. Dinámica molecular clásica

Se seleccionaron las mejores poses resultantes del *docking* ciego como estructuras de partida para las simulaciones de MD. Se parametrizaron los nucleótidos con el programa antechamber [153, 155] de la suite AmberTools 21 [156], y se revisaron los parámetros generados con parmchk2. Se construyeron los sistemas y se prepararon las topologías para cada sistema utilizando el módulo LEaP (versión leap) [156] con el campo de fuerza ff19SB [157] para la proteína y GAFF [153, 155] para los nucleótidos. Se añadieron iones de Na⁺ para neutralizar las cargas del sistema. Todos los sistemas fueron solvados en una caja octaédrica con el modelo de solvente explícito OPC [158], localizando los límites de la caja a 10 Å de la proteína.

Las simulaciones de MD fueron realizadas en el programa AMBER 20 [156], a una temperatura de 298.15 K y 1 atm de presión, aplicando el termostato de Langevin [159] con una frecuencia de colisiones de 5 ps^{-1} , además de un control de presión isotrópico con el barostato de Berendsen [160]. Se establecieron condiciones de contorno periódicas y se utilizó el método de sumas de Ewald de malla de partículas [161], con un cutoff de 10 Å. Se utilizó el algoritmo SHAKE [162] para las restricciones de los enlaces, y se determinó un tiempo de integración de 2 fs.

Se minimizó la energía de las estructuras con 1000 pasos del método de *steepest descent* [140], seguido de 4000 pasos de minimización con el método de gradiente conjugado [141]. Posteriormente, se calentaron los sistemas durante 50 ps a 298.15 K, seguido de una equilibración de 500 ps a 298.15 K y 1 atm de presión. Se impusieron restricciones de posición sobre los átomos pesados de los complejos, las cuales se fueron removiendo gradualmente durante la minimización, calentamiento y equilibración, en esta última restringiendo únicamente al esqueleto de la proteína. Para la producción de la MD, se simularon 100 ns para cada sistema. Se almacenaron los datos de las posiciones y energía cada 5000 pasos de simulación (10 ps), resultando en 10,001 conformaciones espaciales para toda la dinámica. Se llevaron a cabo duplicados para todas las simulaciones.

Para las simulaciones de MD de las mutantes, se seleccionaron las siguientes: R29A, N30A, T57K, E62R, D75A y N30A/E62R. Se utilizaron los mismos parámetros y condiciones que en las simulaciones de PdζWT. En el caso de las mutantes E62R y N30A/E62R, se utilizó como estructura de partida la mejor pose resultante del docking con Vina.

3.1.10. Dinámica molecular a pH constante

Para las simulaciones de Dinámica molecular a pH constante (pHMD), se utilizó el campo de fuerza ff10SB modificado con los parámetros necesarios para la pHMD. Los demás pasos de la preparación, minimización, calentamiento y equilibración de los sistemas se mantuvieron como en las simulaciones de MD clásica. Para la producción de la pHMD, se llevó a cabo con pH constante en un modelo híbrido de solvente, utilizando el modelo de solvente explícito TIP3P [163] para la simulación de MD, y el modelo generalizado de Born (GB) [164] para las simulaciones de Monte Carlo, haciendo un intento de protonación/desprotonación cada 100 pasos de simulación, permitiendo 100 pasos de relajación del solvente en caso de que hubiera algún cambio en la protonación. Se estableció una concentración de sal de 0.1 M para los cálculos del modelo GB. Se simuló la estructura de Pdζ resuelta sin ADP (2LL0) a valores de pH de 6.0, 7.0 y 8.0; además de los sistemas 2LL0 + ADP/ATP y 2MDZ + ADP/ATP a pH 7.0.

3.1.11. Análisis de datos

Para generar el *fingerprint* de la interacción de Pd ζ con los nucleótidos en el *docking* ciego secuencial, se utilizaron *scripts* de Python para obtener los datos a partir de los resultados del *docking*. Una vez conseguidas las interacciones, se graficó la frecuencia de los contactos utilizando R 4.1.1 y RStudio 1.4.1717. Para analizar los acoplamientos locales con FRED y Vina se utilizó PLIP [165].

Los análisis de las trayectorias, tanto de las simulaciones MD y pHMD, fueron realizados utilizando el módulo CPPTRAJ 5.1.0 incorporando en AmberTools 21; además del paquete de R bio3d 2.4-2 [166]. El análisis de los contactos entre Pd ζ y los nucleótidos durante los 100 ns de simulación se generó con la librería GetContacts [167].

3.1.12. Visualización de datos

Todas las estructuras fueron visualizadas en PyMOL 2.4.1 [139] y ChimeraX 1.2.5 [168]. Las imágenes de las estructuras fueron producidas en Blender 3.5 [169] y PyMOL 2.4.1 [139]; mientras que para la visualización y representación de datos se utilizó el paquete de R ggplot2 3.3.5 [170].

3.2. Metodología *in vitro*

3.2.1. Purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina

Para purificar el DNA plasmídico se tomaron 1.5 mL de cultivo saturado de *E. coli* en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L), los cuales se centrifugaron a 14,000 **revoluciones por minuto (rpm)** durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla formada se resuspendió en 100 μ L de solución de lisis alcalina I (50 mM glucosa, 2.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 μ g/mL RNasa A). Posteriormente se añadieron 200 μ L de la solución de lisis alcalina II (0.2 N NaOH, 1 % SDS (p/v)), se agitó por inversión suavemente y se incubó en hielo durante 5 minutos. Al término de la incubación se agregaron 150 μ L de la solución de lisis alcalina III (60 mL acetato de potasio 5 M + 11.5 mL ácido acético glacial + 28.5 mL H₂O), se agitó suavemente y se volvió a incubar en hielo durante 3 minutos. Después, se centrifugó a 14,000 **rpm** durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le añadieron 2 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA plasmídico.

Las muestras se incubaron durante toda la noche a -20 °C. Una vez terminada la incubación se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante completamente y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 70 %. Se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla resultante se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril.

3.2.2. Preparación de células químicamente competentes

A partir de un cultivo saturado de *E. coli* Turbo en medio LB, o *E. coli* Origami B(DE3)pLysS en medio LB con Tetraciclina (TET) 10 µg/mL, Kanamicina (KAN) 50 µg/mL y Cloramfenicol (CAM) 25 µg/mL, se tomarón 400 µL para inocular 20 mL de medio LB, o medio LB + TET 10 µg/mL, KAN 50 µg/mL y CAM 25 µg/mL en el caso de *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Los cultivos se incubaron en agitación a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0.6. Posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ y MgCl₂ 100 mM. Se incubaron por 10 minutos en hielo, luego se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL 100 mM CaCl₂ frío. Se agregó 15 % de glicerol y alicuotó, para ser almacenadas a -70 °C.

3.2.3. Transformación por choque térmico

Las células químicamente competentes fueron descongeladas en hielo, evitando cambios bruscos de temperatura. A 50 µL de células se añadieron 5-10 µL del plásmido a transformar, para luego incubarse durante 30 minutos en hielo. Después se realizó el choque térmico a 42 °C durante 30 segundos para *E. coli* Turbo, o 1 minuto para *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Se adicionaron 950 µL de medio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa), para posteriormente incubar durante 1 hora en agitación a 37 °C. Después de la incubación, se inocularon cajas Petri con medio LB sólido (medio LB + 15 g/L agar bacteriológico) adicionado con Ampicilina (AMP) 100 µg/mL para *E. coli* Turbo, o LB sólido + AMP 100 µg/mL, TET 10 µg/mL, KAN 50 µg/mL y CAM 25 µg/mL para *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Las cajas inoculadas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron las colonias y crecieron en medio LB y en cajas de Petri con medio LB sólido.

3.2.4. Mutagénesis sitio dirigida de Pd ζ

Se utilizó el plásmido pT7-7 + Pd ζ WT (Figura 3.1a) purificado por lisis alcalina como molde para llevar a cabo las mutaciones puntuales R29A, T57K y D75A en el gen de Pd ζ . Las mutaciones se introdujeron utilizando **Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)** con la polimerasa *Pfu* a las siguientes condiciones de reacción: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguido de 13 ciclos de amplificación con 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 65 °C y 5.5 minutos de elongación a 72 °C, terminando con una elongación final durante 10 minutos a 72 °C. Se utilizaron 100 ng del plásmido pT7-7 + Pd ζ WT como molde y 1 μ M de la mezcla de oligonucleótidos (Tabla 3.1).

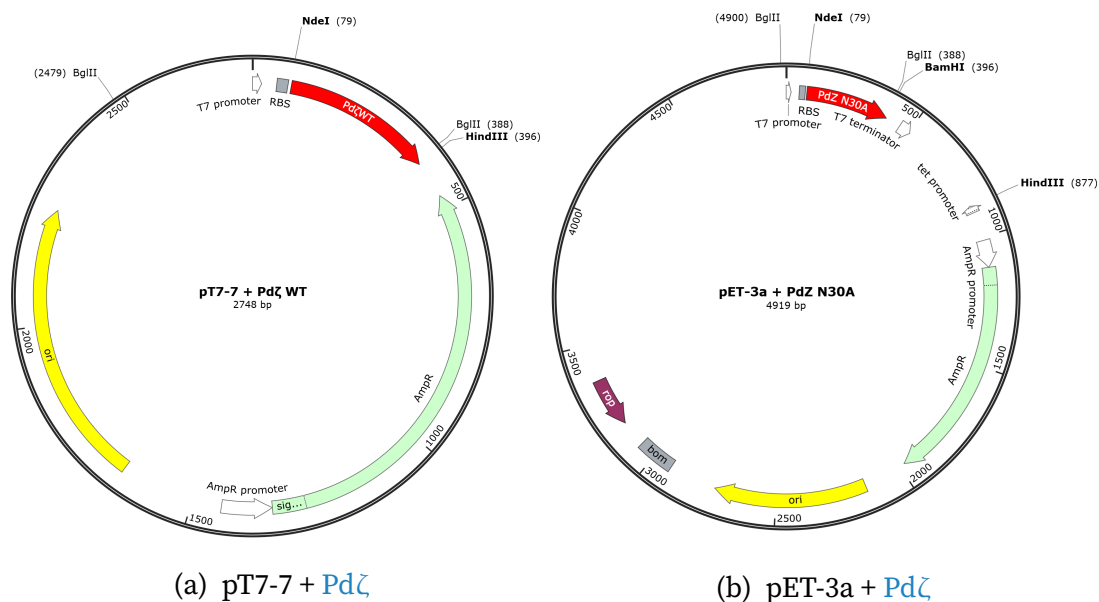


Figura 3.1. Mapa de los vectores de expresión utilizados. Se muestra en rojo la posición del gen de Pd ζ clonado en cada vector. **A)** pT7-7 se utilizó para expresar Pd ζ WT y las mutantes R29A, T57K y D75A. **B)** pET-3a se empleó para expresar las mutantes N30A, E62R y N30A/E62R.

Los productos de la PCR fueron digeridos con DpnI durante 90 minutos a 37 °C para degradar el DNA molde. Posteriormente se transformaron en *E. coli* Turbo con el protocolo previamente descrito, utilizando 5 μ L de los productos de la PCR digeridos. Se seleccionaron las colonias transformadas y se crecieron en medio LB líquido + AMP. Para cada mutante se seleccionaron 3 colonias, se purificó el DNA plasmídico de cada una y se secuenció para verificar que la mutación se incorporara satisfactoriamente. Un resumen gráfico de esta técnica se muestra en la Figura 3.2. Estas construcciones se diseñaron y se construyeron por la técnica de *QuickChange* en colaboración con la Dra. Nallely Cabrera del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

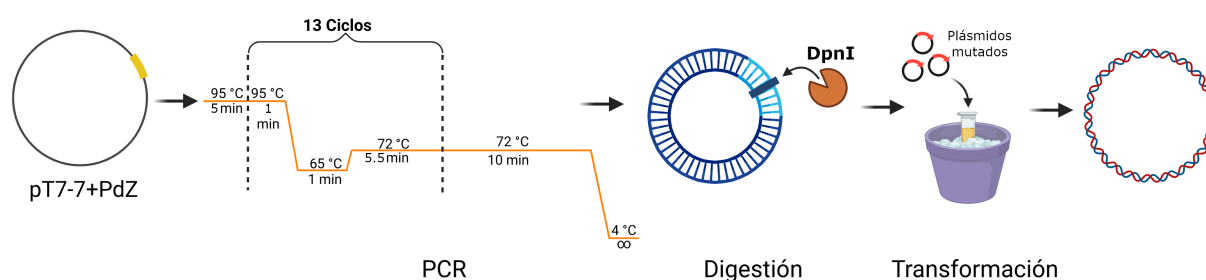


Figura 3.2. Esquema general de la mutagénesis sitio dirigida.

Primer	Secuencia
F-R29A	5'-GCCGAGGCGCGGGCCAATCGCCTGCT-3'
R-R29A	5'-AGCAGGCGATTGGCCCCGCGCCTCGGC-3'
F-T57K	5'-GCTGACCGTGGTCAAGTCGGATTTTCGACGA-3'
R-T57K	5'-TCGTCAAATCCGACTTGACCACGGTCAGC-3'
F-D75A	5'-AAGCTGGCGGCCGCACTGGAAGGCAAGGC-3'
R-D75A	5'-GCCTTGCTTCCAGTGC GGCCGCCAGCTT-3'

Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida.

3.2.5. Geles de acrilamida

Para identificar las proteínas de interés se utilizaron **Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)** tipo Schagger y von Jagow [171]. Se utilizó una concentración de 4 % para el gel concentrador, mientras que para el gel separador se utilizó una concentración del 12 %, a excepción de los ensayos de proteólisis limitada, donde la concentración del gel separador fue del 16 %.

3.2.6. Pruebas de inducción

Para evaluar la expresión **PdZ**, se indujeron las células transformadas con los plásmidos de expresión con 0.25 mM **Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)**. Se inoculó 1 mL de medio LB + **AMP** 100 μg/mL, **TET** 10 μg/mL, **KAN** 50 μg/mL y **CAM** 25 μg/mL con cada cepa de expresión. Se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una **OD₆₀₀** de 0.6, momento en el que se añadió el **IPTG**. En algunos casos se añadió **Rifampicina (RIF)** 50 μg/mL 3 horas después de la inducción con **IPTG** para disminuir la expresión de proteínas endógenas de la célula.

3.2.7. Purificación de Pdζ silvestre y mutantes

Para purificar la Pdζ^{WT} y las mutantes R29A, T57K y D75A, se transformaron células de *E. coli* Origami B(DE3)pLysS con el vector de expresión pT7-7 clonado con el gen de Pdζ correspondiente, mientras que para las mutantes N30A, E62R y N30A/E62R se utilizó el vector pET-3a (Figura 3.1). Se utilizó el mismo protocolo de purificación para cada una de las diferentes mutantes de Pdζ, así como para la proteína silvestre.

Se comenzó inoculando 100 mL de medio LB + AMP 100 µg/mL, TET 10 µg/mL, KAN 50 µg/mL y CAM 25 µg/mL con las células *E. coli* Origami B(DE3)pLysS y se incubaron en agitación toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inocularon 4 matraces de 2 L con 1 L cada uno de medio LB + AMP 100 µg/mL, TET 10 µg/mL, KAN 50 µg/mL y CAM 25 µg/mL con 25 mL del cultivo de la noche anterior, y se incubaron a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6, momento en el que comenzó la inducción con 0.25 mM de IPTG. Se incubaron 3 horas a 37 °C en agitación, posteriormente se añadió rifampicina 50 µg/mL. Las células se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación.

Después de la incubación, se centrifugaron las células a 6,000 rpm por 15 minutos a 4 °C, se recuperó el precipitado y se lavó una vez con *buffer* A (20 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.0). Se concentraron las células por centrifugación a 6,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. La pastilla de células se resuspendió en *buffer* B (20 mM KH₂PO₄ pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, cOmplete[®]) y se sonicó en baño de hielo por 14 ciclos de 30 segundos con 1 minuto de descanso. Posteriormente se añadieron 10 mM MgCl₂ y 5 mg de DNasa I, se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se añadió sulfato de amonio hasta llegar al 50 % de saturación en un baño de hielo, se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante se llevó a 80 % de saturación de sulfato de amonio en baño de hielo. Se incubó por 2 horas en hielo para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El botón resultante se resuspendió en 5 mL de *buffer* B. Para remover el exceso de sulfato de amonio, se dializó la muestra con 2 litros de *buffer* B en dos cambios, el primero incubándose a 4 °C durante la noche. Al día siguiente se cambió al segundo litro de *buffer* B y se incubó por 2 horas a 4 °C.

La muestra desalada se unió a una columna de intercambio iónico (DEAE), previamente equilibrada con 10 volúmenes de H₂O y 10 volúmenes de *buffer* B. Para eluir, se utilizó un gradiente escalonado de KH₂PO₄ (50, 80, 100, 150, 300 y 500 mM), recolectando fracciones cada 4 mL. Estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones con mayor cantidad de Pdζ se juntaron y concentraron. La muestra concentrada posteriormente se cargó en una columna de filtración en gel Superdex[®] 75, previamente equilibrada con 50 mL de H₂O y 50 mL de *buffer* B. Las fracciones con mayor enrique-

cimiento de Pd ζ se concentraron, se les añadió 20 % glicerol y se almacenaron a -70 °C.

3.2.8. Purificación de PdF₁

Para realizar la purificación de Fracción F₁ de la F₁F₀-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* (PdF₁), se utilizó la cepa *E. coli* DK8 transformadas con el plásmido de expresión pPdF₁CC (+ atp12), el cual tiene clonados los genes de las subunidades α , β , γ , δ y ϵ de F₁ de *P. denitrificans*, además de la chaperona Atp12 [70]. La subunidad β tiene una cola de 10 histidinas en el extremo N-terminal. Esta cepa de *E. coli* no cuenta con el operón *unc*, por lo que no expresa su propia F₁F₀-ATP sintasa. Se inocularon 125 mL de medio 2xYT (16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) + AMP 150 μ g/mL con las células *E. coli* DK8 transformadas y se incubaron toda la noche en agitación a 37 °C. Después, se crecieron las bacterias en 5 L de medio 2xYT + AMP 150 μ g/mL hasta una OD₆₀₀ de 0.6, momento en el que se añadió IPTG hasta una concentración de 0.25 mM para inducir la expresión, incubándose durante la noche en agitación a 37 °C. Posteriormente, se cosecharon las células por centrifugación a 6,000 rpm durante 15 minutos y se lavaron con *buffer* A. Se resuspendieron las células en *buffer* APdF₁ (50 mM Tris pH 7.6, 100 mM KCl, 0.1 mM ADP, 15 % glicerol, 0.1 mM PMSF, cOmplete®). Se homogeneizaron con un Potter y se incubaron con 0.2 mg/mL de lisozima, 20 μ g/mL de DNasa I y 1 mM MgCl₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de 14 ciclos de sonicación en hielo de 30 segundos con 1 minuto de descanso. Se centrifugó a 45,000 rpm durante 1 hora a 25 °C. El sobrenadante se recuperó y se añadió 60 mM imidazol. La muestra se cargó en una columna HisTrap FF Crude 5 mL previamente equilibrada con 10 volúmenes de H₂O y 10 volúmenes de *buffer* APdF₁ + 60 mM imidazol + 350 mM NaCl. Para remover contaminantes, se lavó la columna con 10 volúmenes de *buffer* APdF₁ + 60 mM imidazol + 350 mM NaCl, y se eluyó la muestra con 15 mL de *buffer* APdF₁ + 350 mM imidazol + 350 mM NaCl. Las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE, y las que presentaron mayor concentración de PdF₁ se concentraron con un AmiconTM de 100 kDa. El concentrado resultante se llevó a 3 mL y se cargó en una columna de desalado Econo-Pac® 10DG (Bio-Rad) previamente equilibrada con 30 mL de H₂O y 30 mL de *buffer* APdF₁. La muestra desalada se volvió a concentrar en un AmiconTM de 100 kDa, se llevó a 20 % de glicerol y se añadió 1mM ATP. Se guardó a -70 °C.

3.2.9. Cuantificación de proteínas

Para conocer la concentración de las proteínas purificadas, se cuantificaron utilizando el método de Lowry-TCA [172, 173] y el ensayo de ácido bicinonínico con precipitación por TCA (BCA-TCA) [174, 175]. Para ambos métodos, se comenzó con una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) para remover interferencias con la cuantificación de proteínas. Se llevan las muestras de proteínas a cuantificar y la curva estándar de BSA (0-50 μg de BSA) a 1 mL y se añaden 100 μL de desoxicolato de sodio al 15 % y se incuban por 10 minutos. Después de agregan 100 μL de TCA 72 % y se incuban en hielo durante 10 minutos. Las muestras se centrifugan durante 15 minutos a 14,000 rpm. Se descarta completamente el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 100 μL de H_2O + 2.5 μL de NaOH 2 N. Para la cuantificación con el método de Lowry, se agrega a cada muestra 1 mL de solución de Lowry A:B 50:1 (Lowry A: 2 % NaCO_3 , Lowry B: 1 % CuSO_4 , 2 % tartrato de Na y K en NaOH 0.1 N). Se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agregan 100 μL de una dilución 1:1 del reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu: H_2O . Se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 660 nm.

En el caso del ensayo con BCA, a las muestras ya precipitadas y resuspendidas se agregan 900 μL de la mezcla de reacción BCA A:B 50:1 (BCA A: 1 % ácido bicinonínico, 2 % NaCO_3 , 0.16 % tartrato de Na, 0.4 % NaOH, 0.95 % NaHCO_3 , pH 11.25 ajustado con 50 % NaOH o NaHCO_3 sólido; BCA B: 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$). Se incuban a 37 °C durante 30 minutos y se mide la absorbancia a 562 nm.

Una vez medidas las muestras y la curva estándar, se grafican los datos de esta última y por medio de una regresión lineal se calcula la concentración de proteína de las muestras interpolando sus absorbancias a partir de la ecuación de la recta obtenida de la regresión lineal.

3.2.10. Ensayos de actividad de hidrólisis de ATP en medio regenerante

Para medir la actividad de hidrólisis de ATP de la PdF_1 , se utilizó el protocolo reportado en [176]. En este ensayo, se acopla la hidrólisis de ATP causado por la PdF_1 con la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato por la enzima Piruvato cinasa (PK), regenerando así el ATP y manteniendo su concentración constante. Al mismo tiempo, el piruvato formado es utilizado por la lactato deshidrogenasa (LDH) para producir lactato, oxidando al NADH en el proceso, permitiéndonos seguir la reacción midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm causada por la oxidación de NADH a NAD^+ .

Mientras el sistema se mantenga en estado estacionario, la cantidad de ATP hidrolizado será proporcional a la cantidad de NADH oxidado.

Antes de llevar a cabo el ensayo, se reconstituyeron 5 µg de PdF₁ en *buffer* de reconstitución (250 mM sacarosa, 20 mM Tris pH 7.5), adicionado con 1 mM ATP y 1 mM MgCl₂, con diferentes concentraciones de PdζWT y mutantes (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 35 µM) en un volumen final de 50 µL durante 10 minutos. Para las pruebas con diferentes concentraciones de ATP, se reconstituyeron en la concentración de ATP correspondiente (1, 3, 5 y 10 mM ATP). Después de la incubación, se inició la reacción de hidrólisis de ATP agregando los 50 µL reconstituidos a 950 µL de mezcla de reacción (250 mM sacarosa, 50 mM Tris-acetato pH 8.0, 3 mM MgCl₂, 30 mM acetato de K, 1.5 mM PEP, 3 mM ATP, 200 µM NADH, 4 U/mL PK, 4 U/mL LDH, 0.15 % LDAO) en una celda de plástico. La concentración de ATP en la mezcla de reacción se ajustó según las condiciones del experimento (1, 3, 5 y 10 mM ATP) cuando fuera necesario. Se siguió la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos. Se calcula el cambio en la absorbancia por minuto (ΔAU/min) en la parte lineal de la reacción (V_{max}). La actividad de hidrólisis de ATP (actividad específica de la PdF₁) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mg}} = \frac{\Delta\text{AU}/\text{min}}{6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} * \text{mg PdF1}} \quad (3.1)$$

Siendo 6.22 mM⁻¹cm⁻¹ el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm. Los resultados se ajustaron a un modelo de inhibición total no competitiva.

3.2.11. Proteólisis limitada

Con el fin de evaluar como la unión de ADP o ATP a PdζWT modifica su estabilidad, además de medir una K_d aparente según el efecto protector de los nucleótidos a la proteólisis, se llevaron a cabo experimentos de proteólisis limitada a diferentes concentraciones de nucleótidos (0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 40 y 60 mM). Utilizando 3 µg de Pdζ, se incubó por 9 minutos con 1 µg de tripsina en *buffer* 20 mM KH₂PO₄ pH 7.0. La reacción se detuvo con PMSF 10 mM y un baño de hielo. La proteólisis fue analizada por SDS-PAGE al 16 % de acrilamida.

3.2.12. Dicroísmo circular

Las mediciones de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de PdζWT y la mutante D75A se llevaron a cabo a una concentración de 0.161 mg/mL y 0.233 mg/mL respec-

tivamente, en un espectropolarímetro Chirascan™ de Applied Photophysics, con una celda de cuarzo con un paso de luz de 0.1 cm. Las muestras de las proteínas se filtraron y diluyeron en un amortiguador 25 mM de fosfatos a pH 8.0. Los resultados se expresan como la elipticidad media por residuo (*Mean Residue Ellipticity*, MRE) a una longitud de onda λ , dada por:

$$\text{MRE} = \frac{\text{MRW} * \theta_{\lambda}}{10 * d * c} \quad (3.2)$$

Donde MRW es el peso promedio por residuo de la proteína, θ_{λ} es la elipticidad observada (grados) a una longitud de onda λ , d es la distancia del paso de luz (cm) y c es la concentración de la proteína (mg/mL). Los espectros obtenidos representan en el promedio de tres mediciones.

4.

Resultados

4.1. Análisis de conservación en la subunidad ζ de α -proteobacterias

Se recuperaron 1000 secuencias en la búsqueda de homólogos de Pd ζ (DUF1476). El análisis de la conservación por posición en estas secuencias revela que la región más conservada de Pd ζ corresponde con el extremo N-terminal (residuos 1-19), en el cual se encuentra el dominio inhibitorio (Figura 4.1). También, en los residuos 23 al 39 se identificó otra región con relativamente alta conservación, destacando los residuos F23, R28, R29, N30, L32 y W36, todos presentes en la primer α -hélice (H1). Además, se encontraron más residuos con alta conservación en las α -hélices H2 y H3, de los cuales resaltan la Y51 en H2, así como V68, K71, D75 y L76 en H3. Por otro lado, se encontró un menor grado de conservación en el extremo C-terminal, especialmente en la α -hélice H4. En esta región, solo los residuos A96 y Q99 de *P. denitrificans* se mantuvieron altamente conservados, siendo A96 uno de los residuos más preservados en la familia DUF1476.

Cabe resaltar que, a excepción del dominio inhibitorio (N-terminal), las regiones con alta conservación se encuentran en las α -hélices de la subunidad ζ en solución, lo que sugiere que muchos de estos residuos juegan un papel estructural en la proteína. Adicionalmente, la mayoría de estos residuos se encuentran en la intercara de las cuatro α -hélices, orientados hacia el interior de la subunidad ζ .

4.2. Detección de cavidades

En ambas estructuras de Pd ζ (2LL0 y 2MDZ) se identificaron tres cavidades distintas (ver Figura 4.2). Aunque no estén ubicadas en las mismas posiciones en la proteína, se evidencia que éstas son equivalentes y que los cambios observados resultan de los cambios conformacionales que experimenta Pd ζ en presencia de ADP (2MDZ). Estas cavidades se encontraron en los 20 confórmeros disponibles para cada estructura.

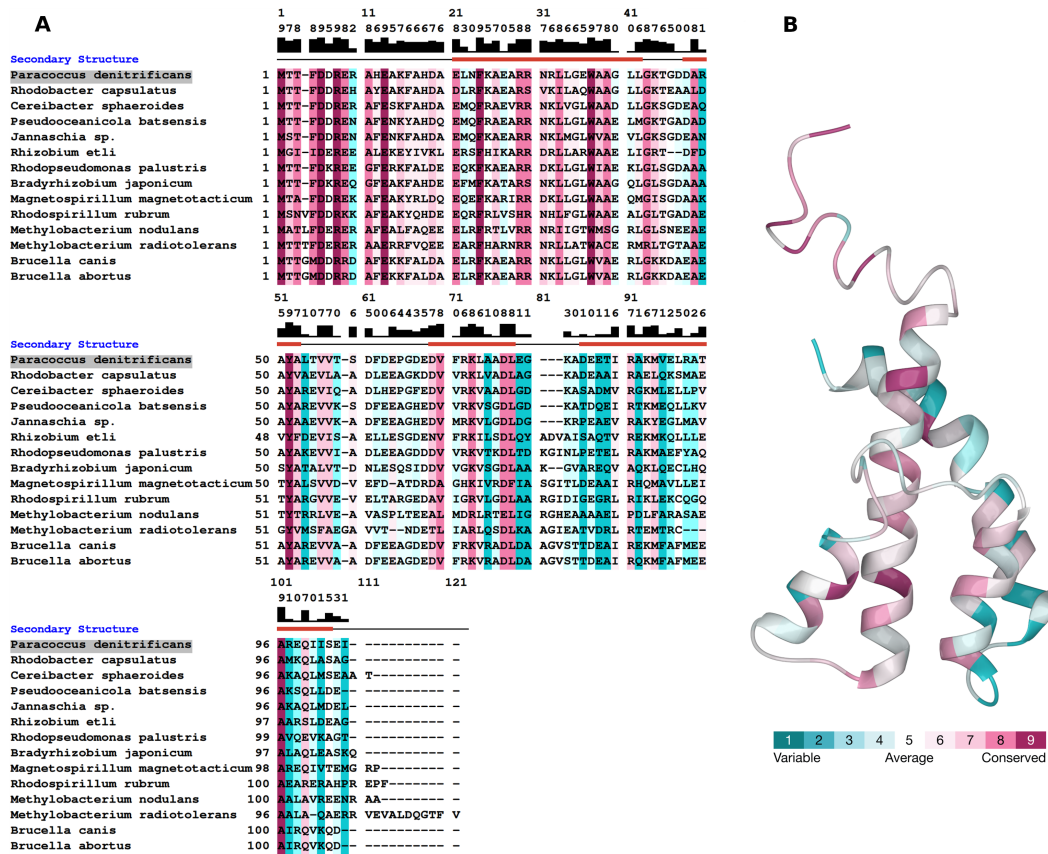


Figura 4.1. Análisis de la conservación por residuo en la subunidad ζ . **A)** Se seleccionaron 12 secuencias de las 1000 en total para la visualización. Los residuos más conservados se muestran en color magenta, mientras que los residuos más variables en cian. En la parte superior del alineamiento se representa la puntuación de conservación en cada posición, además de la estructura secundaria (hélices H1-H4 resaltadas en rojo) de la estructura de referencia (PDB 2LL0). **b)** Proyección de la puntuación de conservación en la subunidad ζ (PDB 2LL0)

La primera cavidad (color morado en la Figura 4.2) se localiza en la intercara de las cuatro α -hélices de ambas estructuras, y concuerda con la posición de los residuos altamente conservados en Pd ζ (Figura 4.1). En 2MDZ esta cavidad se desplaza debido a los cambios conformacionales que se producen. La siguiente cavidad (color verde en la Figura 4.2) se localizó entre las α -hélices H1 y H4, en la superficie de la proteína. La última cavidad detectada por FTSite (color rojo en la Figura 4.2) también se encontró en la superficie de Pd ζ . En este caso, está conformada por residuos entre las α -hélices H1 y H3.

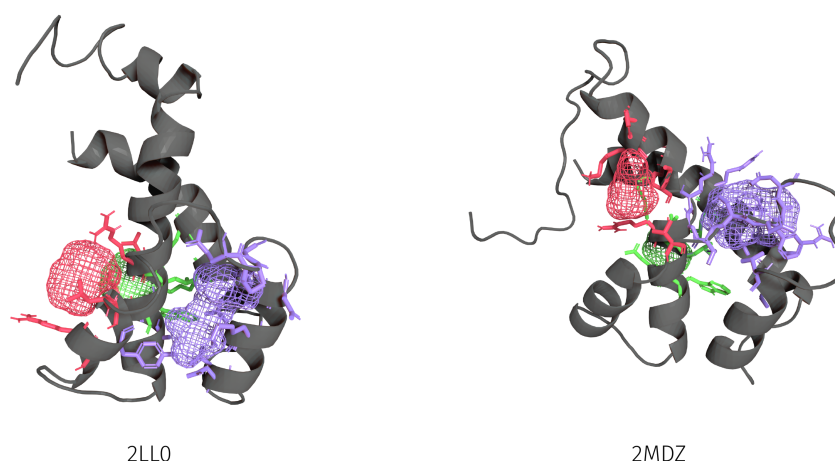


Figura 4.2. Resultados de la detección de cavidades. Para cada cavidad detectada se representan los residuos que la componen, los cuales se muestran en varillas de color de la cavidad.

4.3. Identificación del sitio de unión a nucleótidos en Pd ζ

Con el objetivo de identificar la región de unión de nucleótidos en Pd ζ , se realizaron análisis de *docking* ciego del ADP y ATP en los 20 conformeros disponibles en las estructuras 2LL0 y 2MDZ. La Figura 4.3 muestra las 10 mejores poses para cada sistema. Como se puede observar, las regiones donde el ADP y ATP se acoplaron coinciden con una de las cavidades previamente identificadas en ambas estructuras (cavidad morada en la Figura 4.2).

A partir de las 100 mejores poses obtenidas de cada *docking* ciego, se extrajo el *fingerprint* de la interacción del ADP y ATP con Pd ζ . En la Figura 4.4 se presentan los residuos que aparecieron en más del 30 % de las 2,000 mejores poses evaluadas para cada sistema. Se observa una mayor presencia de residuos involucrados en la interacción con nucleótidos en 2LL0 en comparación con 2MDZ. Para ambas estructura, las frecuencias de las interacción fueron similares entre ADP y ATP.

En el caso de 2LL0, los residuos con una frecuencia mayor al 30 % en las 2,000 poses analizadas incluyeron E26, R29, N30, V55, T57, S58, D59, E62, P63, G64, V68, K71 y R93 tanto para el ADP como el ATP. Respecto a 2MDZ, los residuos más frecuentes fueron R29, N30, V55, V56, T57, D59, F60 con el ADP, y con ATP fueron A27, R29, N30, R31, V56, T57, F60. Entre los cuatro sistemas se encontraron cuatro residuos comunes: R29, N30, D59 y T57.

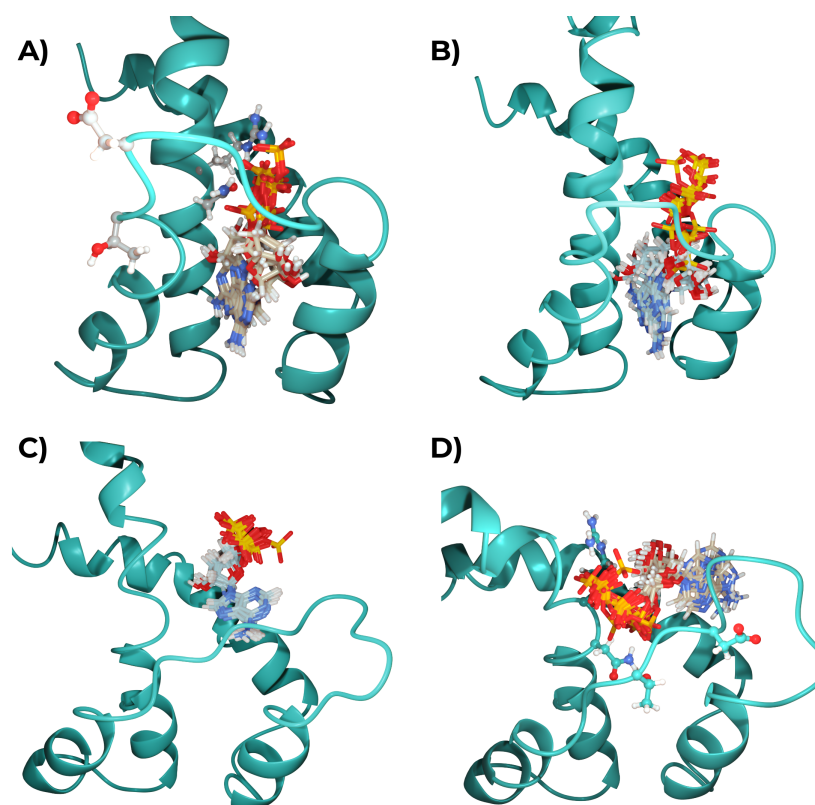


Figura 4.3. Mejores 10 poses resultantes del *docking* ciego con FRED. **A)** 2LL0 + **ADP**. **B)** 2LL0 + **ATP**. **C)** 2MDZ + **ADP**. **D)** 2MDZ + **ATP**.

4.4. Docking refinado (Local)

Se llevo a cabo un *docking* local mediante los programas FRED y Vina para refinar las interacciones del **ADP** y **ATP** en el sitio de unión. Al igual que con FRED, se ejecutó el acoplamiento local en los 20 conformeros de 2LL0 y 2MDZ. La Figura 4.5 muestra la comparación entre las mejores poses obtenidas por FRED (en amarillo) y Vina (en rosa). Es importante señalar que, en todos los casos, las conformaciones resultantes de los acoplamientos son semejantes empleando ambos programas, aún cuando las energías (puntuaciones del *docking*) fueron mejores en FRED (Tabla 4.1). Este comportamiento se evidencia tanto al considerar el promedio de las mejores puntuaciones para cada uno de los 20 conformeros como al evaluar exclusivamente a la mejor pose en cada programa.

En cuanto a los resultados de Vina, las puntuaciones fueron más favorables en las interacciones con 2MDZ en comparación con las de 2LL0, con una diferencia de 0.6 kcal/mol para el **ADP** y de 0.9 kcal/mol para el **ATP**.

En relación a los contactos detallados en la Tabla 4.1, los residuos R29, N30, L33, G64, D65 y R93 establecieron interacciones con el **ADP** y **ATP** en 2LL0. Además, con el **ATP**

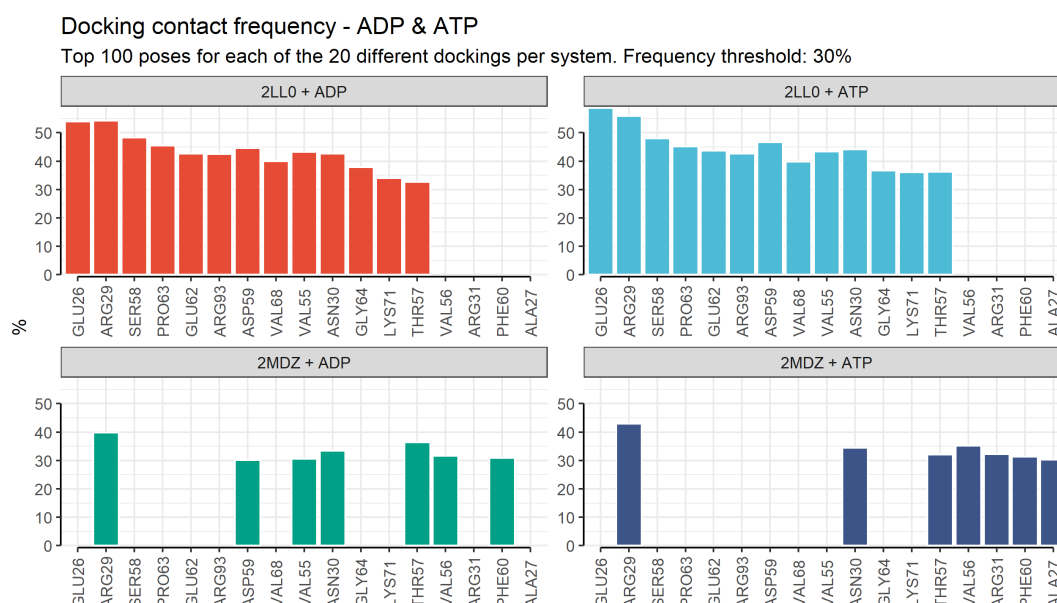


Figura 4.4. Fingerprint del docking ciego de Pd ζ con ADP y ATP obtenido de las 2,000 mejores poses de FRED para cada sistema.

se observaron más contactos con R29, lo cual se atribuye a un puente salino adicional debido al fosfato extra. Por otro lado, en 2MDZ, los residuos E26, R29, N30, S58, D59, F60 y D61 presentaron interacciones con ambos nucleótidos. Además, los contactos con R29 y N30 se conservaron en todos los sistemas, lo que concuerda con el patrón de interacción observado en el *docking* ciego.

De los contactos identificados entre 2LL0 y el ADP y ATP en Vina, se encontró que R29, N30, G64 y R93 coincidieron con el *docking* ciego. Por su parte, en 2MDZ y con el ADP, los residuos encontrados en ambos análisis fueron R29, N30, T57, D59 y F60; mientras que con el ATP se perdió el contacto con T57 y se mantuvieron todos los demás.

4.5. Fingerprint en MD

Además de los resultados del *docking*, también se generó el perfil de la interacción entre Pd ζ y los nucleótidos a lo largo de los 100 ns de MD por duplicado y pHMD a pH 7.0 (Figura A.1). Ambas metodologías reprodujeron el fenómeno observado en el *docking*: la firma de los contactos entre el ADP y ATP son similares para cada estructura (2LL0 y 2MDZ); sin embargo, varían entre las distintas conformaciones. Los residuos que se mantuvieron conservados entre los cuatro sistemas durante las simulaciones de MD fueron la R29, N30, G64, D65 y R93. En las simulaciones pHMD, los residuos conservados incluyeron R29, N30, L33, V55, P63, D65 y R93. Estos hallazgos concuerdan con los

Mejores puntuaciones del *docking* local con FRED y Vina (kcal/mol)

Sistema	Promedio FRED*	Promedio Vina*	FRED	Vina	Contactos (Vina)
2LL0+ADP	-8,05±1,71	-6,06±1,22	-9,70	-7,10	R29 ^β , R29 ^β , N30 ^α , L33 ^{αγ} , G64 ^{αγ} , D65 ^{αγ} , R93 ^β
2LL0+ATP	-6,98±1,47	-5,96±1,68	-11,65	-6,9	R29 ^β , R29 ^β , R29 ^β , N30 ^α , L33 ^{αγ} , D61 ^α , D61 ^α , G64 ^{αγ} , D65 ^{αγ} , R93 ^β
2MDZ+ADP	-7,02±0,89	-5,86±0,65	-8,23	-7,70	E26 ^{αγ} , R29 ^α , R29 ^{αγ} , N30 ^α , N30 ^{αγ} , T57 ^{αγ} , S58 ^α , S58 ^α , D59 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^{αγ}
2MDZ+ATP	-6,71±1,47	-5,97±0,75	-8,13	-7,80	E26 ^{αγ} , R29 ^{αγ} , R29 ^β , N30 ^α , N30 ^{αγ} , S58 ^α , D59 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^{αγ} , E62 ^α

*Promedio ± s.d. ^αPuente de hidrógeno. ^βPuente salino. ^γContacto con el *backbone*.

Tabla 4.1. Comparación de los resultados del *docking* refinado con FRED (Chemgauss4) y Vina. Se muestran los contactos del correspondiente nucleótido con Pdζ obtenidos del acoplamiento Vina, calculados con PLIP. Todas las puntuaciones se presentan en kcal/mol.

resultados derivados del refinamiento del *docking* con Vina, con especial énfasis en los residuos R29 y N30, los cuales mostraron las interacciones más frecuentes durante las simulaciones.

Al comparar los contactos más frecuentes entre las simulaciones de MD y pHMD, se observan diferencias menores entre las metodologías, ya que se mantiene un patrón de contactos similar en ambas, que a su vez concuerdan con la firma de contactos encontrada en los acoplamientos moleculares (Figura 4.4, Tabla 4.1). Destaca un aumento en las frecuencias de contactos con residuos que presentan cadenas laterales protonables durante las simulaciones pHMD (lisina, glutamato y aspartato), lo cual se atribuye a una mejora en el tratamiento de la protonación en este tipo de simulaciones.

El cambio en la interacción entre estructuras de Pdζ con los nucleótidos es resultado de modificaciones en el sitio de unión. Las simulaciones revelaron que el ATP se desplaza de su posición original y termina en la región observada en los resultados de acoplamiento con 2MDZ. Sin embargo, la conformación mostrada en 2MDZ no se logró alcanzar a partir de 2LL0, ni con ninguno de los dos nucleótidos.

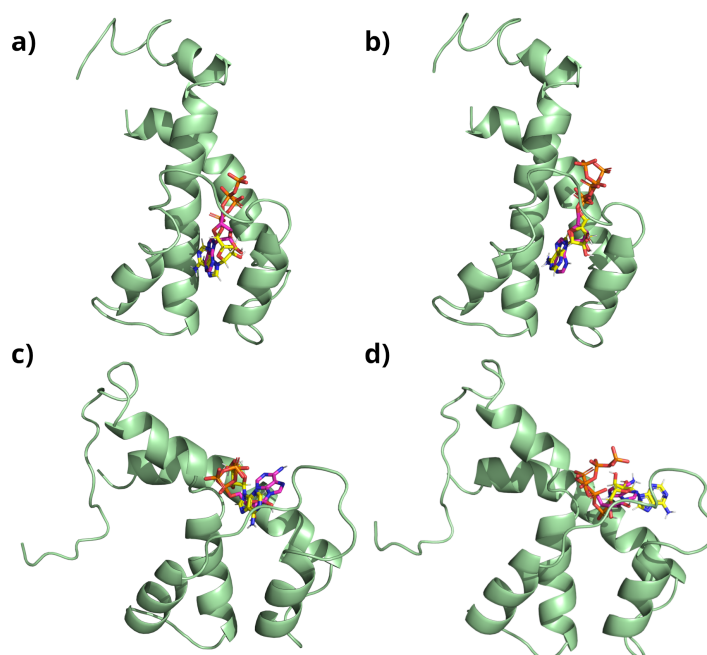


Figura 4.5. Comparación de las mejores poses del *docking* para cada sistema utilizando FRED (amarillo) y Vina (rosa). Las figuras **a)** y **b)** corresponden al acoplamiento de la estructura 2LL0 con ADP y ATP, respectivamente. textbfc) y **d)** corresponden 2MDZ con ADP y ATP, respectivamente

4.6. Dinámica molecular

Se calculó el **RMSD** de los C α en comparación con la estructura inicial en las réplicas de las simulaciones de **MD** (Figura 4.6a). En las simulaciones en 2LL0, el **RMSD** en presencia de **ADP** no mostró diferencias respecto a la simulación sin nucleótidos (APO), convergiendo ambos en 5 Å. Por otro lado, en presencia de **ATP** se encontró mayor movilidad durante ambas simulaciones, llegando incluso hasta un **RMSD** de 10 Å. En cuanto a 2MDZ, los tres sistemas presentan un comportamiento similar, estabilizándose en un **RMSD** de 10 Å. Es interesante destacar que la simulación con **ADP** en 2MDZ alcanzó el equilibrio a partir de los 25 ns, posiblemente debido a que esta estructura se resolvió en presencia del mismo nucleótido (**ADP**), lo cual es coherente con los hallazgos del *docking*.

Con el propósito de explorar cómo la presencia de los nucleótidos podría afectar el **área superficial (AS)** de Pd ζ , ésta se calculó utilizando el método LCPO [177] (Figura 4.6b). En las simulaciones APO, se obtuvo un valor de **AS** alrededor de 8500 Å², mientras que con **ADP** se observó una ligera disminución en el **AS**, y en presencia de **ATP** se observaron diferencias más marcadas, con un incremento en el **AS** a más de 9000 Å². Este comportamiento es consistente en ambas estructuras. Es relevante mencionar

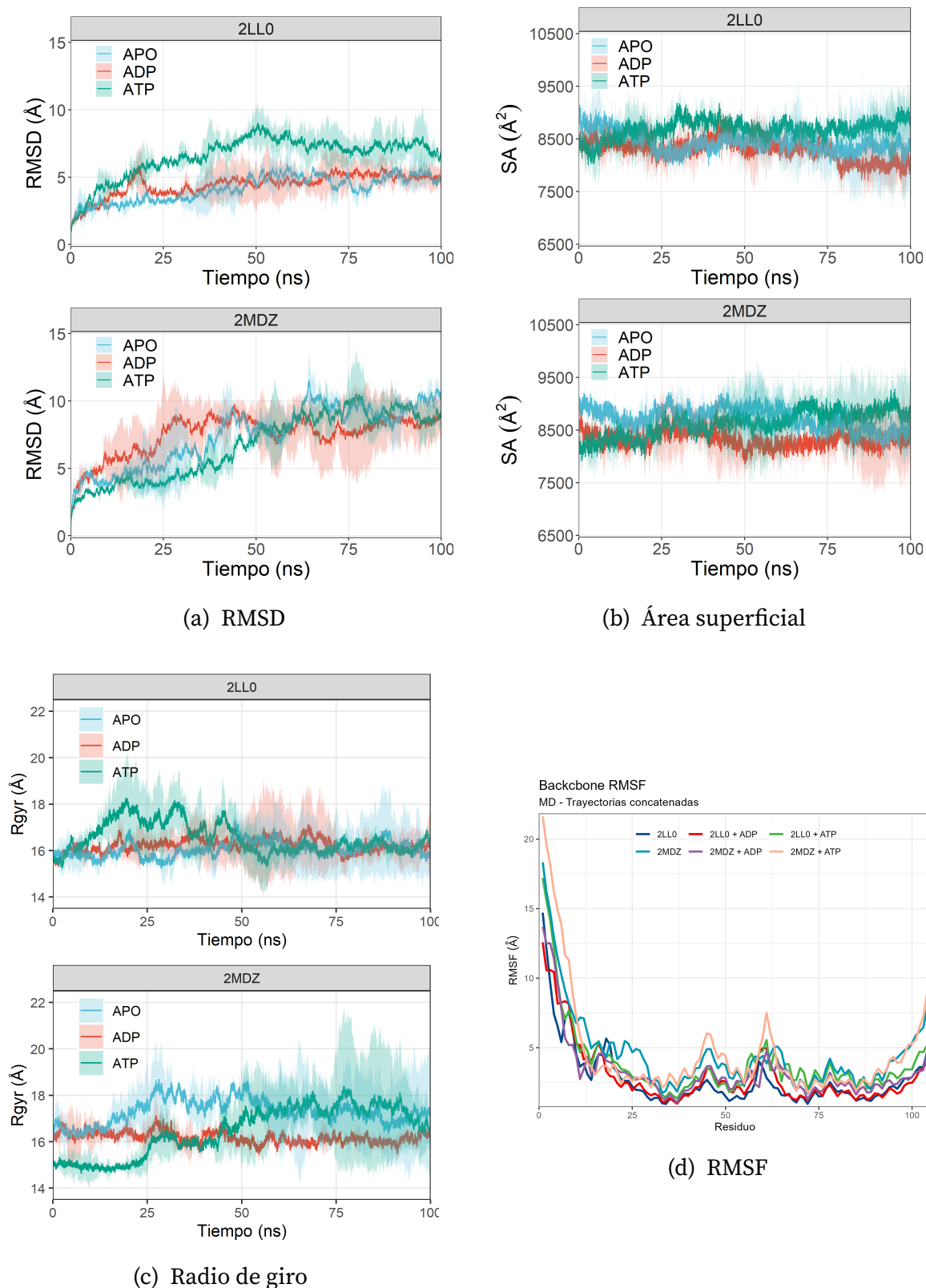


Figura 4.6. Análisis de las simulaciones de MD. En **a)**, **b)** y **c)** se muestra el promedio de las dos réplicas \pm la desviación estándar (área sombreada). Para **d)** se analizaron ambas réplicas concatenadas. **a)** Desviación cuadrática media (RMSD) de los C α . **b)** Área superficial calculada con el método LCPO [177]. **c)** Radio de giro de los C α . **d)** Fluctuación cuadrática media (RMSF) de ambas réplicas.

que el aumento observado con el **ATP** se correlaciona con la mayor movilidad presente en el **RMSD** en el caso de 2LL0.

Un análisis del **radio de giro (Rgyr)** mostró que la presencia de **ADP** genera menos variaciones en **Pd ζ** en comparación con las simulaciones APO y con **ATP** (Figura 4.6c). Con ambas estructuras, el **Rgyr** con **ADP** se mantuvo estable alrededor de 16 Å. En presencia de **ATP** se observaron más diferencias, con múltiples eventos de compactación/expansión durante las simulaciones. Con 2LL0, el comportamiento fue más regular entre los sistemas, convergiendo alrededor de 16 Å en los últimos 50 ns de simulación. Por otro lado, con 2MDZ las simulaciones APO y **ATP** presentaron más cambios. Notablemente, con esta estructura, el **Rgyr** con **ADP** mostró una dispersión menor entre las réplicas de las simulaciones de MD y una mayor estabilidad.

Con el objetivo de explorar la movilidad por residuo a lo largo de las simulaciones, se calculó el **RMSF** por residuo de las réplicas concatenadas (Figura 4.6d). La región más móvil coincidió con el extremo N-terminal (residuos 1-19), el cual se encuentra intrínsecamente desordenado. Además, se identificaron dos regiones de mayor movilidad en los *loops* entre las α -hélices H1 y H2, entre H2 y H3. En contraste, las menores fluctuaciones se dan en el motivo mencionado en el análisis de secuencias (Figura 4.1), RRNRL, correspondientes a los residuos 28-33. En las simulaciones con 2LL0, se encontraron menores fluctuaciones en ausencia de ligandos. En los primeros 60 aminoácidos, tanto el **ADP** como el **ATP** generaron cambios similares en el **RMSF** con ligeros incrementos respecto a la simulación APO. En los residuos restantes, que corresponden a las hélices H3 y H4, el **ATP** causó mayores fluctuaciones. Entonces, los cambios observados por el **ATP** en 2LL0 en el **RMSD**, **AS** y **Rgyr** son generados por cambios en la dinámica de esta región de la proteína. Los resultados en 2MDZ presentaron mayores variaciones en comparación con 2LL0. Es importante resaltar que la simulación 2MDZ + **ADP** tuvo un **RMSF** similar al encontrado en 2LL0 + **ADP**, y fue menor que en APO y **ATP**. Entre estas dos últimas, el **ATP** generó mayores fluctuaciones estructurales en 2MDZ. En la región de los residuos 28-33, correspondientes a la región con menos movilidad, 2MDZ APO y **ATP** mostraron reorganizaciones del sitio de unión a nucleótidos, lo que incrementó el **RMSF**. La presencia del **ADP**, por el contrario, favoreció las interacciones ya encontradas en esta región, evitando la reorganización del sitio de unión. Estos resultados en el **RMSF** explican las diferencias en las otras variables colectivas analizadas y, al mismo tiempo, demuestran como la unión de los nucleótidos en el sitio identificado en el *docking*, modifica la dinámica conformacional de la subunidad ζ , como se verá a continuación.

Respecto a la estructura secundaria durante las simulaciones, en todas se mantiene relativamente constante el porcentaje de hélices en la estructura (Figura D.1). Los principales cambios se dieron entre los giros y la estructura desordenada. A pesar de esto,

con el **ATP** se evidenciaron mayores fluctuaciones en los porcentajes de estructura secundaria con 2MDZ, en consonancia con el comportamiento observado en las otras coordenadas de reacción. Además, es importante destacar que las simulaciones de 100 ns no permitieron reproducir los cambios conformacionales de 2LL0 a 2MDZ en presencia de nucleótidos. A pesar de esto, en las simulaciones con **ATP** se observó el movimiento de bisagra en los residuos R28, R29 y N30 encontrado en 2MDZ.

Con el fin de evaluar si la presencia del **ADP** y **ATP** influye sobre los desplazamientos o fluctuaciones atómicas de **Pd ζ** , se calcularon los coeficientes de correlación cruzada por pares para los C α de ambas estructuras, generando así un mapa dinámico de correlación cruzada para cada simulación (Figura 4.7). En el caso de las simulaciones con 2LL0, se observó que la presencia del **ADP** incrementó ligeramente la correlación entre los residuos 20 a 54, al mismo tiempo que disminuyó las interacciones entre las hélices H1 y H4, lo que sugiere que el **ADP** favorece las interacciones locales en el sitio de unión. En cambio, en presencia de **ATP** se desacoplaron los movimientos entre los residuos 20 a 54, causando un incremento en la correlación de la α -hélice H1 y favoreciendo la correlación de esta hélice con el extremo C-terminal (H4). También se observó una alta correlación entre las hélices H3 y H4, posiblemente causada por nuevas interacciones fuera del sitio de unión debidas a la presencia del **ATP**.

En el caso de 2MDZ, el mapa de correlación de la simulación APO fue similar al de 2LL0, mostrando una mayor correlación entre las hélices H1 y H4. En presencia de **ADP**, el mapa de correlación fue semejante al encontrado sin nucleótidos, y a su vez parecido al mostrado en 2LL0 + APD. Además, se notó la misma disminución en la correlación entre H1 y H4. Con el **ATP**, se evidenció un aumento en la correlación de las hélices H3 y H4 (residuos 20 a 54), así como la disminución de la anti-correlación de esta región con el resto de la proteína, excepto con el extremo N-terminal, donde se vio intensificada.

Estos cambios en el patrón de desplazamientos atómicos de **Pd ζ** inducidos por la unión de los nucleótidos demuestran que a pesar de que el *fingerprint* de la interacción entre **ADP** y **ATP** parezca similar, cada ligando afecta de manera distinta la dinámica conformacional de **Pd ζ** . Aparentemente, la unión de los nucleótidos genera modificaciones en las interacciones de H1 y H4, disminuyendo la correlación de los movimientos de éstas en presencia de **ADP**, e incrementándola con el **ATP**. Además, el **ATP** favorece la interacción de H3 y H4, mientras que el **ADP** lo hace entre H1 y H2. Estos cambios en las interacciones de las estructuras secundarias podrían guiar los cambios conformacionales inducidos por los nucleótidos. También, las alteraciones en la correlación en el extremo C-terminal explican las diferencias en el **RMSF** cuando se unieron los nucleótidos.

Un análisis de clusters de residuos hidrófobos para 2LL0 y 2MDZ (Figura ??), mostró

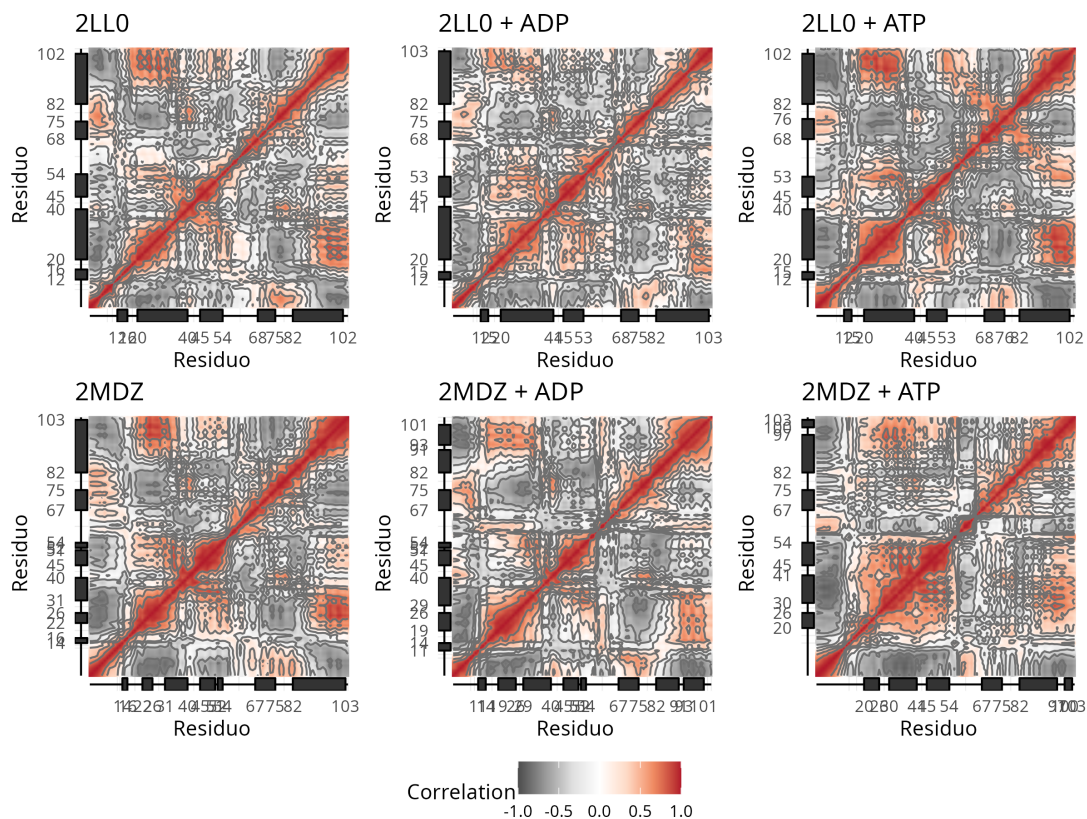


Figura 4.7. Correlación cruzada por residuo. Un valor de 1 (rojo) significa que las fluctuaciones de los C α de 2 residuos están completamente correlacionadas, mientras que -1 (gris) indica que las fluctuaciones están completamente anti-correlacionadas, 0 indica que no hay correlación entre el par de residuos. El contorno se gráfica cada 0.25 en la correlación. Sobre los ejes está representada la estructura secundaria promedio de Pd ζ durante la simulación. Las cajas negras representan a las α -hélices.

que las regiones hidrófobas de Pd ζ se encuentran entre las hélices H1 y H4, y entre H1, H3 y H4. Sin embargo, en 2MDZ las interacciones hidrófobas entre H1 y H4 desaparecen. Los resultados del análisis de correlación cruzada indican que los nucleótidos modifican las interacciones de las hélices donde se establece el núcleo hidrófobo, lo que sugiere que los cambios conformacionales inducidos por la unión del ADP/ATP son generados por reorganizaciones en el *core* hidrófobo de Pd ζ .

Adicionalmente, para estimar la energía libre de unión del ADP con Pd ζ , se aplicó el método MM/PBSA. Se calculó una energía libre de unión $\Delta G_{\text{ADP}} = -1.06$ kcal/mol. Este método nos permite conocer las principales contribuciones a la energía libre de unión, siendo las interacciones electrostáticas las más significativas en la interacción con los nucleótidos. Al descomponer la interacción por residuo para comprender la contribución de cada uno a la afinidad, se encontró que los residuos que más contribuyen a la interacción son R93, R29, N30, V68 y L33, en ese orden. R93 y R29 exhibieron una contribución cerca de 10 veces mayor que los otros residuos mencionados.

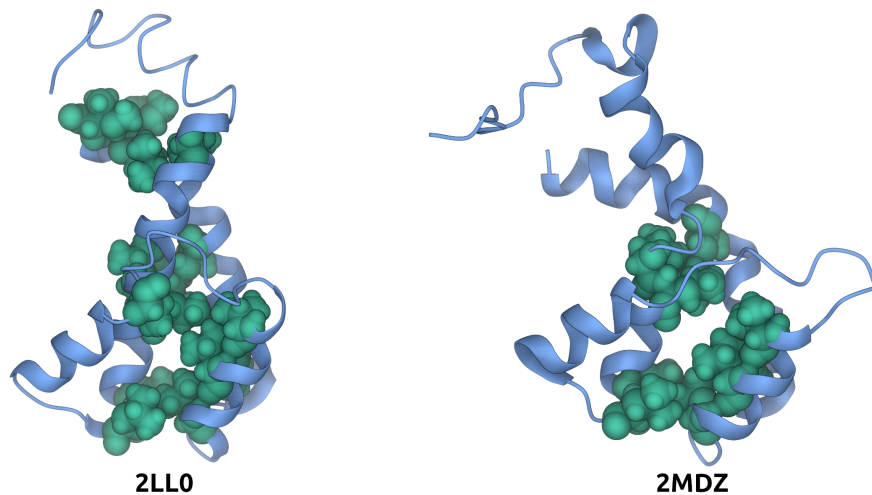


Figura 4.8. Representación en esferas de los cúmulos de residuos hidrófobos en 2LL0 y 2MDZ.

Cabe resaltar que todos estos residuos habían sido previamente identificados como importantes en el *fingerprint* del *docking* y las simulaciones de MD y pHMD. Además, se evaluaron los residuos que perjudican a la interacción con los nucleótidos, siendo E62 y D75 los residuos que contribuyen negativamente a la interacción.

4.7. Efecto de las mutaciones sobre Pd ζ

Con base en los resultados anteriores, se seleccionaron las siguientes mutantes puntuales de Pd ζ para un análisis más detallado: R29A, N30A, T57K, E62R y D75A, además de la doble mutante N30A/E62R (las posiciones de los residuos mutados se pueden encontrar en la Figura F.1). Estas mutaciones se realizaron *in silico* tanto en 2LL0 como en 2MDZ, y posteriormente se llevaron a cabo estudios de *docking* y MD tanto en ausencia de nucleótidos como en presencia de ADP y ATP.

Con el objetivo de evaluar las posibles modificaciones en las interacciones entre ADP y ATP con las diferentes mutantes, se realizaron experimentos de *docking* utilizando Vina para cada una de ellas. Los resultados de estos acoplamientos en 2LL0 se presentan en la Tabla C.1, donde se observa que, en términos generales, las diferencias en las puntuaciones de las mutantes respecto a Pd ζ son relativamente pequeñas. Sin embargo, destacan los casos de las mutantes N30A/E62R, E62R y T57K, donde las dos primeras muestran una disminución en la afinidad, mientras que la tercera incrementa ligeramente la misma.

Las diferencias más notables se observaron en los contactos con los nucleótidos en las diversas mutantes (el patrón de la interacción). Por ejemplo, en R29A se pierden los

puentes salinos con los grupos fosfato, aunque se mantienen los puentes de hidrógeno con el resto del nucleótido. La sustitución de la arginina en la posición 29 por alanina provoca la orientación de los fosfatos hacia el exterior de la proteína, lo que elimina las interacciones en los residuos R29 y N30, que son relevantes para los cambios conformacionales inducidos por la unión de nucleótidos en Pd ζ . En cambio, la mutación N30A mantiene los puentes salinos con R29 y además establece nuevos contactos con la lisina K71, lo que compensa las interacciones perdidas debido a la mutación. Esto evita que la orientación de los fosfatos no cambie en relación con la forma silvestre. En el caso de la doble mutante N30A/E62R, la introducción de una arginina en el sitio de unión ocasiona un desplazamiento en las posiciones de los nucleótidos, lo que da lugar a modificaciones en los contactos. En presencia de ADP, aparecieron nuevos puentes salinos con la arginina introducida (E62R), mientras que con ATP se forma un puente de hidrógeno con este mismo residuo. Además, las interacciones ahora involucran a los residuos del asa entre las hélices H2 y H3.

T57K también induce cambios en el patrón de contactos de los fosfatos, afectando las interacciones con R29. Para E62R, se establecen contactos con la arginina introducida, aunque se mantienen los puentes salinos con R29 en el caso de ATP. Con ambos nucleótidos, las interacciones ahora involucran al mismo *loop* presente en la doble mutante. Esto sugiere que los efectos observados en la doble mutante son principalmente causados por la mutación E62R.

Los resultados de las mutantes en 2MDZ se presentan en la Tabla C.2. En general, las mutaciones conservan los mismos contactos que en Pd ζ WT, aunque con afinidades menores. A excepción de la mutante R29A, donde los puentes salinos con la arginina se pierden debido a la falta de la cadena lateral, en todas las otras mutantes esta interacción se conservó, lo que sugiere que este contacto es crucial para la interacción en el contexto de 2MDZ. Asimismo, las mutantes no generaron cambios en la orientación de los nucleótidos respecto al sitio de unión. Es por esto que las interacciones son similares entre las mutantes y Pd ζ .

Para el análisis de las simulaciones de MD, se calculó el RMSD y el RMSF durante los 100 ns de simulación para cada mutante (Figura 4.9) con el fin de evaluar si las mutaciones modeladas generan efectos en la conformación de la subunidad ζ (Figura 4.9). En las simulaciones de 2LL0 APO, el RMSD presentó un comportamiento similar respecto en todas las mutantes respecto a la estructura silvestre, con incrementos temporales en la primera mitad de la simulación para las mutantes E62R y T57K. Al analizar el RMSF de estas mutantes, se observa que solo la mutante T57K muestra cambios en las fluctuaciones, incrementando la movilidad en el asa entre H2 y H3, donde se ubica la mutación. También, la mutante D75A presentó incrementos leves en el RMSD y en RMSF, particularmente entre los residuos 40 a 50, correspondientes a la α -hélice

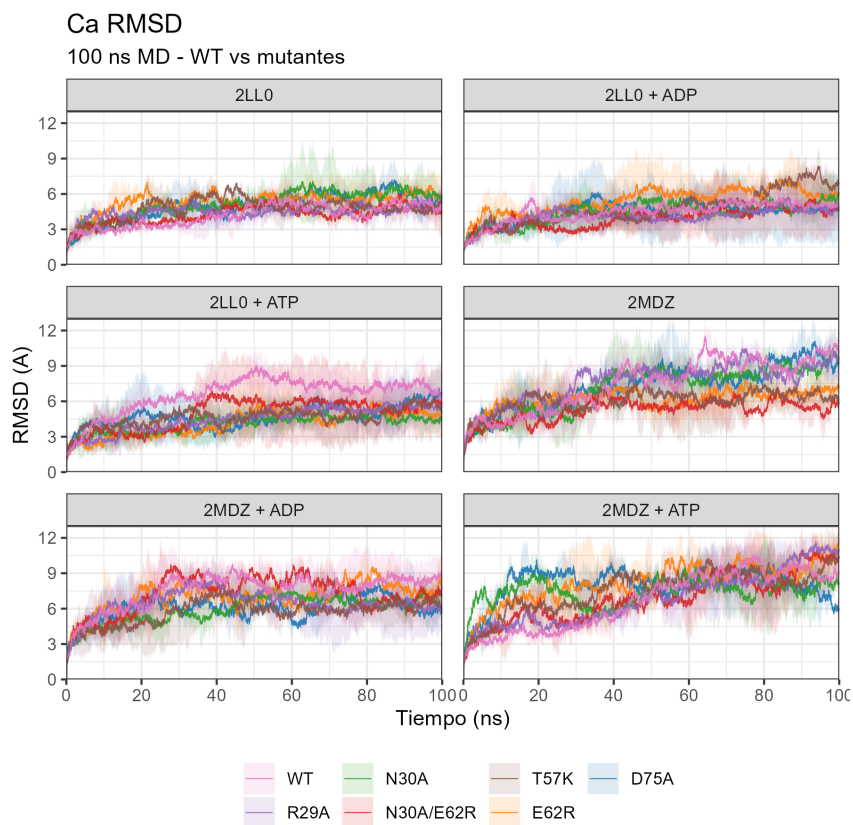
H2. Estos resultados indican que las mutaciones realizadas no alteran la estructura de la Pd ζ . En líneas generales, se observa que las mutaciones no han tenido un impacto significativo en la estructura.

En las simulaciones con 2MDZ, se observaron las diferencias más notables entre las mutantes y la Pd ζ WT. Específicamente, las mutantes T57K y E62R mostraron una disminución en el RMSD en comparación con la estructura silvestre. Por otro lado, la mutante D75A fue la única que presentó mayor flexibilidad estructural. Al analizar el RMSF, se observó que todas las mutantes excepto D75A redujeron las fluctuaciones estructurales durante las simulaciones. De manera similar a lo observado en 2LL0, la mutante D75A indujo una mayor flexibilidad en las hélices H2 y H3.

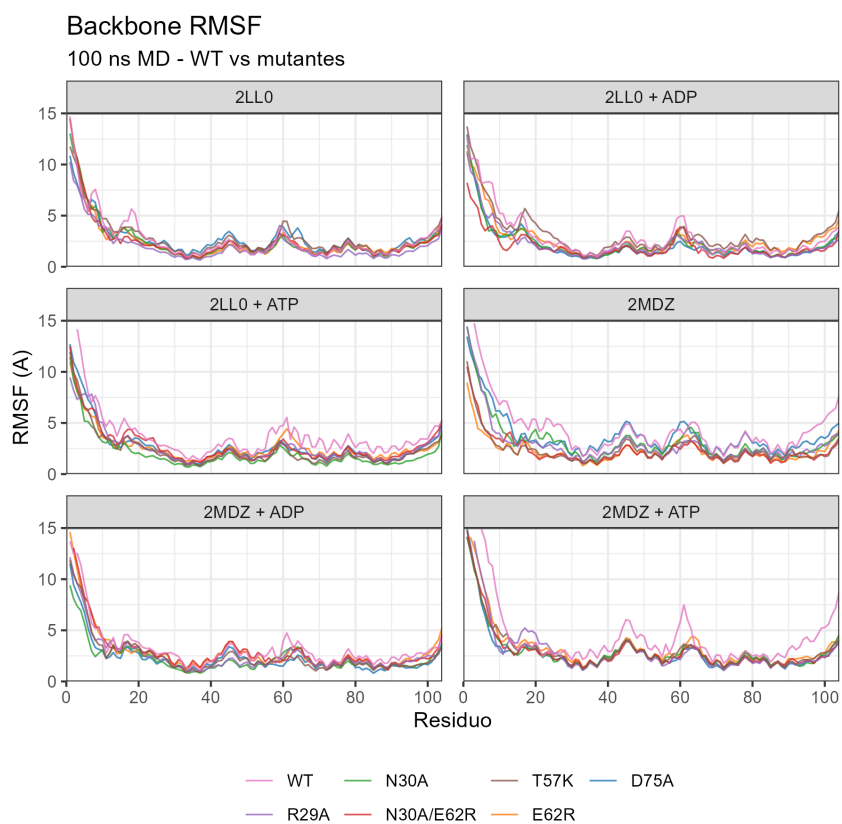
En el contexto de las mutantes R29A, N30A, T57K y D75A, en presencia de ADP se apreció un incremento en el RMSD en las mutantes D75A y T57K, mientras que en el RMSF se mantuvieron por debajo de los valores de la Pd ζ WT. Sin embargo, T57K mostró una mayor flexibilidad a partir del residuo 60. La mutante N30A presentó un comportamiento similar a la silvestre en presencia de ADP, mientras que en R29A se observó una ligera disminución en los movimientos. En relación al ATP en 2LL0, todas las mutantes mostraron una reducción en la flexibilidad estructural en comparación con la Pd ζ WT. Por otro lado, en 2MDZ, el RMSD al final de las simulaciones fue comparable al de la Pd ζ WT, pero en las mutantes N30A, T57K y D75A se observó un aumento acelerado en los primeros 20 ns de simulación.

En todos los sistemas simulados, la mutante que exhibió mayor semejanza con la Pd ζ WT fue R29A. La falta de modificación en la dinámica conformacional de Pd ζ en estas simulaciones, junto con la alta conservación de este residuo, respalda la idea de que su función estructural en la proteína es limitada, y que su principal rol está dirigido hacia la unión de los nucleótidos, lo cual concuerda con los resultados del análisis de *fingerprint*.

Un análisis más profundo de la mutante D75A reveló que esta mutación ocasiona la pérdida de la interacción entre dicho residuo y Y51 (Figura 4.10), dos de los residuos más conservados en todas las subunidades ζ de α -proteobacterias (Figura 4.1). La ausencia de esta interacción conservada incrementa la movilidad en toda la proteína, específicamente entre las hélices H2 y H3 (Figura 4.9b).



(a) RMSD



(b) RMSF

Figura 4.9. RMSD y RMSF de las simulaciones Pd ζ mutantes.

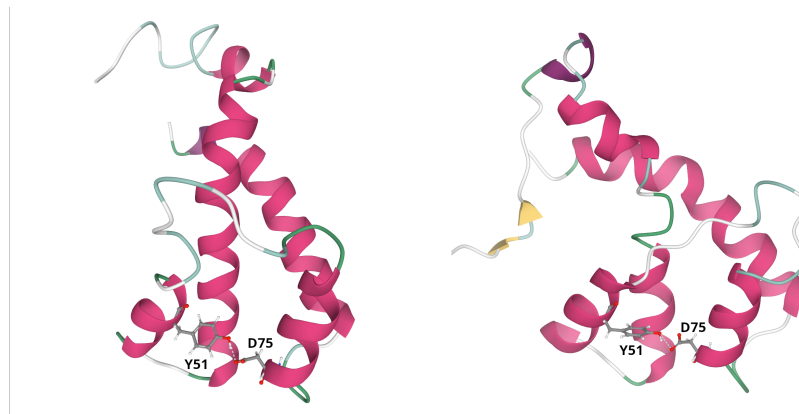


Figura 4.10. Puente de hidrógeno entre Y51 y D75 en 2LL0 (izquierda) y 2MDZ (derecha).

4.8. Efecto del pH en Pd ζ

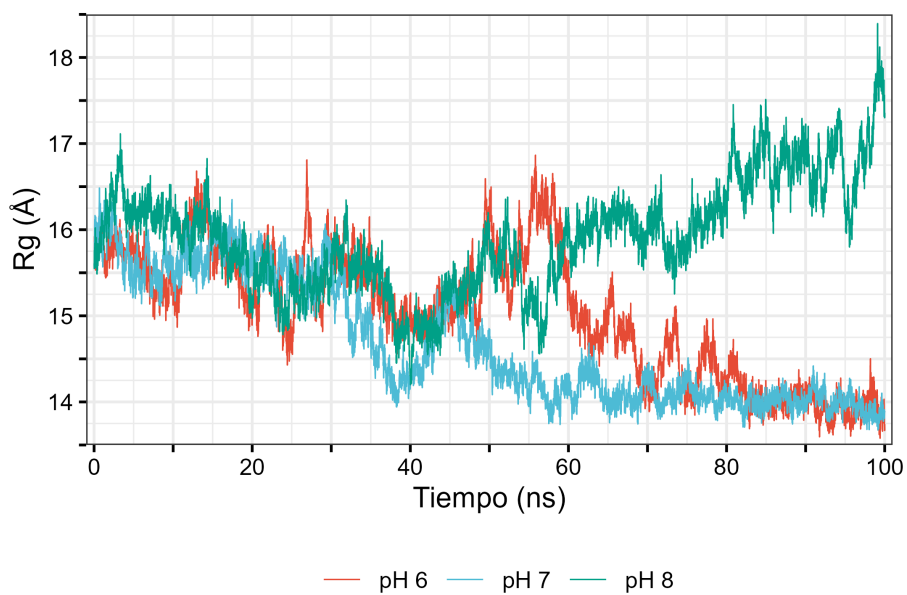
Para investigar la influencia del pH en la estructura de Pd ζ , se realizaron simulaciones de pHMD en el sistema 2LL0 a pH 6.0, 7.0 y 8.0. El análisis del RMSD completo de Pd ζ (Figura 4.11b) mostró bastante similitud entre los tres valores de pH. Sin embargo, al enfocarnos exclusivamente en la parte globular de la proteína (residuos 20-104), se hizo evidente que la simulación a pH 8.0 exhibió un ligero incremento en el RMSD en comparación con los otros dos, indicando una mayor flexibilidad estructural a este pH.

Al analizar el Rgyr durante las simulaciones a los 3 pH (Figura 4.11a) reveló diferencias significativas. En particular, a pH 8.0 se observó un incremento en el Rgyr a partir de los 50 ns de simulación, en contraste con las simulaciones a pH 6.0 y 7.0, donde este disminuyó. Un análisis más detallado de la estructura (Figura 4.12) reveló que este incremento en el Rgyr está asociado con la formación de una α -hélice hacia el extremo N-terminal de la proteína. Esta conformación se asemeja a la estructura inhibitoria que se observa en el dominio inhibitorio de Pd ζ . La pre-formación de esta hélice podría explicar, en parte, por qué la subunidad ζ exhibe una mayor actividad inhibitoria a pH 8.0 en comparación con pH más bajos. La presencia de esta α -hélice podría desempeñar un papel clave en el aumento de la afinidad y la actividad total de Pd ζ a pH 8.0.

En las réplicas de las simulaciones a pH 8.0, no se observó la formación completa de la α -hélice en el extremo N-terminal de Pd ζ en todas las réplicas. Al analizar los porcentajes de estructura secundaria durante las simulaciones (Figura D.2), se detectaron pequeños aumentos en el contenido de hélices en las tres réplicas a lo largo de la simulación. Aunque solo en una de las tres réplicas se logró la formación completa de la α -hélice inhibitoria en el extremo N-terminal, en las otras dos réplicas se observaron fragmentos limitados de esta estructura. Es importante señalar que esta variabilidad



(a) RMSD por pH



(b) Rgyr por pH

Figura 4.11. Análisis de las simulaciones pHMD. Comparación del **a)** RMSD, y **b)** Radio de giro durante las simulaciones pHMD a pH de 6 (azul), 7 (rojo) y 8 (verde).

en la formación de la α -hélice podría estar relacionada con desafíos en el muestreo conformacional de Pd ζ . En este sentido, el uso de enfoques avanzados de muestreo, como el intercambio de réplicas a pH constante (pH-REMD), podría brindar una mejor exploración del paisaje conformacional de Pd ζ en diferentes pH, tanto en presencia como en ausencia de nucleótidos.

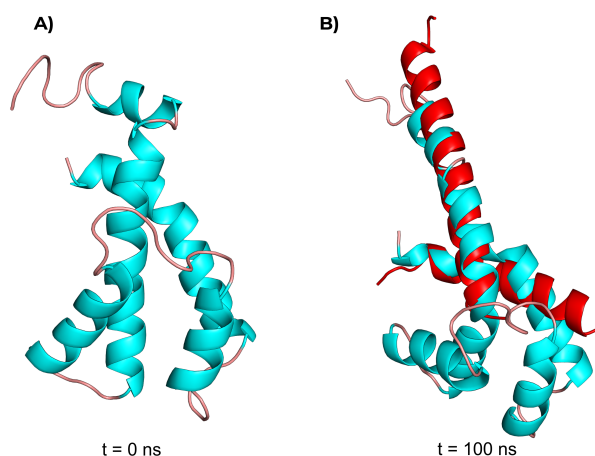


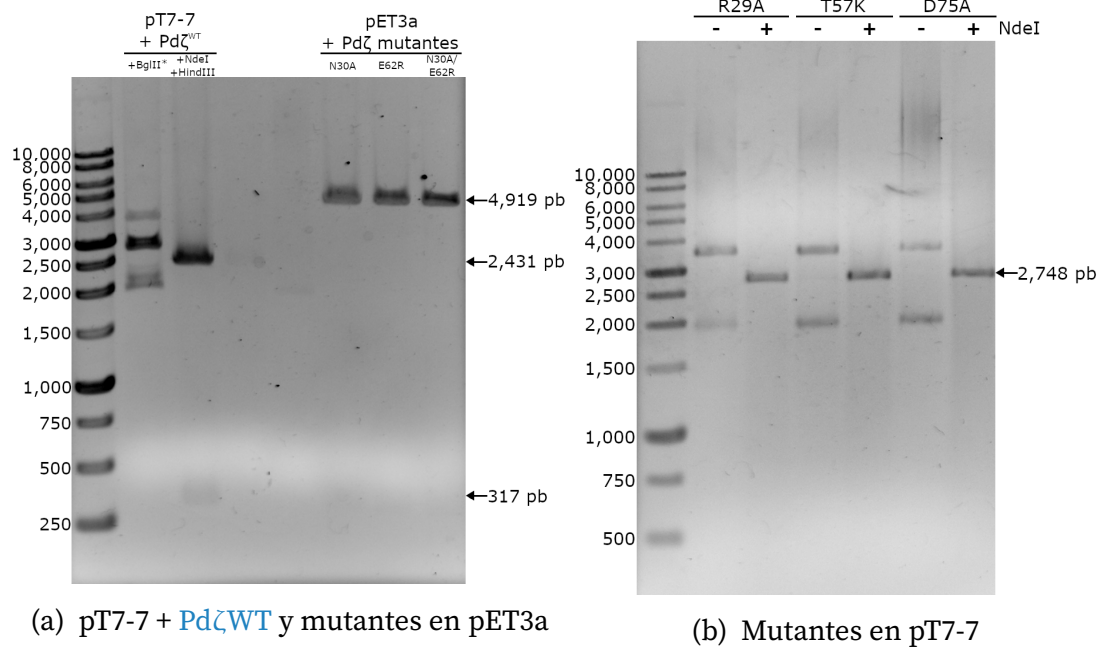
Figura 4.12. Estructuras de Pd ζ durante la simulación a pH 8.0. **A)** Estructura inicial en la pHMD. **B)** Estructura después de 100 ns de simulación. En rojo se muestra la estructura de los extremos N y C-terminal de Pd ζ obtenidos por cristalografía (PDB ID 5DN6) [18].

4.9. Mutagénesis sitio dirigida

Para introducir las mutaciones puntuales deseadas en Pd ζ , se empleó la técnica de mutagénesis sitio dirigida mediante PCR. Las mutaciones R29A, T57K y D75A se incorporaron al gen de Pd ζ WT, previamente clonado en el vector de expresión pT7-7. Cabe señalarse que estas tres mutantes ya se habían diseñado previo a esta tesis por análisis preliminares de *docking* ADP-Pd ζ y ATP-Pd ζ realizados por el Dr. José J. García Trejo, y ya se habían construido las tres mutantes por parte de otra alumna de maestría de nuestro laboratorio en colaboración con la Dra. Nallely Cabrera del IFC de la UNAM, pero las construcciones se perdieron y se tuvieron que volver a construir *de novo* por PCR.

En el caso de las mutantes N30A, E62R y N30A/E62R, obtuvimos los genes con las mutaciones ya incorporadas a través del servicio de síntesis de genes de GeneScript. Estos genes mutados se clonaron en el vector pET3a (Figura 3.1).

Antes de iniciar el proceso de mutagénesis, se confirmó que el plásmido pT7-7 clonado con Pd ζ WT se encontrara en óptimas condiciones. Realizamos análisis de electroforesis sobre el plásmido purificado de *E. coli* Turbo utilizando el método de lisis alcalina.

(a) pT7-7 + Pdζ^{WT} y mutantes en pET3a

(b) Mutantes en pT7-7

Figura 4.13. Análisis de los plásmidos de expresión en geles de agarosa 1 %. **a)** Digestiones del pT7-7 clonado con Pdζ^{WT}. Con BglII no fue posible cortar el plásmido. Al cortar con NdeI y HindIII, se aprecia un fragmento de aproximadamente 300 pb, que concuerda con el tamaño del inserto del gen de Pdζ^{WT}. También se observa al pET3a clonado con las mutantes N30A, E62R y N30A/E62R; digerido con NdeI. Las tres bandas concuerdan con el peso del vector clonado (4,919 pb). **b)** Digestiones con NdeI del pT7-7 clonado con los genes de las mutantes R29A, T57K y D75A.

Luego, se digirió el plásmido purificado con las enzimas de restricción BglII, NdeI y HindIII (Figura 4.13a). Observamos que el plásmido no fue completamente digerido por la enzima BglII, pero con NdeI y HindIII, identificamos la presencia del inserto del gen de Pdζ (317 pb). Además, el tamaño del fragmento linealizado del pT7-7 coincidió con el esperado tras la eliminación del gen clonado. Confirmamos la integridad de la secuencia del gen de Pdζ^{WT} mediante análisis de secuenciación (Anexo E).

Una vez asegurada la integridad de la secuencia, se procedió con la mutagénesis sitio dirigida utilizando el protocolo detallado en la Metodología (Sección 3) (Figura 3.2). Los plásmidos purificados con las mutaciones R29A, T57K y D75A se analizaron de igual forma por electroforesis. En la Figura 4.13b, es posible observar a los plásmidos linealizados con NdeI, donde el tamaño correspondió al del vector con el gen clonado (2,748 pb para pT7-7 + Pdζ). Se confirmó la presencia exitosa de las mutaciones mediante secuenciación. Las mutaciones R29A, T57K y D75A fueron incorporadas exitosamente (Anexo E).

Las mutantes sintetizadas se validaron en un gel de agarosa (Figura 4.13a) para confirmar que se encontraran en buen estado. Una vez confirmada la presencia de las

mutaciones deseadas, se prosiguió con la purificación de las subunidades mutantes.

4.10. Purificación de Pd ζ WT y mutantes

Con el fin de evaluar la expresión de Pd ζ en las células de *E. coli* Origami B(DE3)pLysS, se realizaron pruebas de inducción en bacterias transformadas con los plásmidos de expresión correspondientes para cada proteína (pT7-7 para Pd ζ WT, R29A, T57K y D75A; y pET3a para Pd ζ N30A, E62R y N30A/E62R) utilizando 0.25 mM IPTG y, en algunos casos, 50 μ g/mL de RIF (Figura 4.14a y 4.14b). Se pudo observar la presencia de la banda correspondiente a Pd ζ (11.4 kDa) tanto para la proteína silvestre como para todas las mutantes, independientemente de la adición de RIF. Cuando se empleó el antibiótico, la expresión de las proteínas endógenas de *E. coli* Origami B(DE3)pLysS disminuyó (Figura 4.14a), mientras que la inducción solo con IPTG resultó en una mayor expresión de estas proteínas (Figura 4.14b). En ausencia de IPTG, la expresión de Pd ζ WT se redujo significativamente.

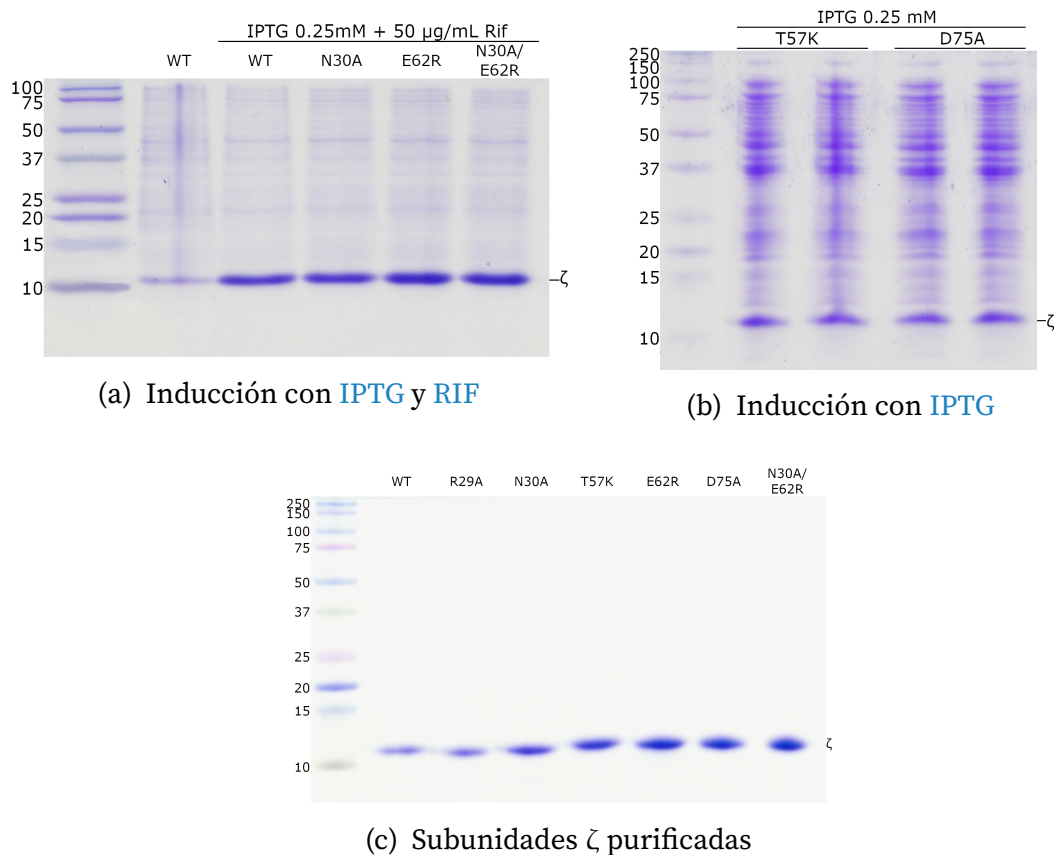


Figura 4.14. Purificación de Pd ζ WT y mutantes. **a)** Pruebas de inducción con 50 μ g/mL RIF. Añadir RIF disminuye la expresión de proteínas endógenas de *E. coli*. **b)** Inducción únicamente con IPTG. **c)** Subunidades ζ mutantes purificadas en un gel SDS-PAGE

Luego de confirmar el éxito de las pruebas de inducción, procedimos a purificar tanto Pd ζ WT como las mutantes planificadas siguiendo el protocolo mencionado previamente descrito (ver 3.2.7). Se obtuvieron las subunidades ζ purificadas con un alto grado de pureza, incluyendo Pd ζ WT y las mutantes R29A, N30A, N30A/E62R, T57K, E62R y D75A, como se aprecia en la Figura 4.14c.

4.11. Purificación de PdF₁

Para llevar a cabo los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP, se requirió previamente purificar la enzima PdF₁. Para esto, se utilizó una modificación del protocolo descrito en [70]. Como se puede observar en la Figura 4.15a, el complejo se obtuvo con una elevada pureza. En la Figura 4.15b se muestra el cromatograma, y en la Figura 4.15c los geles correspondientes a ese paso de la purificación. Durante la purificación, las fracciones se recolectaron en intervalos de 1 mL.

Una vez obtenida la enzima purificada, procedimos a llevar a cabo los ensayos de actividad y a construir las curvas de inhibición utilizando las diferentes subunidades ζ que también habían sido purificadas. Los detalles de estos ensayos y las curvas de inhibición serán descritos en la sección siguiente.

4.12. Ensayos de actividad de la PdF₁

Los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP se llevaron a cabo siguiendo el método descrito en [96]. Para la PdF₁ purificada, se determinó una actividad específica de $7.04 \pm 0.49 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Adicionalmente, se llevaron a cabo ensayos de actividad de hidrólisis de ATP en presencia de concentraciones crecientes de Pd ζ (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15 y 35 μM) y concentración constante de ATP (3 mM), con el fin de evaluar si las mutaciones introducidas cercanas al sitio de unión de nucleótidos generaban cambios en la capacidad inhibitoria de de la subunidad ζ . En la Figura 4.16a se muestran las curvas de inhibición para cada mutante y Pd ζ WT.

Todas las mutantes evaluadas modificaron la Concentración inhibitoria media (IC₅₀) en los ensayos de actividad (Tabla 4.16b), excepto la mutante R29A. La IC₅₀ calculada para la subunidad ζ silvestre fue de $0.48 \pm 0.09 \mu\text{M}$. La única de las mutantes que incrementó la capacidad inhibitoria fue T57K, disminuyendo la IC₅₀ hasta $0.23 \pm 0.01 \mu\text{M}$. Todas

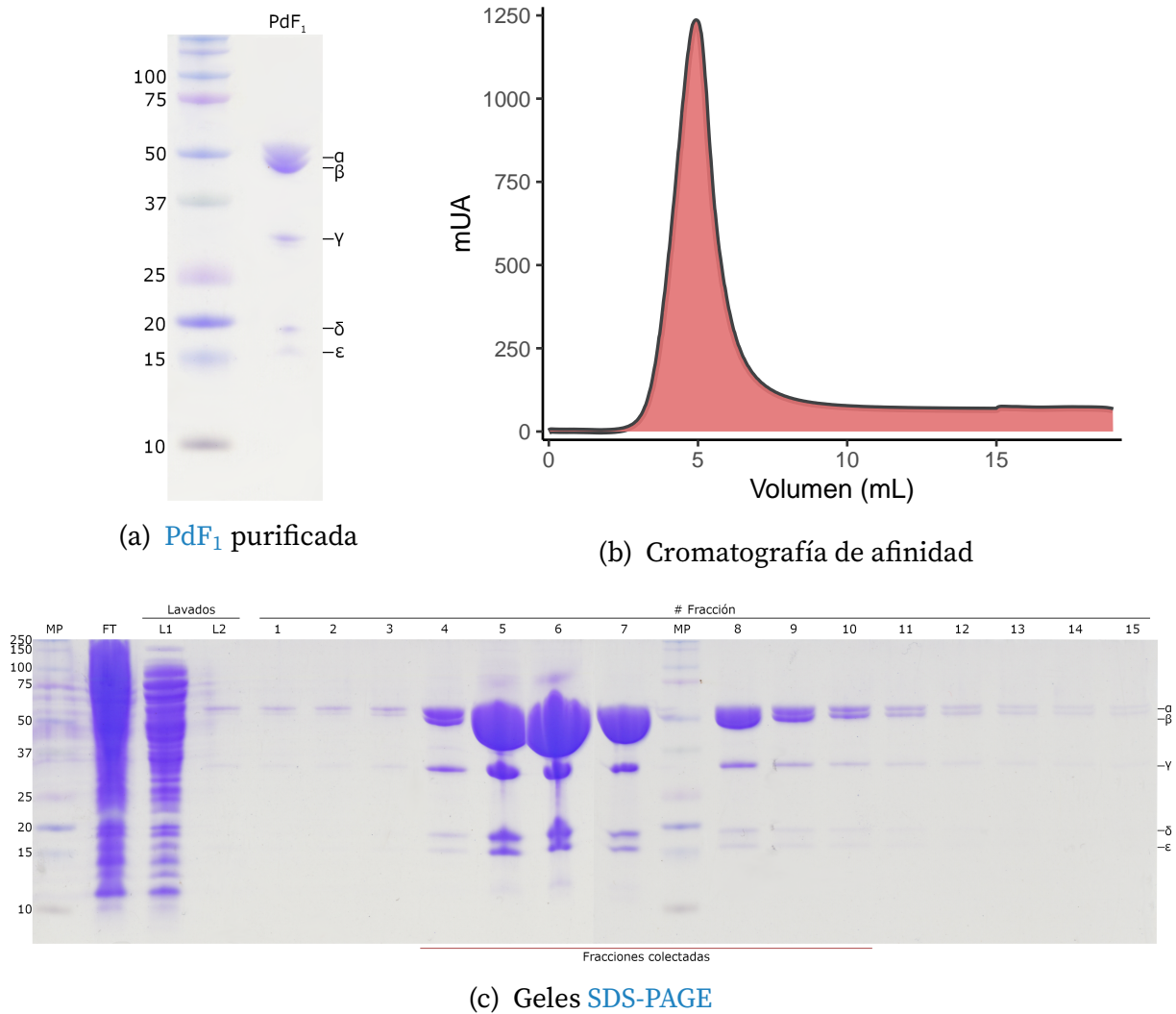
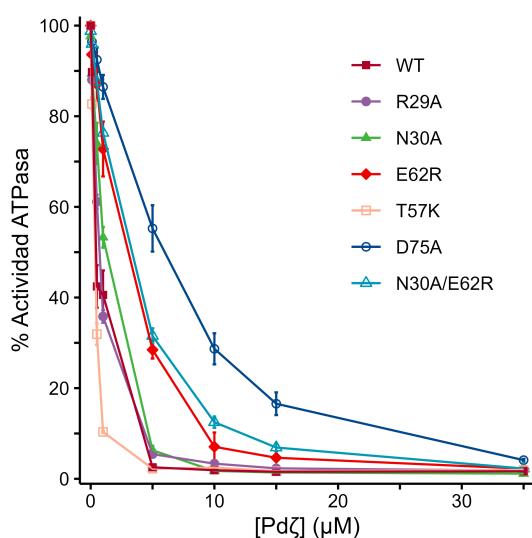


Figura 4.15. Purificación de PdF₁. **a)** Subunidades de la PdF₁ purificada, la cual esta compuesta de las subunidades α (55.04 kDa), β (50.34 kDa), γ (31.59 kDa), δ (20.03 kDa) y ϵ (15.84 kDa). **b)** Cromatograma de la elución de la columna HisTrap FF *crude*. **c)** Geles de la purificación por cromatografía de afinidad. FT = *Flow through*, L1 = Lavado 1, L2 = Lavado 2. Se indican las fracciones concentradas (4-10)



(a) Curvas de inhibición

Mutante	IC ₅₀ (μM)	Cambio vs PdζWT (# veces)
WT	0.48 ± 0.09	-
R29A	0.61 ± 0.03	1.27
N30A	0.99 ± 0.09	2.07
E62R	1.91 ± 0.22	3.95
N30A/E62R	2.22 ± 0.08	4.59
T57K	0.23 ± 0.01	0.49
D75A	4.49 ± 0.50	9.30

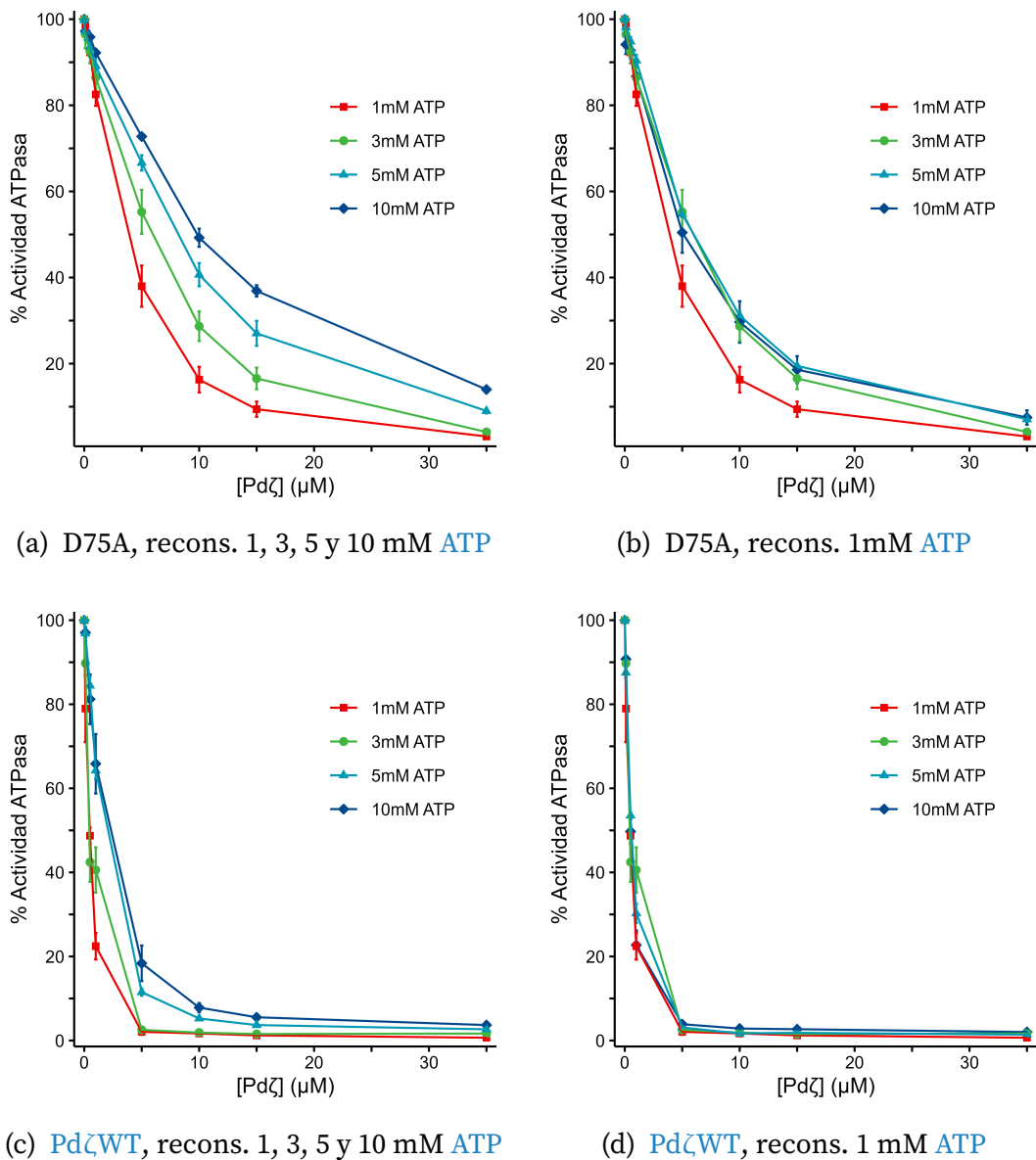
(b) IC₅₀ por mutante

Figura 4.16. a) Inhibición de la hidrólisis de ATP por PdζWT y mutantes. Se reconstituyeron 5 μg de PdF₁ con concentraciones crecientes de Pdζ (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15 y 35 μM). Se muestra el promedio de la actividad de los triplicados ± el error estándar. **b)** IC₅₀ por mutante calculadas para las diferentes subunidades ζ (promedio ± error estándar).

las demás mutaciones incrementaron su IC₅₀, destacando particularmente la mutante D75A, la cual aumentó la IC₅₀ 9.3 veces en comparación con PdζWT, alcanzando una IC₅₀ de 4.49 ± 0.50. Todas las curvas de inhibición se ajustaron correctamente a un modelo de inhibición total no competitiva.

Además, para comprobar que el cambio en la IC₅₀ de la mutante D75A fuera causado por un aumento en la afinidad por el ATP, se realizaron pruebas de inhibición con 1, 3, 5 y 10 mM de ATP con esta mutante y PdζWT (Figura 4.17). Se encontró que al aumentar la concentración de ATP, la inhibición de la hidrólisis de éste por la mutante D75A disminuye, incrementando la IC₅₀ hasta 9.43 ± 0.29 con 10 mM de ATP, poco más del doble que a 3 mM. En el caso de PdζWT, incrementar la concentración de ATP disminuyó ligeramente la capacidad inhibitoria de la subunidad ζ silvestre, particularmente a 5 y 10 mM de ATP, aproximadamente triplicando la IC₅₀ a 10 mM respecto a las condiciones estándar del ensayo (3 mM).

Además, si al reconstituir la subunidad ζ con PdF₁ se lleva a cabo una incubación con 1 mM de ATP en lugar de la concentración específica a la que es llevado a cabo el ensayo (1, 3, 5 y 10 mM), la modulación de la actividad inhibitoria inducida por el ATP desaparece con ambas proteínas (Figura 4.17b y 4.17d). En este caso, no se observaron diferencias significativas en la inhibición entre las concentraciones de 3, 5 y 10 mM de ATP.



ζ	IC ₅₀			
	1 mM	3 mM	5 mM	10 mM
WT	0.38 ± 0.02	0.48 ± 0.09	1.32 ± 0.07	1.49 ± 0.27
D75A	2.74 ± 0.37	4.49 ± 0.50	6.92 ± 0.55	9.43 ± 0.29

(e) IC₅₀ por [ATP]

Figura 4.17. Inhibición a diferentes concentraciones de ATP. Se reconstituyó a ζ con PdF₁ a una concentración de ATP correspondiente con la utilizada durante el ensayo de hidrólisis (a), (c), así como con 1 mM ATP (b) y d). a) D75A reconstituida a 1, 3, 5 y 10 mM de ATP. b) D75A reconstituida a 1 mM de ATP. c) PdζWT reconstituida a 1, 3, 5 y 10 mM de ATP. d) PdζWT reconstituida a 1 mM ATP. e) IC₅₀ por concentración de ATP

4.13. Dicroísmo circular

Con el fin de explorar si existen diferencias estructurales entre **Pd ζ WT** y la mutante D75A, se realizaron experimentos de dicroísmo circular para ambas proteínas, los cuales se muestran en la Figura 4.18. Los resultados mostraron que ambas proteínas tienen una estructura secundaria semejante, compuestas principalmente por α -hélices.

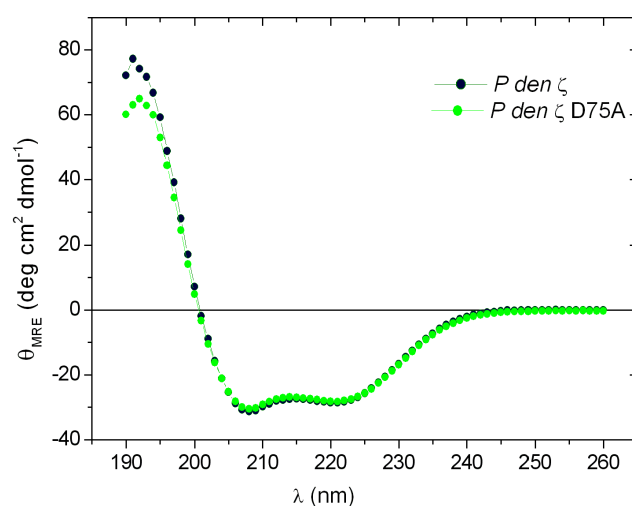


Figura 4.18. Espectros de dicroísmo circular de **Pd ζ WT** y D75A. Se muestra la elipticidad media por residuo, calculada con la ecuación 3.2.

4.14. Proteólisis limitada

Para evaluar el efecto protector del **ADP** y **ATP** en **Pd ζ** frente a la proteólisis por tripsina (Figura G.1), se realizaron ensayos de proteólisis limitada a distintas concentraciones de ambos nucleótidos. Los resultados revelaron que el **ATP** ejerce un efecto protector más pronunciado que el **ADP**. A partir de concentraciones de 20 mM de ambos nucleótidos, no se observaron incrementos significativos en el porcentaje de **Pd ζ** no proteolizada (Figura 4.19). Cabe resaltar que en todas las concentraciones, el **ATP** mostró una capacidad protectora superior al **ADP**.

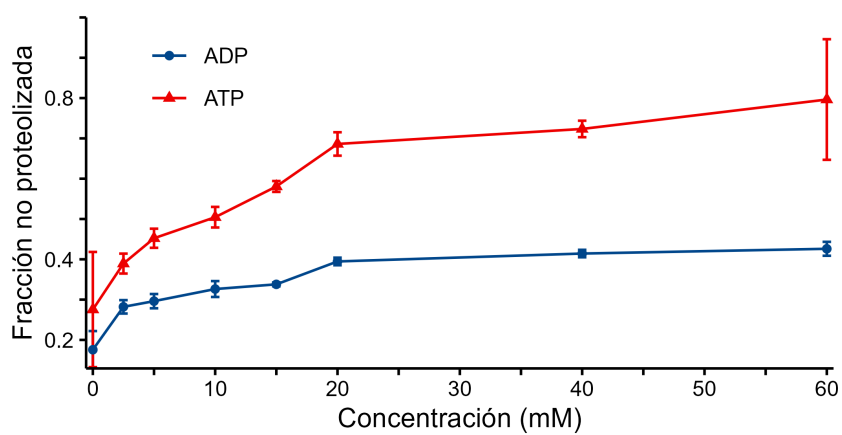


Figura 4.19. Porcentaje de Pdζ no proteolizada contra concentración de ADP y ATP. Las barras de error muestran la desviación estándar de los triplicados.

5. Discusión de resultados

5.1. Los nucleótidos se unen en una región conservada de Pd ζ

El análisis de la conservación por residuo de la subunidad ζ mostró que, además del extremo N-terminal inhibitorio, esta subunidad cuenta con otras regiones con un elevado grado de conservación (Figura 4.1). La mayoría de estos residuos conservados se encuentran orientados hacia el interior de la parte globular de la proteína, correspondiente con el *core* hidrófobo de ζ (Figura ??), lo que demuestra que estos residuos tienen un papel estructural. En el caso de los residuos Y51 y D75, los cuales tienen un alto grado de conservación, se encontró una interacción conservada entre ambos, la cual al perderse incrementa la movilidad de la subunidad ζ .

En la α -hélice H1, entre los residuos 28 a 33, se encuentra la secuencia RRNRL, la cual mantiene una alta conservación entre las secuencias analizadas de ζ (DUF1476). Como se discutirá a continuación, en esta secuencia se encuentran algunos de los residuos más representados en el patrón de la interacción de Pd ζ con los nucleótidos. Además, en los residuos R28, R29 y N30 se forma una bisagra en la que la hélice H1 se divide en dos en respuesta a la unión de ADP (2MDZ, Figura 1.5) [126]. El alto grado de conservación de estos residuos, junto con los cambios conformacionales que se dan a causa de la unión de los nucleótidos, muestran que esta región conservada de ζ tiene importancia en las interacciones con los nucleótidos.

Previamente se había identificado que la subunidad ζ es capaz de unir tanto ADP como ATP con baja afinidad ($K_d = 11.4$ mM para el ATP) [49, 126]. El análisis de la detección de cavidades (Figura 4.2), mostró que tanto en 2LL0 como en 2MDZ hay una cavidad equivalente ubicada en la interfaz de las hélices H1-H4, la cual está en contacto con residuos altamente conservados. Los resultados del *docking* ciego y local mostraron que es en esta zona donde ambos residuos interactúan. Además, durante las simulaciones de MD los nucleótidos mantuvieron sus interacciones en esta región a lo largo de toda la simulación (Figura B.1). El patrón de la interacción con ADP y ATP se mantiene constante para cada estructura, lo que concuerda con la capacidad de este sitio para unir

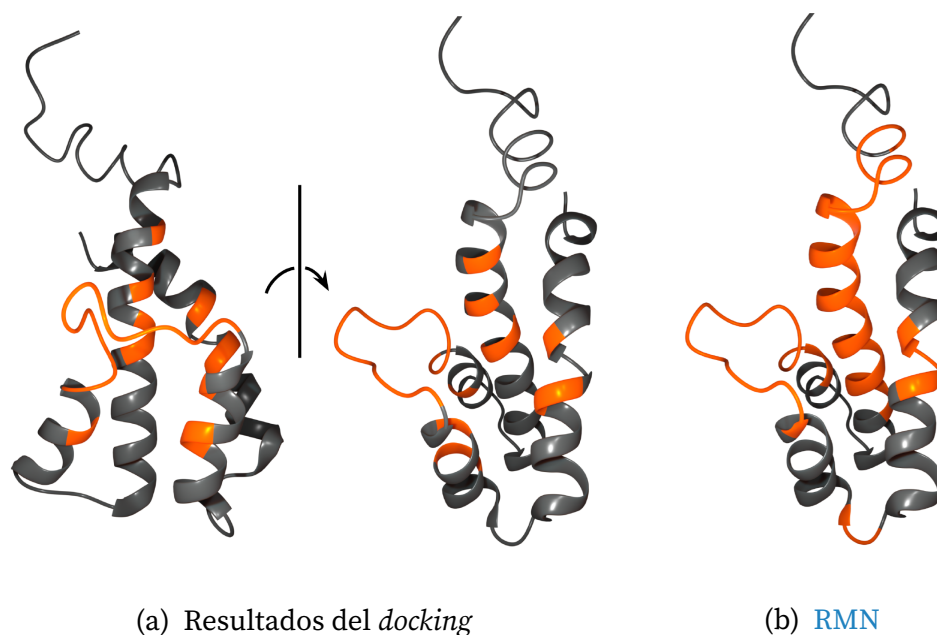


Figura 5.1. Comparación entre los resultados del *docking* y la respuesta a la unión Pd ζ -ADP en la RMN. **a)** Patrón de la interacción de Pd ζ con ADP y ATP. **b)** Residuos de Pd ζ que responden a la unión del ADP durante la RMN, adaptada de [126]. En color naranja se muestran los residuos identificados en el *fingerprint* (a), y en la RMN (b).

a ambos nucleótidos, aunque con ligeras diferencias, ya que el ATP establece más interacciones gracias al fosfato adicional, lo que incrementa ligeramente su afinidad. El análisis de MM/PBSA para las simulaciones MD con ADP calculó una energía libre de unión de -1.06 kcal/mol, lo que corresponde a una menor afinidad que la demostrada experimentalmente para el ATP (-2.65 kcal/mol). Este resultado se ve reforzado por los experimentos de proteólisis limitada, en donde, a las mismas concentraciones, el ATP tuvo un efecto protector mayor a la tripsinólisis que el ADP, lo que significa que se une con más afinidad. A pesar de que estos resultados muestran que Pd ζ tiene más afinidad por ATP que por ADP, es necesario confirmar experimentalmente la afinidad por este último. También, hace falta llevar a cabo los análisis de MM/PBSA en las simulaciones en presencia de ATP.

Al comparar el *fingerprint* con los residuos que respondieron a la unión de los nucleótidos en la RMN [126], se aprecia cómo la distribución de los residuos identificados en el acoplamiento coinciden con los de la resonancia (Figura 5.1). Cabe resaltar que en la resonancia (Figura 5.1b) están representados más residuos en comparación con el *docking* (Figura 5.1a). Eso es debido a que, en el primero, se muestran todos los residuos con cambios en sus desplazamientos químicos, lo que no necesariamente significa que mantengan contacto directo con el ADP, sino que estos aminoácidos alteran su conformación al unirse el nucleótido. En cambio, para el *docking* únicamente están representados los que interaccionan directamente con los nucleótidos.

Tanto en el *docking* ciego y el local, así como en las simulaciones de MD y pHMD, el patrón de la interacción del ATP y ADP con Pd ζ se mantiene constante. Las similitudes mostradas entre la interacción con ADP y ATP en ambas estructuras concuerdan con que el sitio de unión es capaz de unir a ambos nucleótidos, aunque en todos los casos hay menor diversidad de contactos en 2MDZ, lo que se debe a que el sitio de unión ya se encuentra en la conformación adecuada en esa estructura. Incluso durante las simulaciones en 2MDZ los nucleótidos tienen menos variaciones en sus posiciones en comparación con 2LL0 (Figura B.1). A pesar de que el *fingerprint* es similar en todos los análisis, únicamente los residuos R29 y N30 se mantienen constantes, ambos altamente conservados. Al mutar estos residuos por alanina (mutantes R29A y N30A), disminuyó el número de contactos identificados por el *docking*. Cabe destacar que durante la MD sin nucleótidos no se encontraron cambios estructurales derivados de estas mutaciones, lo que demuestra que ambos residuos no tienen un papel estructural en Pd ζ , sino que su función está dirigida a la interacción con los nucleótidos. La bisagra que se forma en respuesta a la unión del ADP en estos residuos se logró replicar con las simulaciones en presencia de ATP. Sin embargo, con las mutaciones dicho movimiento no estuvo presente. En conjunto, los resultados del *docking* y las simulaciones aportan evidencia que sugiere que el sitio de unión a nucleótidos efectivamente se encuentra en la cavidad encontrada por FTSite, ubicado en la interfaz de las cuatro α -hélices que componen a Pd ζ , así como el *loop* entre las hélices H2 y H3.

La comparación de los cambios en la correlación de los movimientos de los carbonos α de las simulaciones MD (Figura 4.7), mostró las regiones de la proteína que cambian su comportamiento dinámico en respuesta a los nucleótidos. Es importante señalar que los principales cambios se dan en la correlación de los movimientos con la α -hélice H1, compuesta principalmente por residuos altamente conservados, lo que sugiere que la conservación es gracias al papel que juegan en unión con los nucleótidos. Los cambios en la conformación (bisagra en residuos 28 a 30) y movimientos (correlación cruzada), junto con los resultados del *fingerprint*, demuestran que las interacciones en la interfaz de las cuatro α -hélices, especialmente con H1, son los que guían los cambios conformacionales causados por los nucleótidos. Junto con el análisis de los clusters de residuos hidrófobos, estos resultados muestran que los cambios conformacionales generan reorganizaciones en el *core* hidrófobo de Pd ζ .

5.2. Efecto de las mutaciones en la inhibición por Pd ζ

Los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP en medio regenerante confirmaron que PdF₁ se purificó exitosamente. La actividad específica obtenida de $7.04 \pm 0.49 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ se encuentra en el intervalo de actividades reportadas previamente para PdF₁, con una actividad de 4.49 ± 1.20 para F₁ obtenida de *P. denitrificans* con un *knockout* de ζ (Pd $\Delta\zeta$) [129], y 9.45 en PdF₁ recombinante calculada por estudios de molécula única [70].

Con la PdF₁ purificada, se realizó una curva de inhibición de la hidrólisis de ATP empleando las subunidades ζ silvestre y mutantes purificadas. La IC₅₀ obtenida de Pd ζ WT fue de 0.48 ± 0.09 , la cual concuerda con las IC₅₀ reportadas previamente para esta subunidad [131, 132, 178]. Se calculó la IC₅₀ para cada una de las subunidades mutantes. De todas estas, únicamente la mutante T57K presentó una inhibición mayor que la silvestre, la cual tiene una IC₅₀ dos veces mayor que T57K. Todas las otras mutantes disminuyeron, en mayor o menor medida, la inhibición causada por la subunidad ζ . R29A y N30A son las mutaciones con menor cambio en la IC₅₀, siendo 1.27 y 2.07 veces mayor en comparación con Pd ζ WT. Las siguientes mutantes con una menor inhibición fueron la E62R, la doble mutante N30A/E62R y D75A, siendo 3.95, 4.59 y 9.30 veces mayor la IC₅₀, respectivamente.

La mutante R29A mantuvo una inhibición comparable con la variante silvestre. Los resultados del acoplamiento y las simulaciones mostraron que este residuo tiene un papel fundamental en la interacción con el nucleótido. Al mutarlo por alanina, el *docking* mostró que además de perder los puentes salinos entre la cadena lateral de la arginina y los fosfatos del nucleótido, disminuye en general la cantidad de interacciones establecidas entre la subunidad ζ y los nucleótidos, lo que causaría una disminución en la afinidad por estos. Ya que la inhibición se mantiene al disminuir la afinidad, los resultados sugieren que la subunidad ζ no requiere la unión de nucleótidos para inhibir la hidrólisis, y que el papel del ATP es meramente regulador. Hace falta comprobar experimentalmente si esta mutante disminuye su afinidad por el ATP.

La mutante que más destacó fue la D75A, cuya IC₅₀ fue 9.30 veces mayor a la silvestre. Los resultados muestran que este cambio en la actividad inhibitoria es debido a un cambio en la regulación por ATP, ya que por esta mutación la subunidad ζ podría tener más afinidad por este nucleótido. Previamente se han realizado mutaciones sobre la subunidad ϵ de *B. subtilis*, que funciona como inhibidor de la hidrólisis de ATP en su F₁F₀-ATPasa [118]. En este trabajo, se mostró que no es necesario modificar los

residuos que interaccionan directamente con los nucleótidos para alterar la afinidad, pues al mutar residuos de la "segunda capa" de interacción se logró incrementar la afinidad por el nucleótido hasta 54 veces [118]. Algo similar sucede con la mutante D75A. Este residuo parece no estar en contacto directo con los nucleótidos según los resultados obtenidos, y aún así es capaz de aumentar la afinidad por el ATP e incrementar la regulación por este de su actividad inhibitoria. Esto podría deberse a las interacciones adicionales detectadas por el *docking* del ATP con los residuos Y51 y K71, las cuales son posibles gracias a que ambos residuos pierden su interacción con D75 y se encuentran libres para establecer más puentes de hidrógeno con el ATP. Otra opción es que al perderse la interacción entre D75 y Y51 incrementa la movilidad de la subunidad, lo que podría facilitar los cambios conformacionales derivados de la unión del nucleótido.

Los resultados de las simulaciones de MD mostraron que las mutaciones inducidas no modifican la estructura de Pd ζ , además de que con el dicroísmo circular (Figura 4.18) se confirmó que la mutante D75A conserva su estructura en comparación con Pd ζ WT. Esto significa que las diferencias en las afinidades (IC₅₀) encontradas son dadas por dos posibles motivos: cambios en las interacciones de la subunidad ζ con la fracción F₁, o cambios en la afinidad de las mutantes por los nucleótidos. Los cambios en las interacciones F₁- ζ son poco probables, ya que las mutaciones no se encuentran en la interfaz entre estas [127], por lo que las diferencias entre las mutantes y la silvestre deben ser dadas gracias a las interacciones con los nucleótidos.

Previamente se había identificado que la inhibición de la hidrólisis de ATP por Pd ζ es regulada por la concentración de éste [49, 131]. Con el fin de evaluar el efecto que tiene la concentración de ATP en la inhibición de la mutante D75A, la que proponemos tiene mayor afinidad por este nucleótido, se realizaron experimentos de hidrólisis a 1, 3, 5 y 10 mM de ATP con Pd ζ WT y D75A. Los resultados mostraron una disminución en la inhibición a medida que incrementa la concentración del nucleótido para ambas subunidades ζ . La mutante D75A tiene una respuesta mayor al cambio en la concentración en comparación con Pd ζ WT. Esta diferencia es dada debido a que D75A incrementa la afinidad por el nucleótido, mientras que con la silvestre la respuesta es más baja gracias a su menor afinidad. Estos resultados confirman que D75A incrementa su afinidad y respuesta a la unión de los nucleótidos en comparación con la silvestre, y que esto es la causa de la disminución en la inhibición

En resumen, el objetivo de las mutaciones inducidas era modificar la afinidad por los nucleótidos en la subunidad ζ . En todos los casos hace falta corroborar experimentalmente el cambio en la afinidad, con el fin de conocer directamente el impacto de las mutaciones en la unión de los nucleótidos. Aún así, los resultados sugieren que los cambios en la inhibición se dan por alteraciones en la afinidad por los nucleótidos. Con esto, se buscaba que una mutación aumentara la afinidad por el ATP, con el fin

de poder cristalizar la subunidad ζ con alguno de los nucleótidos unidos, y así poder caracterizar experimentalmente su unión. Antes se había intentado esto en nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Alfredo Torres Larios del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, pero debido a la baja afinidad por los nucleótidos únicamente se pudo cristalizar a la subunidad ζ sin estos.

5.3. El pH modifica la conformación de Pd ζ

Previamente se había identificado que la actividad inhibitoria de Pd ζ es dependiente del pH, ya que la inhibición se da en pH 8.0, mientras que a pH más bajo la inhibición disminuye [132]. Esto contrasta con el inhibidor en mitocondria, IF1, donde la mejor inhibición se da a pH 6.5 y disminuye al incrementar el pH. Además, por cromatografía de exclusión molecular se había observado que el volumen de elución de Pd ζ cambiaba en función del pH. Los resultados obtenidos son capaces de explicar estos fenómenos. En las simulaciones a pH constante (pHMD), el Rgyr de la proteína incrementa a pH 8.0, demostrando que el cambio en el volumen de elución es gracias a un cambio en la conformación de la proteína, y no a que esta forma oligómeros. Este cambio es gracias a la conformación que adopta el extremo N-terminal, el cual alcanzó espontáneamente la conformación inhibitoria a este pH (Figura 4.12). Así, se propone que estos cambios conformacionales inducidos por el pH son importantes en la inhibición causada por la subunidad ζ de la hidrólisis de ATP por la F₁F₀-ATPasa. En las otras proteínas inhibitorias la inhibición es dependiente del pH (IF1 y algunas subunidades ϵ) [99, 119]. En IF1 el pH alcalino induce la formación de estados oligoméricos que previenen la inhibición, mientras que en algunas subunidades ϵ el pH puede impedir la unión del ATP, y por lo tanto la regulación de la inhibición. En el caso de la subunidad ζ , los resultados obtenidos apuntan a que el pH alcalino favorece la inhibición debido a cambios conformacionales en la subunidad dependientes del pH.

El pH intracelular de *P. denitrificans* se encuentra aproximadamente entre 7.5-8 [179-181]. Cuando el gradiente de protones se encuentre parcial o totalmente colapsado, se producirá una acidificación del citoplasma de la bacteria. Esto parece conflictuar con que la mejor inhibición de Pd ζ se da a pH alcalino, pues es en las condiciones mencionadas donde su capacidad inhibitoria de la hidrólisis de ATP es más necesaria. Es posible que el pH óptimo alcalino de Pd ζ sea necesario para la inhibición de la actividad de ATPasa no solo durante el colapso del gradiente de protones, sino también en su presencia [130]. Esto es consistente con el mecanismo de inhibición unidireccional de ζ o de trinquete [128], bloqueando exclusivamente la rotación en el sentido de la hidrólisis. Entonces, el pH óptimo de la subunidad ζ pudo haber surgido como una adaptación

fisiológica al estilo de vida libre de *P. denitrificans*, con el fin de prevenir un déficit de ATP en respuesta a cambios ambientales.

5.4. El ATP y pH regulan la inhibición de la subunidad ζ

En conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis sugieren que la subunidad ζ posee dos mecanismos de regulación de su actividad inhibitoria. El primero es gracias al pH. Se ha demostrado que Pd ζ tiene un pH óptimo de inhibición alrededor de pH 8.0 [132]. Nuestros resultados sugieren que esto es gracias a cambios conformacionales dependientes del pH, además de que a pH 8.0 se favorece la formación espontánea de la conformación inhibitoria. Recientemente, en el laboratorio se evaluó en la subunidad ζ de *Sinorhizobium meliloti* si el pH es capaz de inducir los cambios conformacionales en Pd ζ [178]. En ese caso, no se replicaron los cambios conformacionales dependientes del pH, por lo que hace falta comprobar si la regulación por pH está presente en todas las subunidades ζ o únicamente en algunas de ellas, como Pd ζ .

El otro mecanismo de regulación es dado por la unión del ATP. Ya se conocía que este nucleótido modulaba la inhibición de la hidrólisis de ATP al unirse a la subunidad ζ [131], además de que las estructuras resultas por RMN demostraron que la unión de los nucleótidos genera cambios conformacionales en la subunidad ζ [126]. Los resultados confirman esto, pues tanto con Pd ζ WT como con D75A al incrementar la concentración de ATP, disminuyó la actividad inhibitoria. Con una subunidad ζ con mayor afinidad por el nucleótido (D75A), la respuesta a la unión del ATP se ve intensificada. Además, si se incubaba a la subunidad ζ a una concentración de ATP menor (1 mM) a la presente durante el ensayo de hidrólisis (3, 5 y 10 mM), el efecto modulador causado por la unión del nucleótido no está presente. Este resultado sugiere que la unión del ATP a Pd ζ debe ocurrir antes de la interacción con PdF₁, y una vez que Pd ζ se ha unido a PdF₁, ya no es posible una unión y regulación posteriores con el ATP. La conservación de los residuos que interaccionan con los nucleótidos apunta a que este mecanismo de regulación está presente en la mayoría de las subunidades ζ .

Entonces, se propone un modelo de regulación de la inhibición en Pd ζ dependiente de estos dos mecanismos. En este, el ATP se tiene que unir a la subunidad ζ mientras esta aún no se encuentra unida a PdF₁. Si la concentración de ATP no es lo suficientemente alta, entonces la subunidad ζ conservará su actividad inhibitoria. Al aumentar

la concentración de ATP las subunidades ζ irán disminuyendo su potencial inhibitorio, de manera análoga a lo que sucede con la subunidad ϵ . Por lo tanto, ζ estaría actuando como un sensor de la concentración de ATP intracelular, inhibiendo su hidrólisis cuando más escaso es. También es posible que no solo responda a la concentración de ATP, sino que la regulación este dada por la relación entre la concentración de ATP y la de ADP, ya que puede unir a ambos pero con mayor afinidad al primero. Cabe mencionar que la unión de ADP a la subunidad ζ podría también participar en el mecanismo de inhibición unidireccional de la subunidad ζ , la cual inhibe selectivamente a la enzima durante la rotación en el sentido de la hidrólisis del ATP, pero no durante la síntesis del mismo, dado que la formación del complejo Pd ζ -ADP podría coadyuvar a prevenir o revertir la posible inhibición de la actividad de PdF₁F₀-ATP sintasa por la subunidad zeta en condiciones de síntesis de ATP cuando se acumule ADP en el citoplasma de la bacteria. Además, el pH facilita la inhibición a pH 8.0, mientras que a pH más ácido disminuye, presuntamente por que el pH facilita que ζ adopte la conformación inhibitoria.

Ambos mecanismos de inhibición ya se han descrito en otras subunidades inhibitorias. En IF1 el pH regula la formación de estas oligoméricos, y a su vez la actividad inhibitoria de esta proteína [99]. En la subunidad ϵ , la unión del ATP funciona como un interruptor de su actividad inhibitoria, pues cuando este se une en su dominio C-terminal, ϵ no puede adoptar su conformación inhibitoria [111, 112]. Además, se ha demostrado que el pH también regula la inhibición de ϵ , aunque lo hace indirectamente, a través de cambios en la interacción con el ATP [119].

6.

Conclusiones

Para terminar, el estudio computacional y experimental de la unión de [ADP](#) y [ATP](#) por la subunidad ζ de *P. denitrificans* reveló una serie de conclusiones importantes:

- Se identificó el sitio de unión a nucleótidos en la subunidad ζ , además de una conservación significativa de los residuos involucrados al comparar las subunidades ζ de diferentes α -proteobacterias, lo que sugiere la conservación funcional de la unión de nucleótidos.
- La unión de [ADP](#) y [ATP](#) reorganiza los núcleos de residuos hidrófobos de [Pd \$\zeta\$](#) , generando cambios conformacionales diferentes en respuesta a la unión de [ADP](#) vs. [ATP](#)
- Las mutantes puntuales diseñadas no afectan la conformación de la subunidad ζ , al mismo tiempo que alteraron la afinidad por los nucleótidos y la regulación de la actividad inhibitoria de [Pd \$\zeta\$](#) .
- Incrementar la afinidad por el [ATP](#) causa una disminución en la inhibición sobre la F_1F_0 -ATPasa causada por [Pd \$\zeta\$](#) .
- La subunidad ζ disminuye su actividad inhibitoria al incrementar la concentración de [ATP](#), funcionando también como un sensor de la concentración del nucleótido.
- Los nucleótidos deben unirse a la subunidad ζ antes de que esta se una e inhiba a [PdF₁](#).
- El pH no modifica la interacción de [Pd \$\zeta\$](#) con el ADP/ATP.
- A pH 8.0 se facilita la formación de la conformación inhibitoria en [Pd \$\zeta\$](#) , sugiriendo una regulación adicional de la inhibición en función del pH.

Las perspectivas futuras incluyen la extensión de las simulaciones o utilizar métodos que mejoren el muestreo conformacional, caracterización experimental de la unión de los nucleótidos, y exploración de la unión y regulación de nucleótidos en las subunidad ζ de otras α -proteobacterias.

A. *Fingerprint* durante las simulaciones

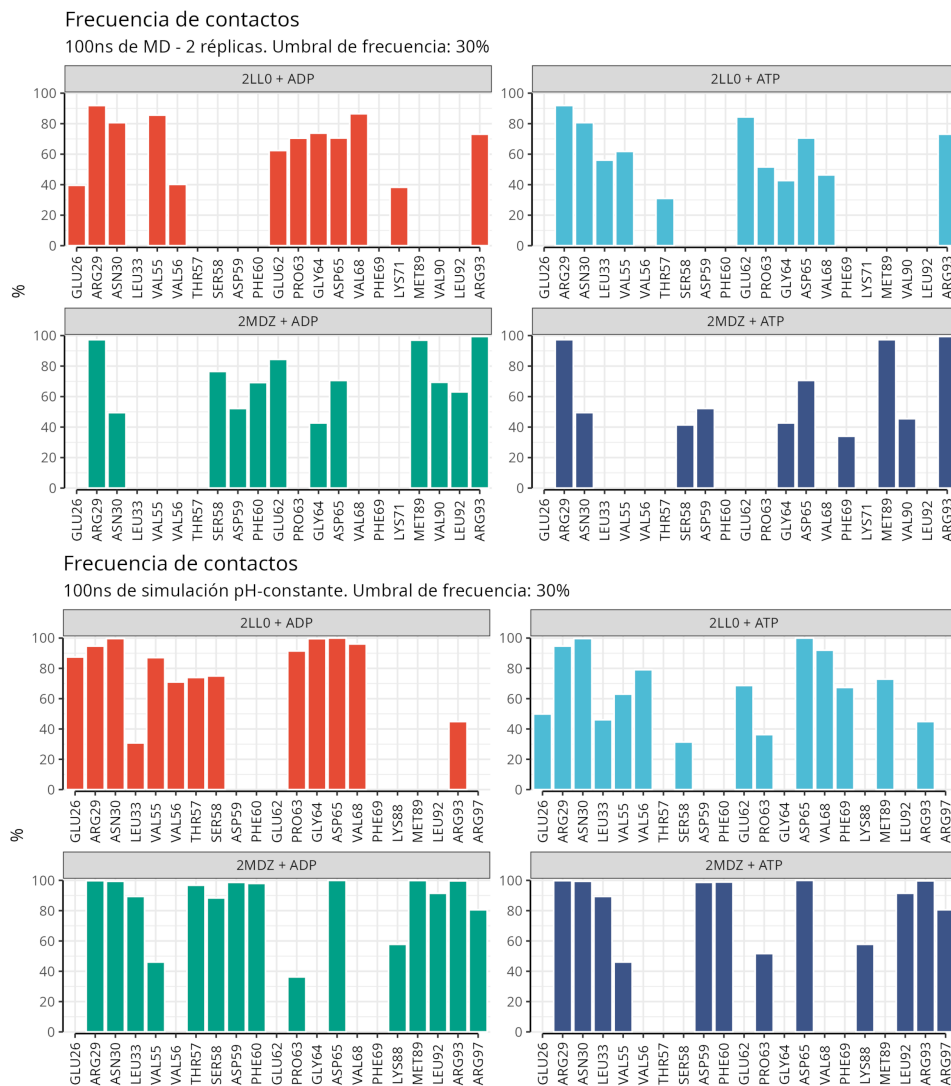
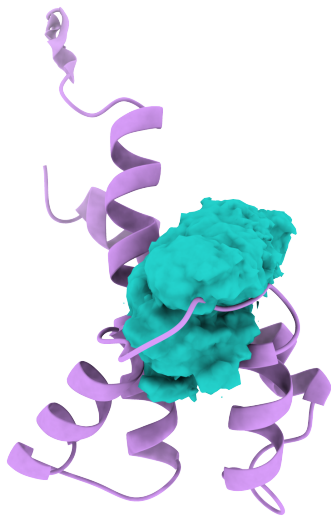
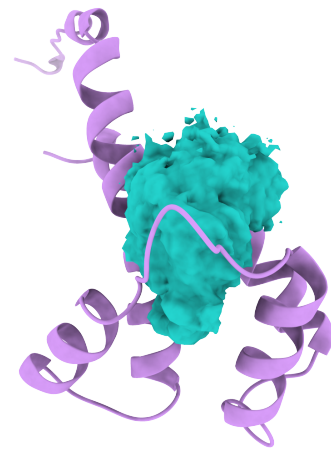


Figura A.1. *Fingerprint* de la interacción de Pd ζ con ADP y ATP para las simulaciones de dinámica molecular (arriba) y dinámica molecular a pH constante (abajo).

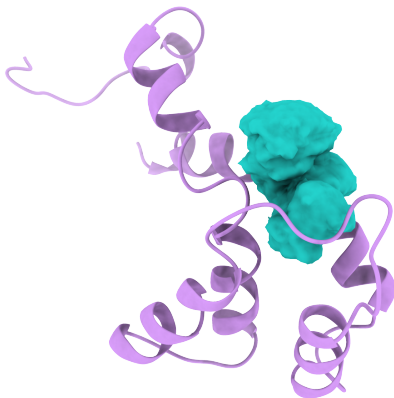
B. Función de distribución espacial del ATP y ATP



(a) 2LL0 + ADP



(b) 2LL0 + ATP



(c) 2MDZ + ADP



(d) 2MDZ + ATP

Figura B.1. Función de distribución espacial del ATP y ATP en 2LL0 y 2MDZ. En verde se muestra la función de distribución espacial de los nucleótidos con $\text{Pd}\zeta$, que representa la distribución tridimensional del ADP y ATP respecto a $\text{Pd}\zeta$ durante las simulaciones. En morado se representa a la estructura promedio de la subunidad ζ durante las 2 réplicas de la simulación.

C. *docking* en las mutantes

Docking en las mutantes de 2LL0

Mutación	Vina (kcal/mol)	Contactos
WT-ADP	-7,10	R29 ^β , R29 ^β , N30 ^α , L33 ^{αγ} , G64 ^{αγ} , D65 ^{αγ} , R93 ^β
WT-ATP	-6,9	R29 ^β , R29 ^β , R29 ^β , N30 ^α , L33 ^{αγ} , D61 ^α , D61 ^α , G64 ^{αγ} , D65 ^{αγ} , R93 ^β
R29A-ADP	-7,1	G34 ^{αγ} , T57 ^{αγ} , S58 ^α , S58 ^{αγ} , E62 ^α , E62 ^α , P63 ^{αγ} , K71 ^β , R93 ^α
R29A-ATP	-6,7	N30 ^α , L33 ^{αγ} , K71 ^β , K71 ^β , K71 ^β , R93 ^α
N30A-ADP	-6,8	R29 ^β , R29 ^β , L33 ^{αγ} , D61 ^α , E62 ^{αγ} , E62 ^{αγ} , G64 ^{αγ} , D65 ^{αγ} , K71 ^α , R93 ^β
N30A-ATP	-7,0	R29 ^α , R29 ^β , R29 ^β , Y51 ^α , D61 ^α , E62 ^{αγ} , G64 ^{αγ} D65 ^α , D65 ^{αγ} , K71 ^α , R93 ^β
N30A/E62R-ADP	-6,0	R62^α , R62^α , R62^β , R62^δ , K71 ^α , K71 ^{αγ} , K71 ^β , K71 ^β , D75 ^α , R93 ^α , R93 ^α , R93 ^α
N30A/E62R-ATP	-5,8	R29 ^α , F60 ^{αγ} , D61 ^α , R62^{αγ} , D65 ^α , D67 ^{αγ}
T57K-ADP	-7,2	N30 ^α , G34 ^{αγ} , K57^{αγ} , S58 ^{αγ} , E62 ^α , E62 ^α , K71 ^β , R93 ^α
T57K-ATP	-7,5	N30 ^α , K57^{αγ} , S58 ^{αγ} , E62 ^α , E62 ^α , K71 ^α , K71 ^{αγ} , K71 ^β , K71 ^β , R93 ^α , R93 ^α
E62R-ADP	-5,9	R62^α , R62^α , R62^β , R62^δ , K71 ^α , K71 ^β , K71 ^β , D75 ^α , D75 ^α , R93 ^α , R93 ^α , R93 ^α
E62R-ATP	-6,7	E26 ^α , R29 ^α , N30 ^α , T57 ^{αγ} , S58 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^α , R62^{αγ} , G64 ^{αγ}
D75A-ADP	-7,2	N30 ^α , L33 ^{αγ} , Y51 ^α , E62 ^α , K71 ^β , K71 ^β , R93 ^α , R93 ^α
D75A-ATP	-6,9	Y51 ^α , Y51 ^α , E62 ^α , E62 ^α , K71 ^β , K71 ^β , R93 ^α , R93 ^α

^αPuente de hidrógeno. ^βPuente salino. ^δ π -Catión. ^γContacto con el *backbone*.

Tabla C.1. Resultados del *docking* en Vina para las mutantes en 2LL0. Se muestran las puntuaciones en kcal/mol. Los residuos destacados en los contactos corresponden con interacciones del nucleótido con el aminoácido mutado.

Docking en las mutantes de 2MDZ

Mutación	Vina (kcal/mol)	Contactos
WT-ADP	-7,70	E26 ^{αγ} , R29 ^α , R29 ^{αγ} , N30 ^α , N30 ^{αγ} , T57 ^{αγ} , S58 ^α , S58 ^α , D59 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^{αγ}
WT-ATP	-7,80	E26 ^{αγ} , R29 ^{αγ} , R29 ^β , N30 ^α , N30 ^{αγ} , S58 ^α , D59 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^{αγ} , E62 ^α
R29A-ADP	-6,3	N30 ^α , N30 ^{αγ} , D59 ^{αγ} , D61 ^α , R93 ^α
R29A-ATP	-6,7	N30 ^α , N30 ^{αγ} , R31 ^{αγ} , D59 ^{αγ} , D59 ^{αγ} , R93 ^α
N30A-ADP	-5,7	R29 ^β , R29 ^β , F60 ^{αγ} , R93 ^α
N30A-ATP	-6,4	R29 ^β , R29 ^β , R29 ^β , T57 ^{αγ} , R93 ^α
N30A/E62R-ADP	-5,8	R29 ^β , R29 ^β , D69 ^{αγ} , M89 ^{αγ}
N30A/E62R-ATP	-6,6	R29 ^β , R29 ^β , R29 ^β , T57 ^{αγ} , S58 ^α , D59 ^{αγ} , R93 ^α
T57K-ADP	-5,8	R29 ^β , R29 ^β , N30 ^α , F60 ^{αγ} , R93 ^α
T57K-ATP	-6,5	R29 ^β , N30 ^α , D59 ^α , D59 ^α , D59 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^{αγ} , R93 ^α
E62R-ADP	-5,6	R29 ^β , N30 ^α , S58 ^α , D61 ^{αγ} , R62^{αγ} , D65 ^{αγ}
E62R-ATP	-6,7	R29 ^β , R29 ^β , R29 ^β , S58 ^α , F60 ^{αγ} , M89 ^{αγ} , R93 ^α
D75A-ADP	-5,8	R29 ^β , R29 ^β , N30 ^α , F60 ^{αγ} , R93 ^α
D75A-ATP	-6,5	R29 ^β , N30 ^α , D59 ^α , D59 ^α , F60 ^{αγ} , F60 ^{αγ} , D61 ^{αγ} , R93 ^α

^αPuente de hidrógeno. ^βPuente salino. ^γContacto con el *backbone*.

Tabla C.2. Resultados del *docking* en Vina para las mutantes en 2MDZ. Se muestran las puntuaciones en kcal/mol. Los residuos destacados en los contactos corresponden con interacciones con el aminoácido mutado.

D. Estructura secundaria durante las simulaciones

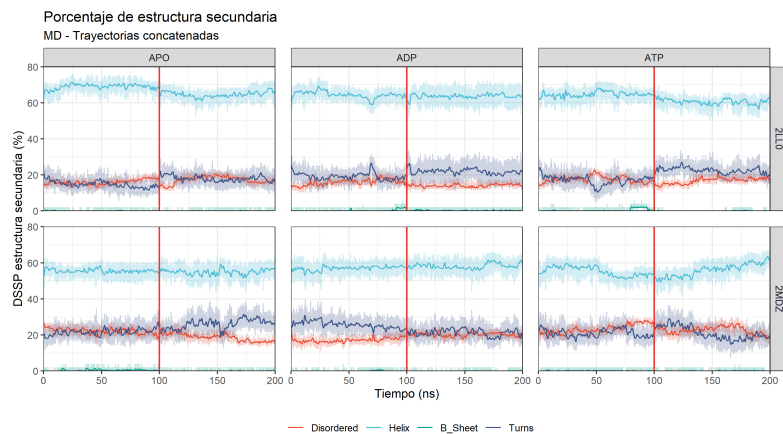


Figura D.1. Porcentaje de estructura secundaria de ambas replicas, la línea roja indica el fin de la primera réplica. Se muestra la tendencia de la estructura secundaria (área sombreada) con un spline

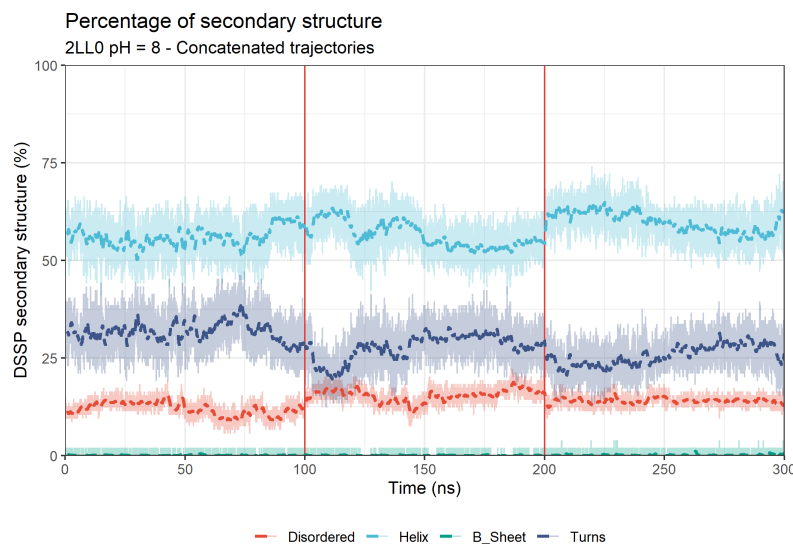


Figura D.2. Porcentaje de estructura secundaria de Pd ζ durante las simulaciones pHMD a pH 8. Se concatenaron las 3 trayectorias. Las líneas rojas indican el fin de una simulación y el comienzo de la siguiente.

E.

Resultados de secuenciación

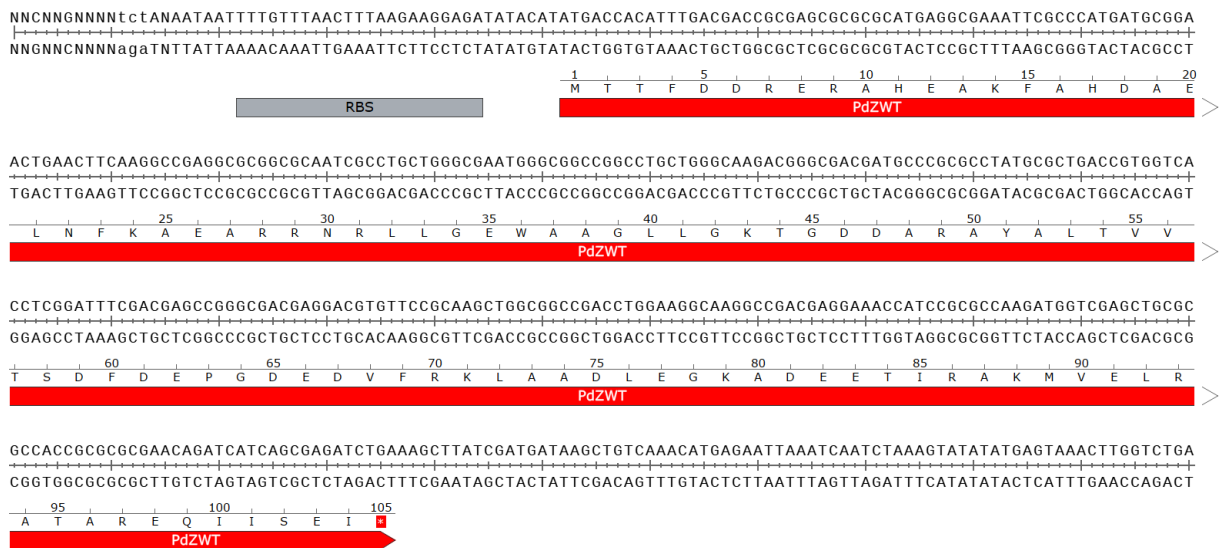


Figura E.1. Resultados de la secuenciación de PdζWT

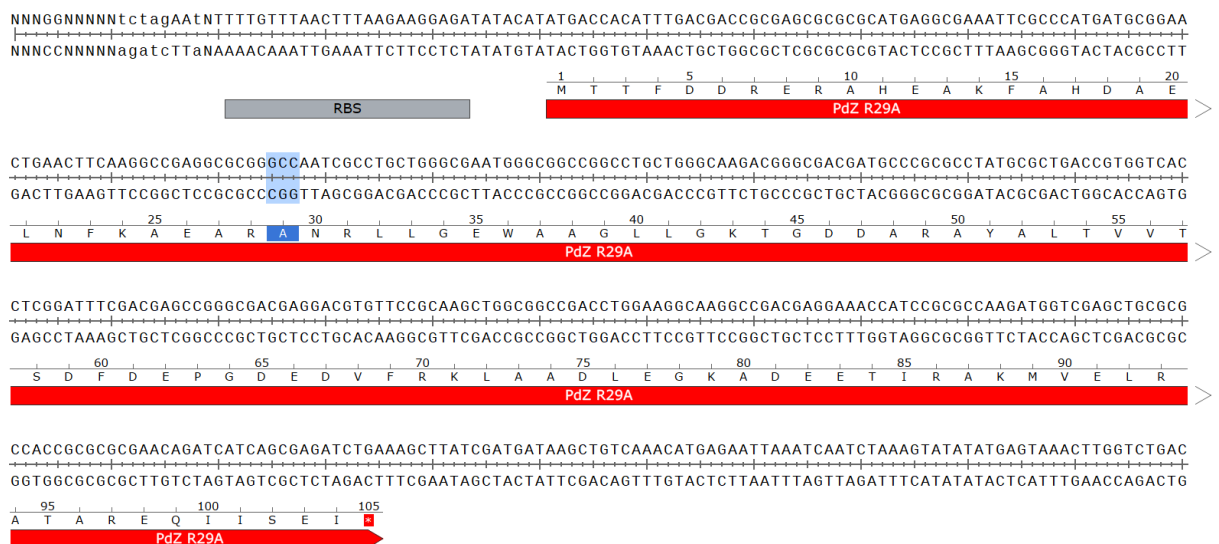


Figura E.2. Resultados de la secuenciación de Pdζ R29A

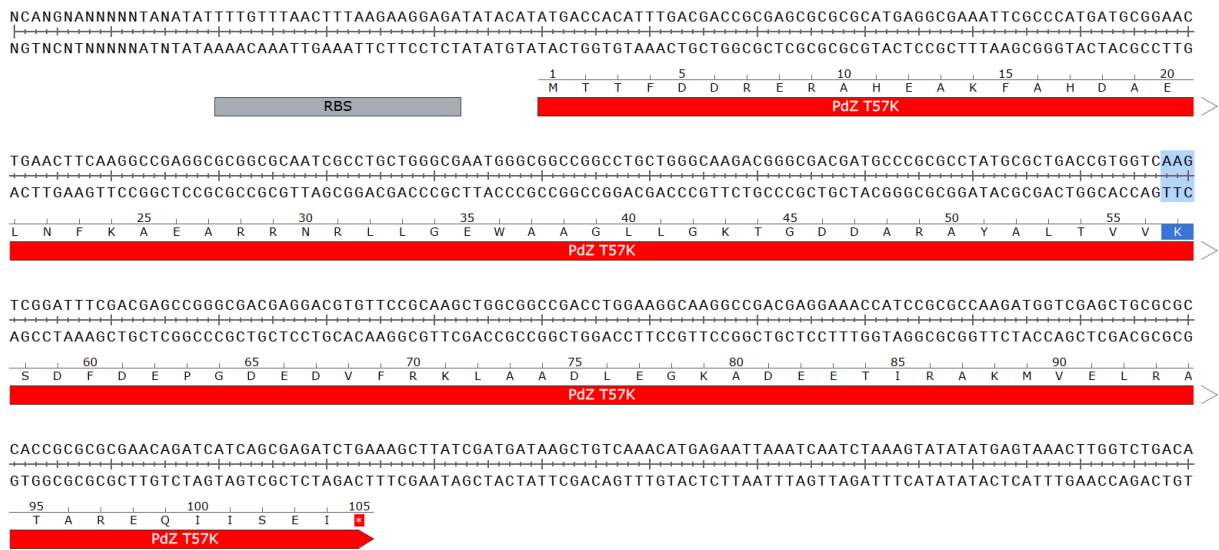


Figura E.3. Resultados de la secuenciación de Pdζ T57K



Figura E.4. Resultados de la secuenciación de Pdζ D75

F. Aminoácidos mutados

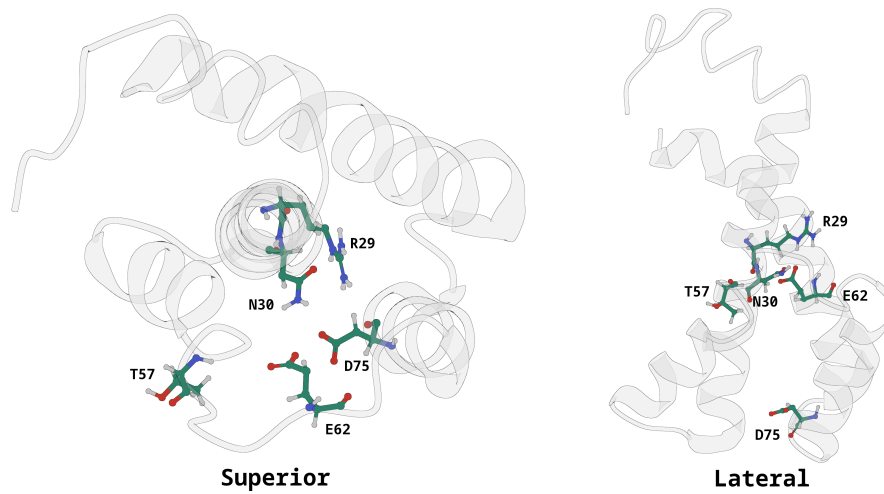


Figura F.1. Posiciones de los aminoácidos mutados en la subunidad ζ (PDB 2LL0).

G.

Proteólisis limitada

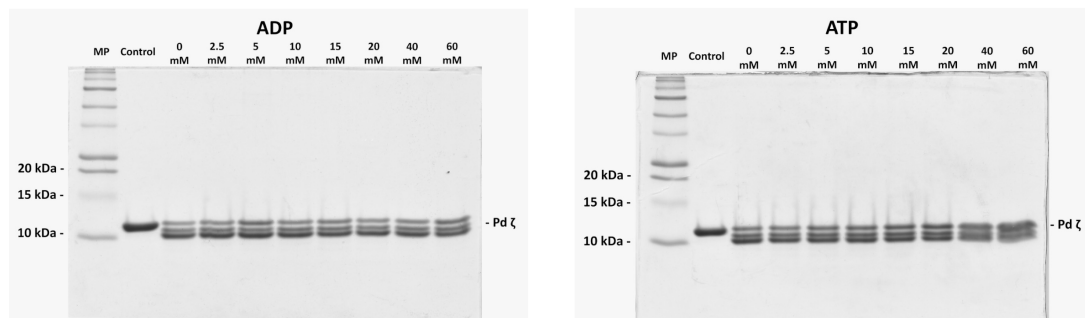


Figura G.1. SDS-PAGE de la proteólisis limitada de Pd ζ WT en presencia de diferentes concentraciones de ADP y ATP

Bibliografía

- [1] J. R. Knowles, «Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions,» *Annual Review of Biochemistry*, vol. 49, n.º 1, págs. 877-919, jun. de 1980, ISSN: 0066-4154, 1545-4509. DOI: [10.1146/annurev.bi.49.070180.004305](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.004305).
- [2] R. Hanson, «The role of ATP in metabolism,» *Biochemical Education*, vol. 17, n.º 2, págs. 86-92, abr. de 1989, ISSN: 03074412. DOI: [10.1016/0307-4412\(89\)90012-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(89)90012-5).
- [3] C. M. Joyce y T. A. Steitz, «Polymerase structures and function: Variations on a theme?» *Journal of Bacteriology*, vol. 177, n.º 22, págs. 6321-6329, nov. de 1995, ISSN: 0021-9193, 1098-5530. DOI: [10.1128/jb.177.22.6321-6329.1995](https://doi.org/10.1128/jb.177.22.6321-6329.1995).
- [4] E. D. Scheeff y P. E. Bourne, «Structural Evolution of the Protein Kinase-Like Superfamily,» *PLoS Computational Biology*, vol. 1, n.º 5, J. Thornton, ed., e49, oct. de 2005, ISSN: 1553-7358. DOI: [10.1371/journal.pcbi.0010049](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010049).
- [5] M. Kamenetsky, S. Middelhaufe, E. M. Bank, L. R. Levin, J. Buck y C. Steegborn, «Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 362, n.º 4, págs. 623-639, sep. de 2006, ISSN: 00222836. DOI: [10.1016/j.jmb.2006.07.045](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.045).
- [6] C. Volonté y N. D'Ambrosi, «Membrane compartments and purinergic signalling: The purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters: The purinome,» *FEBS Journal*, vol. 276, n.º 2, págs. 318-329, ene. de 2009, ISSN: 1742464X. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2008.06793.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06793.x).
- [7] Y. L. J. Pang, K. Poruri y S. A. Martinis, «TRNA synthetase: TRNA aminoacylation and beyond,» *WIREs RNA*, vol. 5, n.º 4, págs. 461-480, jul. de 2014, ISSN: 1757-7004, 1757-7012. DOI: [10.1002/wrna.1224](https://doi.org/10.1002/wrna.1224).
- [8] K. E. Wellen y C. B. Thompson, «A two-way street: Reciprocal regulation of metabolism and signalling,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, n.º 4, págs. 270-276, abr. de 2012, ISSN: 1471-0072, 1471-0080. DOI: [10.1038/nrm3305](https://doi.org/10.1038/nrm3305).
- [9] M. Bonora et al., «ATP synthesis and storage,» *Purinergic Signalling*, vol. 8, n.º 3, págs. 343-357, sep. de 2012, ISSN: 1573-9538, 1573-9546. DOI: [10.1007/s11302-012-9305-8](https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8).

- [10] P. D. Boyer, B. Chance, L. Ernster, P. Mitchell, E. Racker y E. C. Slater, «Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation,» *Annual Review of Biochemistry*, vol. 46, n.º 1, págs. 955-966, jun. de 1977, ISSN: 0066-4154, 1545-4509. DOI: [10.1146/annurev.bi.46.070177.004515](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.004515).
- [11] P. D. Boyer, «The Binding Change Mechanism for ATP Synthase — Some Probabilities and Possibilities,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1140, n.º 3, págs. 215-250, ene. de 1993, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(93\)90063-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90063-L).
- [12] W. Kühlbrandt y K. M. Davies, «Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine,» *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 41, n.º 1, págs. 106-116, ene. de 2016, ISSN: 09680004. DOI: [10.1016/j.tibs.2015.10.006](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.006).
- [13] M. Forgac, «Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, n.º 11, págs. 917-929, nov. de 2007, ISSN: 1471-0072, 1471-0080. DOI: [10.1038/nrm2272](https://doi.org/10.1038/nrm2272).
- [14] S. P. Muench, J. Trinick y M. A. Harrison, «Structural divergence of the rotary ATPases,» *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 44, n.º 3, págs. 311-356, ago. de 2011, ISSN: 0033-5835, 1469-8994. DOI: [10.1017/S0033583510000338](https://doi.org/10.1017/S0033583510000338).
- [15] G. Oster y H. Wang, «ATP synthase: Two motors, two fuels,» *Structure*, vol. 7, n.º 4, R67-R72, abr. de 1999, ISSN: 09692126. DOI: [10.1016/S0969-2126\(99\)80046-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80046-X).
- [16] H. Guo, T. Suzuki y J. L. Rubinstein, «Structure of a bacterial ATP synthase,» *eLife*, vol. 8, feb. de 2019, ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/elife.43128](https://doi.org/10.7554/elife.43128).
- [17] W. Kühlbrandt, «Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases,» *Annual Review of Biochemistry*, vol. 88, n.º 1, págs. 515-549, jun. de 2019, ISSN: 0066-4154, 1545-4509. DOI: [10.1146/annurev-biochem-013118-110903](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903).
- [18] E. Morales-Rios, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie y J. E. Walker, «Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n.º 43, págs. 13 231-13 236, oct. de 2015, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1517542112](https://doi.org/10.1073/pnas.1517542112).
- [19] J. J. García-Trejo y E. Morales-Ríos, «Regulation of the F1F0-ATP Synthase Rotary Nanomotor in its Monomeric-Bacterial and Dimeric-Mitochondrial Forms,» *Journal of Biological Physics*, vol. 34, n.º 1-2, págs. 197-212, abr. de 2008, ISSN: 0092-0606, 1573-0689. DOI: [10.1007/s10867-008-9114-z](https://doi.org/10.1007/s10867-008-9114-z).
- [20] G. Groth y E. Pohl, «The Structure of the Chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å Resolution,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n.º 2, págs. 1345-1352, ene. de 2001, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M008015200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008015200).

- [21] G. M. Courbon y J. L. Rubinstein, «CryoEM Reveals the Complexity and Diversity of ATP Synthases,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, pág. 864 006, jun. de 2022, ISSN: 1664-302X. DOI: [10.3389/fmicb.2022.864006](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.864006).
- [22] P. Paumard et al., «The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology,» *The EMBO Journal*, vol. 21, n.º 3, págs. 221-230, feb. de 2002, ISSN: 02614189. DOI: [10.1093/emboj/21.3.221](https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221).
- [23] F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens y J. J. García, «Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, n.º 35, págs. 12 356-12 358, ago. de 2005, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.0503893102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503893102).
- [24] K. M. Davies, C. Anselmi, I. Wittig, J. D. Faraldo-Gómez y W. Kühlbrandt, «Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, n.º 34, págs. 13 602-13 607, ago. de 2012, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1204593109](https://doi.org/10.1073/pnas.1204593109).
- [25] A. Hahn et al., «Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology,» *Molecular Cell*, vol. 63, n.º 3, págs. 445-456, ago. de 2016, ISSN: 10972765. DOI: [10.1016/j.molcel.2016.05.037](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.037).
- [26] S. Schulz, M. Wilkes, D. J. Mills, W. Kühlbrandt y T. Meier, «Molecular architecture of the N-type ATPase rotor ring from *Burkholderia pseudomallei*,» *EMBO reports*, vol. 18, n.º 4, págs. 526-535, abr. de 2017, ISSN: 1469-221X, 1469-3178. DOI: [10.15252/embr.201643374](https://doi.org/10.15252/embr.201643374).
- [27] I. N. Watt, M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. W. Leslie y J. E. Walker, «Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n.º 39, págs. 16 823-16 827, sep. de 2010, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1011099107](https://doi.org/10.1073/pnas.1011099107).
- [28] W. Jiang, J. Hermolin y R. H. Fillingame, «The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, n.º 9, págs. 4966-4971, abr. de 2001, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.081424898](https://doi.org/10.1073/pnas.081424898).
- [29] D. Pogoryelov, J. Yu, T. Meier, J. Vonck, P. Dimroth y D. J. Muller, «The c₁₅ ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F₁/F₀ symmetry mismatch is not obligatory,» *EMBO reports*, vol. 6, n.º 11, págs. 1040-1044, nov. de 2005, ISSN: 1469-221X, 1469-3178. DOI: [10.1038/sj.embor.7400517](https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400517).

- [30] D. Pogoryelov, Ö. Yildiz, J. D. Faraldo-Gómez y T. Meier, «High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase,» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 16, n.º 10, págs. 1068-1073, oct. de 2009, ISSN: 1545-9993, 1545-9985. DOI: [10.1038/nsmb.1678](https://doi.org/10.1038/nsmb.1678).
- [31] R. Lightowers, S. Howitt, L. Hatch, F. Gibson y G. Cox, «The proton pore in the Escherichia coli F₀F₁-ATPase: A requirement for arginine at position 210 of the a-subunit,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 894, n.º 3, págs. 399-406, dic. de 1987, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(87\)90118-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90118-6).
- [32] S. M. Howitt y G. B. Cox, «Second-site revertants of an arginine-210 to lysine mutation in the a subunit of the F₀F₁-ATPase from Escherichia coli: Implications for structure.,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, n.º 20, págs. 9799-9803, oct. de 1992, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.89.20.9799](https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9799).
- [33] B. D. Cain y R. D. Simoni, «Impaired proton conductivity resulting from mutations in the a subunit of F₁F₀ ATPase in Escherichia coli,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, n.º 22, págs. 10 043-10 050, ago. de 1986, ISSN: 0021-9258.
- [34] M. Allegretti, N. Klusch, D. J. Mills, J. Vonck, W. Kühlbrandt y K. M. Davies, «Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase,» *Nature*, vol. 521, n.º 7551, págs. 237-240, mayo de 2015, ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/nature14185](https://doi.org/10.1038/nature14185).
- [35] J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter y J. E. Walker, «Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria,» *Nature*, vol. 370, n.º 6491, págs. 621-628, ago. de 1994, ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/370621a0](https://doi.org/10.1038/370621a0).
- [36] Y. Shirakihara et al., «The crystal structure of the nucleotide-free A₃ β 3 sub-complex of F₁-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer,» *Structure*, vol. 5, n.º 6, págs. 825-836, jun. de 1997, ISSN: 09692126. DOI: [10.1016/S0969-2126\(97\)00236-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00236-0).
- [37] E. López-Pérez et al., «Ordered-domain unfolding of thermophilic isolated β subunit ATP synthase,» *Protein Science*, vol. 32, n.º 7, e4689, jul. de 2023, ISSN: 0961-8368, 1469-896X. DOI: [10.1002/pro.4689](https://doi.org/10.1002/pro.4689).
- [38] M. Tanigawara et al., «Role of the DELSEED Loop in Torque Transmission of F₁-ATPase,» *Biophysical Journal*, vol. 103, n.º 5, págs. 970-978, sep. de 2012, ISSN: 00063495. DOI: [10.1016/j.bpj.2012.06.054](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.06.054).
- [39] R. Watanabe, K. Koyasu, H. You, M. Tanigawara y H. Noji, «Torque Transmission Mechanism via DELSEED Loop of F₁-ATPase,» *Biophysical Journal*, vol. 108, n.º 5, págs. 1144-1152, mar. de 2015, ISSN: 00063495. DOI: [10.1016/j.bpj.2015.01.017](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.017).

- [40] Y. Milgrom, L. Ehler y P. Boyer, «ATP binding at noncatalytic sites of soluble chloroplast F1-ATPase is required for expression of the enzyme activity.,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, n.º 31, págs. 18 725-18 728, nov. de 1990, ISSN: 00219258. DOI: [10.1016/S0021-9258\(17\)30568-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30568-9).
- [41] J. M. Jault y W. S. Allison, «Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F1-ATPase,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, n.º 3, págs. 1558-1566, ene. de 1993, ISSN: 0021-9258.
- [42] T. Matsui, E. Muneyuki, M. Honda, W. S. Allison, C. Dou y M. Yoshida, «Catalytic Activity of the $A3\beta3\gamma$ Complex of F1-ATPase without Noncatalytic Nucleotide Binding Site,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n.º 13, págs. 8215-8221, mar. de 1997, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.272.13.8215](https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8215).
- [43] J. Walker, M. Saraste, M. Runswick y N. Gay, «Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.,» *The EMBO Journal*, vol. 1, n.º 8, págs. 945-951, ago. de 1982, ISSN: 02614189. DOI: [10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x).
- [44] B. A. Feniouk, T. Suzuki y M. Yoshida, «The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1757, n.º 5-6, págs. 326-338, mayo de 2006, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/j.bbabi.2006.03.022](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.022).
- [45] M. Yoshida, H. Okamoto, N. Sone, H. Hirata e Y. Kagawa, «Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits.,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, n.º 3, págs. 936-940, mar. de 1977, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.74.3.936](https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.936).
- [46] P. Sternweis, «The epsilon subunit of Escherichia coli coupling factor 1 is required for its binding to the cytoplasmic membrane.,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 253, n.º 9, págs. 3123-3128, mayo de 1978, ISSN: 00219258. DOI: [10.1016/S0021-9258\(17\)40811-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40811-8).
- [47] R. Aggeler y R. Capaldi, «ATP hydrolysis-linked structural changes in the N-terminal part of the gamma subunit of Escherichia coli F1-ATPase examined by cross-linking studies,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, n.º 20, págs. 14 576-14 578, jul. de 1993, ISSN: 00219258. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)82368-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82368-7).
- [48] P. Turina y R. Capaldi, «ATP hydrolysis-driven structural changes in the gamma-subunit of Escherichia coli ATPase monitored by fluorescence from probes bound at introduced cysteine residues.,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n.º 18, págs. 13 465-13 471, mayo de 1994, ISSN: 00219258. DOI: [10.1016/S0021-9258\(17\)36855-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36855-2).

- [49] M. Zarco-Zavala, E. Morales-Ríos, G. Mendoza-Hernández, L. Ramírez-Silva, G. Pérez-Hernández y J. J. García-Trejo, «The ζ Subunit of the F₁F₀-ATP Synthase of α -Proteobacteria Controls Rotation of the Nanomotor with a Different Structure,» *FASEB Journal*, vol. 28, n.º 5, págs. 2146-2157, 2014, ISSN: 15306860. DOI: [10.1096/fj.13-241430](https://doi.org/10.1096/fj.13-241430).
- [50] J. B. Smith, P. C. Sternweis y L. A. Heppel, «Partial purification of active delta and epsilon subunits of the membrane ATPase from escherichia coli,» *Journal of Supramolecular Structure*, vol. 3, n.º 3, págs. 248-255, 1975, ISSN: 0091-7419, 1547-9366. DOI: [10.1002/jss.400030307](https://doi.org/10.1002/jss.400030307).
- [51] P. P. Laget y J. B. Smith, «Inhibitory properties of endogenous subunit ϵ in the Escherichia coli F₁ ATPase,» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 197, n.º 1, págs. 83-89, oct. de 1979, ISSN: 00039861. DOI: [10.1016/0003-9861\(79\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90222-4).
- [52] S. Wilkens, D. Borchardt, J. Weber y A. E. Senior, «Structural Characterization of the Interaction of the δ and α Subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP Synthase by NMR Spectroscopy,» *Biochemistry*, vol. 44, n.º 35, págs. 11 786-11 794, sep. de 2005, ISSN: 0006-2960, 1520-4995. DOI: [10.1021/bi0510678](https://doi.org/10.1021/bi0510678).
- [53] D. M. Rees, A. G. W. Leslie y J. E. Walker, «The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n.º 51, págs. 21 597-21 601, dic. de 2009, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.0910365106](https://doi.org/10.1073/pnas.0910365106).
- [54] B. J. Murphy, N. Klusch, J. Langer, D. J. Mills, Ö. Yildiz y W. Kühlbrandt, «Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible F₁-F₀ coupling,» *Science*, vol. 364, n.º 6446, eaaw9128, jun. de 2019, ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.aaw9128](https://doi.org/10.1126/science.aaw9128).
- [55] S. Wilkens y R. A. Capaldi, «ATP synthase's second stalk comes into focus,» *Nature*, vol. 393, n.º 6680, págs. 29-29, mayo de 1998, ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/29908](https://doi.org/10.1038/29908).
- [56] A. Hahn, J. Vonck, D. J. Mills, T. Meier y W. Kühlbrandt, «Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase,» *Science*, vol. 360, n.º 6389, eaat4318, mayo de 2018, ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.aat4318](https://doi.org/10.1126/science.aat4318).
- [57] M. Sobti et al., «Cryo-EM structures of the autoinhibited E. coli ATP synthase in three rotational states,» *eLife*, vol. 5, e21598, dic. de 2016, ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.21598](https://doi.org/10.7554/eLife.21598).

- [58] T. Meier, P. Polzer, K. Diederichs, W. Welte y P. Dimroth, «Structure of the Rotor Ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*,» *Science*, vol. 308, n.º 5722, págs. 659-662, abr. de 2005, ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.1111199](https://doi.org/10.1126/science.1111199).
- [59] L. Preiss, Ö. Yildiz, D. B. Hicks, T. A. Krulwich y T. Meier, «A New Type of Proton Coordination in an F1Fo-ATP Synthase Rotor Ring,» *PLoS Biology*, vol. 8, n.º 8, J. Kuriyan, ed., e1000443, ago. de 2010, ISSN: 1545-7885. DOI: [10.1371/journal.pbio.1000443](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000443).
- [60] D. Pogoryelov, A. Krah, J. D. Langer, Ö. Yildiz, J. D. Faraldo-Gómez y T. Meier, «Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the Fo complex of ATP synthases,» *Nature Chemical Biology*, vol. 6, n.º 12, págs. 891-899, dic. de 2010, ISSN: 1552-4450, 1552-4469. DOI: [10.1038/nchembio.457](https://doi.org/10.1038/nchembio.457).
- [61] J. Symersky et al., «Structure of the c10 ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation,» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 19, n.º 5, págs. 485-491, mayo de 2012, ISSN: 1545-9993, 1545-9985. DOI: [10.1038/nsmb.2284](https://doi.org/10.1038/nsmb.2284).
- [62] Y. Ito, T. Oroguchi y M. Ikeguchi, «Mechanism of the Conformational Change of the F₁-ATPase β Subunit Revealed by Free Energy Simulations,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, n.º 10, págs. 3372-3380, mar. de 2011, ISSN: 0002-7863, 1520-5126. DOI: [10.1021/ja1070152](https://doi.org/10.1021/ja1070152).
- [63] M. Kobayashi, H. Akutsu, T. Suzuki, M. Yoshida y H. Yagi, «Analysis of the Open and Closed Conformations of the β Subunits in Thermophilic F1-ATPase by Solution NMR,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 398, n.º 2, págs. 189-199, abr. de 2010, ISSN: 00222836. DOI: [10.1016/j.jmb.2010.03.013](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.013).
- [64] R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita y H. Itoh, «Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase,» *Nature*, vol. 410, n.º 6831, págs. 898-904, abr. de 2001, ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/35073513](https://doi.org/10.1038/35073513).
- [65] T. Nishizaka et al., «Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation,» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 11, n.º 2, págs. 142-148, feb. de 2004, ISSN: 1545-9993, 1545-9985. DOI: [10.1038/nsmb721](https://doi.org/10.1038/nsmb721).
- [66] K. Adachi et al., «Coupling of Rotation and Catalysis in F1-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation,» *Cell*, vol. 130, n.º 2, págs. 309-321, jul. de 2007, ISSN: 00928674. DOI: [10.1016/j.cell.2007.05.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.020).

- [67] T. Bilyard et al., «High-resolution single-molecule characterization of the enzymatic states in *Escherichia coli* F₁-ATPase,» *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 368, n.º 1611, pág. 20 120 023, feb. de 2013, ISSN: 0962-8436, 1471-2970. DOI: [10.1098/rstb.2012.0023](https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0023).
- [68] B. C. Steel, A. L. Nord, Y. Wang, V. Pagadala, D. M. Mueller y R. M. Berry, «Comparison between single-molecule and X-ray crystallography data on yeast F₁-ATPase,» *Scientific Reports*, vol. 5, n.º 1, pág. 8773, mar. de 2015, ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep08773](https://doi.org/10.1038/srep08773).
- [69] M. Sobti, H. Ueno, H. Noji y A. G. Stewart, «The six steps of the complete F₁-ATPase rotary catalytic cycle,» *Nature Communications*, vol. 12, n.º 1, pág. 4690, ago. de 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-021-25029-0](https://doi.org/10.1038/s41467-021-25029-0).
- [70] M. Zarco-Zavala et al., «The 3 × 120° rotary mechanism of *Paracoccus denitrificans* F₁-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F₁-ATPases,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, n.º 47, págs. 29 647-29 657, nov. de 2020, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.2003163117](https://doi.org/10.1073/pnas.2003163117).
- [71] D. A. Cherepanov, A. Y. Mulkidjanian y W. Junge, «Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase,» *FEBS Letters*, vol. 449, n.º 1, págs. 1-6, abr. de 1999, ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/S0014-5793\(99\)00386-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00386-5).
- [72] O. Pänke y B. Rumberg, «Kinetic modeling of rotary CF₀F₁-ATP synthase: Storage of elastic energy during energy transduction,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1412, n.º 2, págs. 118-128, jun. de 1999, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/S0005-2728\(99\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00059-6).
- [73] K. Ugurbil, H. Rottenberg, P. Glynn y R. G. Shulman, «³¹P nuclear magnetic resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 75, n.º 5, págs. 2244-2248, mayo de 1978, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.75.5.2244](https://doi.org/10.1073/pnas.75.5.2244).
- [74] K. R. Dunham y B. R. Selman, «Interactions of inorganic phosphate with spinach coupling factor 1. Effects on ATPase and ADP binding activities,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 256, n.º 19, págs. 10 044-10 049, oct. de 1981, ISSN: 0021-9258.
- [75] J. J. Czarnecki, K. R. Dunham y B. R. Selman, «Photoaffinity labeling of the tight ADP binding site of the chloroplast coupling factor one (CF₁): The effect on the CF₁-ATPase activity,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 809, n.º 1, págs. 51-56, ago. de 1985, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(85\)90166-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(85)90166-5).

- [76] J. Zhou, Z. Xue, Z. Du, T. Melese y P. D. Boyer, «Relationship of tightly bound ADP and ATP to control and catalysis by chloroplast ATP synthase,» *Biochemistry*, vol. 27, n.º 14, págs. 5129-5135, jul. de 1988, ISSN: 0006-2960, 1520-4995. DOI: [10.1021/bi00414a027](https://doi.org/10.1021/bi00414a027).
- [77] I. Drobinskaya, I. Kozlov, M. Murataliev y E. Vulfson, «Tightly bound adenosine diphosphate, which inhibits the activity of mitochondrial F₁-ATPase, is located at the catalytic site of the enzyme,» *FEBS Letters*, vol. 182, n.º 2, págs. 419-424, mar. de 1985, ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/0014-5793\(85\)80346-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80346-X).
- [78] A. Melandri, D. Zannoni y B. Melandri, «Energy transduction in photosynthetic bacteria VI. Respiratory sites of energy conservation in membranes from dark-grown cells of *Rhodospseudomonas capsulata*,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 314, n.º 3, págs. 298-311, sep. de 1973, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(73\)90114-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90114-X).
- [79] M. Yoshida y W. S. Allison, «Characterization of the catalytic and noncatalytic ADP binding sites of the F₁-ATPase from the thermophilic bacterium, PS3.,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, n.º 13, págs. 5714-5721, mayo de 1986, ISSN: 00219258. DOI: [10.1016/S0021-9258\(17\)38441-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38441-7).
- [80] A. Fitin, E. Vasilyeva y A. Vinogradov, «An inhibitory high affinity binding site for ADP in the oligomycin-sensitive ATPase of beef heart submitochondrial particles,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 86, n.º 2, págs. 434-439, ene. de 1979, ISSN: 0006291X. DOI: [10.1016/0006-291X\(79\)90884-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90884-2).
- [81] I. Minkov, A. Fitin, E. Vasilyeva y A. Vinogradov, «Mg²⁺-Induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor F₁,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 89, n.º 4, págs. 1300-1306, ago. de 1979, ISSN: 0006291X. DOI: [10.1016/0006-291X\(79\)92150-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)92150-8).
- [82] O. Roveri, J. Muller, J. Wilms y E. Slater, «The pre-steady state and steady-state kinetics of the ATPase activity of mitochondrial F₁,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 589, n.º 2, págs. 241-255, feb. de 1980, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(80\)90041-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(80)90041-9).
- [83] A. S. Lapashina y B. A. Feniouk, «ADP-Inhibition of H⁺-FOF₁-ATP Synthase,» *Biochemistry (Moscow)*, vol. 83, n.º 10, págs. 1141-1160, oct. de 2018, ISSN: 0006-2979, 1608-3040. DOI: [10.1134/S0006297918100012](https://doi.org/10.1134/S0006297918100012).
- [84] B. A. Feniouk, T. Suzuki y M. Yoshida, «Regulatory Interplay between Proton Motive Force, ADP, Phosphate, and Subunit ϵ in Bacterial ATP Synthase,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, n.º 1, págs. 764-772, ene. de 2007, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M606321200](https://doi.org/10.1074/jbc.M606321200).

- [85] S. Bandyopadhyay, E. Muneyuki y W. S. Allison, «The Characteristics of the ($\alpha^{V371}C$)₃($\beta^{R337}C$)₃ γ Double Mutant Subcomplex of the TF₁-ATPase Indicate that the Catalytic Site at the α_{TP} - β_{TP} Interface with Bound MgADP in Crystal Structures of MF₁ Represents a Catalytic Site Containing Inhibitory MgADP,» *Biochemistry*, vol. 44, n.º 7, págs. 2441-2448, feb. de 2005, ISSN: 0006-2960, 1520-4995. DOI: [10.1021/bi047694z](https://doi.org/10.1021/bi047694z).
- [86] Y. Hirono-Hara, K. Ishizuka, K. Kinoshita, M. Yoshida y H. Noji, «Activation of pausing F₁ motor by external force,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, n.º 12, págs. 4288-4293, mar. de 2005, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.0406486102](https://doi.org/10.1073/pnas.0406486102).
- [87] J.-M. Jault et al., «The .alpha.3.beta.3.gamma. complex of the F1-ATPase from thermophilic Bacillus PS3 containing the .alpha.D261N substitution fails to dissociate inhibitory MgADP from a catalytic site when ATP binds to noncatalytic sites,» *Biochemistry*, vol. 34, n.º 50, págs. 16 412-16 418, dic. de 1995, ISSN: 0006-2960, 1520-4995. DOI: [10.1021/bi00050a023](https://doi.org/10.1021/bi00050a023).
- [88] Y. M. Milgrom y T. M. Duncan, «F-ATP-ase of Escherichia coli membranes: The ubiquitous MgADP-inhibited state and the inhibited state induced by the ϵ -subunit's C-terminal domain are mutually exclusive,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1861, n.º 7, pág. 148 189, jul. de 2020, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/j.bbabi.2020.148189](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148189).
- [89] U. Junesch y P. Gräber, «Influence of the redox state and the activation of the chloroplast ATP synthase on proton-transport-coupled ATP synthesis/hydrolysis,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 893, n.º 2, págs. 275-288, sep. de 1987, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(87\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90049-1).
- [90] C. M. Nalin y R. E. McCarty, «Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, n.º 11, págs. 7275-7280, jun. de 1984, ISSN: 0021-9258.
- [91] D. W. McKinney, B. B. Buchanan y R. A. Wolosiuk, «Activation of chloroplast ATPase by reduced thioredoxin,» *Phytochemistry*, vol. 17, n.º 4, págs. 794-795, ene. de 1978, ISSN: 00319422. DOI: [10.1016/S0031-9422\(00\)94230-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94230-4).
- [92] G. Grüber, J. Godovac-Zimmermann y T. Nawroth, «ATP synthesis and hydrolysis of the ATP-synthase from Micrococcus luteus regulated by an inhibitor subunit and membrane energization,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1186, n.º 1-2, págs. 43-51, jun. de 1994, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/0005-2728\(94\)90133-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90133-3).

- [93] G. Grüber, S. Engelbrecht, W. Junge, K. Dose y T. Nawroth, «Purification characterization of the inhibitory subunit (δ) of the ATP-synthase from *Micrococcus luteus*,» *FEBS Letters*, vol. 356, n.º 2-3, págs. 226-228, dic. de 1994, ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/0014-5793\(94\)01271-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01271-7).
- [94] A. Hotra et al., «Deletion of a unique loop in the mycobacterial F-ATP synthase γ subunit sheds light on its inhibitory role in ATP hydrolysis-driven H^+ pumping,» *The FEBS Journal*, vol. 283, n.º 10, págs. 1947-1961, mayo de 2016, ISSN: 1742464X. DOI: [10.1111/febs.13715](https://doi.org/10.1111/febs.13715).
- [95] P. Rangunathan et al., «The uniqueness of subunit α of mycobacterial F-ATP synthases: An evolutionary variant for niche adaptation,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, n.º 27, págs. 11 262-11 279, jul. de 2017, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M117.784959](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784959).
- [96] M. E. Pullman y G. C. Monroy, «A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 238, págs. 3762-9, nov. de 1963, ISSN: 0021-9258. PMID: [14109217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14109217/).
- [97] E. Cabezón, I. Arechaga, P. Jonathan, G. Butler y J. E. Walker, «Dimerization of Bovine F1-ATPase by Binding the Inhibitor Protein, IF1,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n.º 37, págs. 28 353-28 355, sep. de 2000, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.C000427200](https://doi.org/10.1074/jbc.C000427200).
- [98] D. J. Gordon-Smith et al., «Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF1: The inhibitor protein of F1 ATPase1 1Edited by M. F. Summers,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 308, n.º 2, págs. 325-339, abr. de 2001, ISSN: 00222836. DOI: [10.1006/jmbi.2001.4570](https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4570).
- [99] J. Sah, C. Kumar y P. Mohanty, «pH-Dependent Conformational Changes Modulate Functional Activity of the Mitochondrial ATPase Inhibitor Protein,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 194, n.º 3, págs. 1521-1528, ago. de 1993, ISSN: 0006291X. DOI: [10.1006/bbrc.1993.1997](https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1997).
- [100] M. V. Panchenko y A. D. Vinogradov, «Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein: Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein,» *FEBS Letters*, vol. 184, n.º 2, págs. 226-230, mayo de 1985, ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/0014-5793\(85\)80611-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80611-6).
- [101] E. Cabezón, M. J. Runswick, A. G. Leslie y J. E. Walker, «The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase,» *The EMBO journal*, vol. 20, n.º 24, págs. 6990-6996, dic. de 2001, ISSN: 0261-4189. DOI: [10.1093/emboj/20.24.6990](https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6990).

- [102] E. Cabezon, P. J. G. Butler, M. J. Runswick y J. E. Walker, «Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F₁-ATPase Inhibitor Protein, IF₁, by pH,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n.º 33, págs. 25 460-25 464, ago. de 2000, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M003859200](https://doi.org/10.1074/jbc.M003859200).
- [103] J. J. García, E. Morales-Ríos, P. Cortés-Hernández y J. S. Rodríguez-Zavala, «The Inhibitor Protein (IF₁) Promotes Dimerization of the Mitochondrial F₁F₀-ATP Synthase,» *Biochemistry*, vol. 45, n.º 42, págs. 12 695-12 703, oct. de 2006, ISSN: 0006-2960, 1520-4995. DOI: [10.1021/bi060339j](https://doi.org/10.1021/bi060339j).
- [104] F. Minauro-Sanmiguel, C. Bravo y J. J. García, «Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF₁) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase,» *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 34, n.º 6, págs. 433-443, dic. de 2002, ISSN: 0145-479X. DOI: [10.1023/a:1022514008462](https://doi.org/10.1023/a:1022514008462).
- [105] J. V. Bason, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie y J. E. Walker, «Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F₁-ATPase,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, n.º 31, págs. 11 305-11 310, ago. de 2014, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1411560111](https://doi.org/10.1073/pnas.1411560111).
- [106] R. Kobayashi, S. Mori, H. Ueno y H. Noji, «Kinetic analysis of the inhibition mechanism of bovine mitochondrial F₁-ATPase inhibitory protein using biochemical assay,» *The Journal of Biochemistry*, vol. 170, n.º 1, págs. 79-87, sep. de 2021, ISSN: 0021-924X, 1756-2651. DOI: [10.1093/jb/mvab022](https://doi.org/10.1093/jb/mvab022).
- [107] F. Mendoza-Hoffmann, M. Zarco-Zavala, R. Ortega y J. J. García-Trejo, «Control of rotation of the F₁F₀-ATP synthase nanomotor by an inhibitory α -helix from unfolded ϵ or intrinsically disordered ζ and IF₁ proteins,» *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 50, n.º 5, págs. 403-424, oct. de 2018, ISSN: 0145-479X, 1573-6881. DOI: [10.1007/s10863-018-9773-9](https://doi.org/10.1007/s10863-018-9773-9).
- [108] T. Suzuki, K. Tanaka, C. Wakabayashi, E.-i. Saita y M. Yoshida, «Chemomechanical coupling of human mitochondrial F₁-ATPase motor,» *Nature Chemical Biology*, vol. 10, n.º 11, págs. 930-936, nov. de 2014, ISSN: 1552-4450, 1552-4469. DOI: [10.1038/nchembio.1635](https://doi.org/10.1038/nchembio.1635).
- [109] I. Husain y D. A. Harris, «ATP synthesis and hydrolysis in submitochondrial particles subjected to an acid-base transition: Effects of the ATPase inhibitor protein,» *FEBS Letters*, vol. 160, n.º 1-2, págs. 110-114, ago. de 1983, ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/0014-5793\(83\)80947-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80947-8).
- [110] Y. Kato-Yamada, D. Bald, M. Koike, K. Motohashi, T. Hisabori y M. Yoshida, « ϵ Subunit, an Endogenous Inhibitor of Bacterial F₁-ATPase, Also Inhibits F₀F₁-ATPase,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 48, págs. 33 991-33 994, nov. de 1999, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.274.48.33991](https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33991).

- [111] T. Suzuki et al., «F₀F₁-ATPase/Synthase Is Geared to the Synthesis Mode by Conformational Rearrangement of ϵ Subunit in Response to Proton Motive Force and ADP/ATP Balance,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n.º 47, págs. 46 840-46 846, nov. de 2003, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M307165200](https://doi.org/10.1074/jbc.M307165200).
- [112] S. P. Tsunoda, A. J. W. Rodgers, R. Aggeler, M. C. J. Wilce, M. Yoshida y R. A. Capaldi, «Large conformational changes of the ϵ subunit in the bacterial F₁ F₀ ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, n.º 12, págs. 6560-6564, jun. de 2001, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.111128098](https://doi.org/10.1073/pnas.111128098).
- [113] G. Cingolani y T. M. Duncan, «Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation,» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 18, n.º 6, págs. 701-707, jun. de 2011, ISSN: 1545-9993, 1545-9985. DOI: [10.1038/nsmb.2058](https://doi.org/10.1038/nsmb.2058).
- [114] H. Yagi et al., «Structures of the thermophilic F₁-ATPase ϵ subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n.º 27, págs. 11 233-11 238, jul. de 2007, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.0701045104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701045104).
- [115] F. Kadoya, S. Kato, K. Watanabe e Y. Kato-Yamada, «ATP binding to the ϵ subunit of thermophilic ATP synthase is crucial for efficient coupling of ATPase and H⁺ pump activities,» *Biochemical Journal*, vol. 437, n.º 1, págs. 135-140, jul. de 2011, ISSN: 0264-6021, 1470-8728. DOI: [10.1042/BJ20110443](https://doi.org/10.1042/BJ20110443).
- [116] S. Kato, M. Yoshida e Y. Kato-Yamada, «Role of the ϵ Subunit of Thermophilic F₁-ATPase as a Sensor for ATP,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, n.º 52, págs. 37 618-37 623, dic. de 2007, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M707509200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707509200).
- [117] Y. Kato-Yamada, «Isolated ϵ subunit of *Bacillus subtilis* F₁-ATPase binds ATP,» *FEBS Letters*, vol. 579, n.º 30, págs. 6875-6878, dic. de 2005, ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/j.febslet.2005.11.036](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.036).
- [118] A. Krah et al., «A second shell residue modulates a conserved ATP-binding site with radically different affinities for ATP,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1865, n.º 1, pág. 129 766, ene. de 2021, ISSN: 03044165. DOI: [10.1016/j.bbagen.2020.129766](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129766).
- [119] A. Krah, T. Vogelaar, S. I. De Jong, J. K. Claridge, P. J. Bond y D. G. G. McMillan, «ATP Binding by an F₁F₀ ATP Synthase ϵ Subunit Is pH Dependent, Suggesting a Diversity of ϵ Subunit Functional Regulation in Bacteria,» *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 10, pág. 1 059 673, feb. de 2023, ISSN: 2296-889X. DOI: [10.3389/fmolb.2023.1059673](https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1059673).

- [120] C. W. Mullineaux, «Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1837, n.º 4, págs. 503-511, abr. de 2014, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/j.bbabi.2013.11.017](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.017).
- [121] E.-I. Sunamura, H. Konno, M. Imashimizu-Kobayashi, Y. Sugano y T. Hisabori, «Physiological Impact of Intrinsic ADP Inhibition of Cyanobacterial FoF1 Conferred by the Inherent Sequence Inserted into the γ Subunit,» *Plant and Cell Physiology*, vol. 51, n.º 6, págs. 855-865, jun. de 2010, ISSN: 1471-9053, 0032-0781. DOI: [10.1093/pcp/pcq061](https://doi.org/10.1093/pcp/pcq061).
- [122] M. Imashimizu et al., «Regulation of F0F1-ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by γ and ϵ Subunits Is Significant for Light/Dark Adaptation,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n.º 30, págs. 26 595-26 602, jul. de 2011, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M111.234138](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234138).
- [123] K. Song et al., «Atp Θ is an inhibitor of F0F1 ATP synthase to arrest ATP hydrolysis during low-energy conditions in cyanobacteria,» *Current Biology*, vol. 32, n.º 1, 136-148.e5, ene. de 2022, ISSN: 09609822. DOI: [10.1016/j.cub.2021.10.051](https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.051).
- [124] M. F. De la Rosa-Morales, «Composicion de Subunidades y Mecanismos de Regulacion de La F1FO ATP Sintasa de *Paracoccus Denitrificans*,» Tesis doct., UNAM, jul. de 2005.
- [125] E. Morales-Ríos et al., «A Novel 11-kDa Inhibitory Subunit in the F1FO ATP Synthase of *Paracoccus Denitrificans* and Related α -proteobacteria,» *The FASEB Journal*, vol. 24, n.º 2, págs. 599-608, feb. de 2010, ISSN: 0892-6638. DOI: [10.1096/fj.09-137356](https://doi.org/10.1096/fj.09-137356).
- [126] P. Serrano, M. Geralt, B. Mohanty y K. Wüthrich, «NMR Structures of α -Proteobacterial ATPase-Regulating ζ -Subunits,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 426, n.º 14, págs. 2547-2553, jul. de 2014, ISSN: 00222836. DOI: [10.1016/j.jmb.2014.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.004).
- [127] J. J. García-Trejo, M. Zarco-Zavala, F. Mendoza-Hoffmann, E. Hernández-Luna, R. Ortega y G. Mendoza-Hernández, «The Inhibitory Mechanism of the ζ Subunit of the F1FO-ATPase Nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and Related α -Proteobacteria,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, n.º 2, págs. 538-546, ene. de 2016, ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M115.688143](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688143).
- [128] M. Zarco-Zavala, F. Mendoza-Hoffmann y J. J. García-Trejo, «Unidirectional regulation of the F1FO-ATP synthase nanomotor by the ζ pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1859, n.º 9, págs. 762-774, sep. de 2018, ISSN: 00052728. DOI: [10.1016/j.bbabi.2018.06.005](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.06.005).

- [129] F. Mendoza-Hoffmann et al., «The Biological Role of the ζ Subunit as Unidirectional Inhibitor of the F1FO-ATPase of *Paracoccus denitrificans*,» *Cell Reports*, vol. 22, n.º 4, págs. 1067-1078, ene. de 2018, ISSN: 22111247. DOI: [10.1016/j.celrep.2017.12.106](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.106).
- [130] F. Mendoza-Hoffmann, M. Zarco-Zavala, R. Ortega, H. Celis-Sandoval, A. Torres-Larios y J. García-Trejo, «Evolution of the Inhibitory and Non-Inhibitory ϵ , ζ , and IF1 Subunits of the F1FO-ATPase as Related to the Endosymbiotic Origin of Mitochondria,» *Microorganisms*, vol. 10, n.º 7, pág. 1372, jul. de 2022, ISSN: 2076-2607. DOI: [10.3390/microorganisms10071372](https://doi.org/10.3390/microorganisms10071372).
- [131] M. Zarco-Zavala, «Caracterización Del Nuevo Mecanismo de Control de La F1FO ATPasa de La A-Proteobacteria *Paracoccus Denitrificans* Mediado Por La Subunidad Z,» Tesis doct., UNAM, 2014.
- [132] E. Morales-Rios, «Clonación, Sobreexpresión, Purificación y Caracterización de Las Subunidades ϵ y de 11 kDa Presentes En La ATP Sintasa de *Paracoccus Denitrificans*,» Tesis doct., UNAM, 2011.
- [133] The UniProt Consortium et al., «UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021,» *Nucleic Acids Research*, vol. 49, n.º D1, págs. D480-D489, ene. de 2021, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: [10.1093/nar/gkaa1100](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100).
- [134] R. D. Finn et al., «HMMER web server: 2015 update,» *Nucleic Acids Research*, vol. 43, n.º W1, W30-W38, jul. de 2015, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: [10.1093/nar/gkv397](https://doi.org/10.1093/nar/gkv397).
- [135] Y. Huang, B. Niu, Y. Gao, L. Fu y W. Li, «CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences,» *Bioinformatics*, vol. 26, n.º 5, págs. 680-682, mar. de 2010, ISSN: 1460-2059, 1367-4803. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq003](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003).
- [136] K. Katoh y D. M. Standley, «MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability,» *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, n.º 4, págs. 772-780, abr. de 2013, ISSN: 0737-4038, 1537-1719. DOI: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010).
- [137] H. Ashkenazy et al., «ConSurf 2016: An improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules,» *Nucleic Acids Research*, vol. 44, n.º W1, W344-W350, jul. de 2016, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: [10.1093/nar/gkw408](https://doi.org/10.1093/nar/gkw408).
- [138] E. F. Pettersen et al., «UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis,» *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, n.º 13, págs. 1605-1612, oct. de 2004, ISSN: 0192-8651, 1096-987X. DOI: [10.1002/jcc.20084](https://doi.org/10.1002/jcc.20084).
- [139] *Schrödinger*, «The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1,» 2019.

- [140] S. S. Petrova y A. D. Solov'ev, «The Origin of the Method of Steepest Descent,» *Historia Mathematica*, vol. 24, n.º 4, págs. 361-375, nov. de 1997, ISSN: 03150860. DOI: [10.1006/hmat.1996.2146](https://doi.org/10.1006/hmat.1996.2146).
- [141] M. Hestenes y E. Stiefel, «Methods of Conjugate Gradients for Solving Linear Systems,» *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, vol. 49, n.º 6, pág. 409, dic. de 1952, ISSN: 0091-0635. DOI: [10.6028/jres.049.044](https://doi.org/10.6028/jres.049.044).
- [142] C.-H. Ngan, D. R. Hall, B. Zerbe, L. E. Grove, D. Kozakov y S. Vajda, «FTSite: High Accuracy Detection of Ligand Binding Sites on Unbound Protein Structures,» *Bioinformatics*, vol. 28, n.º 2, págs. 286-287, ene. de 2012, ISSN: 1460-2059. DOI: [10.1093/bioinformatics/btr651](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr651).
- [143] D. Kozakov et al., «The FTMap Family of Web Servers for Determining and Characterizing Ligand-Binding Hot Spots of Proteins,» *Nature Protocols*, vol. 10, n.º 5, págs. 733-755, mayo de 2015, ISSN: 1754-2189. DOI: [10.1038/nprot.2015.043](https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043).
- [144] R. Anandakrishnan, B. Aguilar y A. V. Onufriev, «H++ 3.0: Automating pK Prediction and the Preparation of Biomolecular Structures for Atomistic Molecular Modeling and Simulations,» *Nucleic Acids Research*, vol. 40, n.º W1, W537-W541, jul. de 2012, ISSN: 0305-1048. DOI: [10.1093/nar/gks375](https://doi.org/10.1093/nar/gks375).
- [145] M. McGann, «FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy,» *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 51, n.º 3, págs. 578-596, mar. de 2011, ISSN: 1549-9596. DOI: [10.1021/ci100436p](https://doi.org/10.1021/ci100436p).
- [146] OpenEye Scientific Software Inc., *OEDOCKING 4.0.0.0*.
- [147] O. Trott y A. J. Olson, «AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,» *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA, 2009, ISSN: 01928651, 1096987X. DOI: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334).
- [148] G. M. Morris et al., «AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility,» *Journal of Computational Chemistry*, vol. 30, n.º 16, págs. 2785-2791, dic. de 2009, ISSN: 01928651, 1096987X. DOI: [10.1002/jcc.21256](https://doi.org/10.1002/jcc.21256).
- [149] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek y G. R. Hutchison, «Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform,» *Journal of Cheminformatics*, vol. 4, n.º 1, pág. 17, dic. de 2012, ISSN: 1758-2946. DOI: [10.1186/1758-2946-4-17](https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17).
- [150] A. Jakalian, D. B. Jack y C. I. Bayly, «Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: II. Parameterization and Validation,» *Journal of Computational Chemistry*, vol. 23, n.º 16, págs. 1623-1641, oct. de 2002, ISSN: 01928651. DOI: [10.1002/jcc.10128](https://doi.org/10.1002/jcc.10128).

- [151] OpenEye Scientific Software Inc., «QUAPAC 2.1.2.1,»
- [152] P. C. D. Hawkins, A. G. Skillman, G. L. Warren, B. A. Ellingson y M. T. Stahl, «Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database,» *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 50, n.º 4, págs. 572-584, abr. de 2010, ISSN: 1549-9596. DOI: [10.1021/ci100031x](https://doi.org/10.1021/ci100031x).
- [153] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman y D. A. Case, «Development and Testing of a General Amber Force Field,» *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, n.º 9, págs. 1157-1174, jul. de 2004, ISSN: 0192-8651. DOI: [10.1002/jcc.20035](https://doi.org/10.1002/jcc.20035).
- [154] N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch y G. R. Hutchison, «Open Babel: An open chemical toolbox,» *Journal of Cheminformatics*, vol. 3, n.º 1, pág. 33, dic. de 2011, ISSN: 1758-2946. DOI: [10.1186/1758-2946-3-33](https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33).
- [155] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman y D. A. Case, «Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations,» *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 25, n.º 2, págs. 247-260, oct. de 2006, ISSN: 10933263. DOI: [10.1016/j.jmgm.2005.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005).
- [156] D. A. Case y et al., *AMBER 2021*, San Francisco, 2019.
- [157] C. Tian et al., «ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution,» *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 16, n.º 1, págs. 528-552, ene. de 2020, ISSN: 1549-9618. DOI: [10.1021/acs.jctc.9b00591](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591).
- [158] S. Izadi, R. Anandakrishnan y A. V. Onufriev, «Building Water Models: A Different Approach,» *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 5, n.º 21, págs. 3863-3871, nov. de 2014, ISSN: 1948-7185. DOI: [10.1021/jz501780a](https://doi.org/10.1021/jz501780a).
- [159] R. J. Loncharich, B. R. Brooks y R. W. Pastor, «Langevin Dynamics of Peptides: The Frictional Dependence of Isomerization Rates of N-acetylalanyl-N'-Methylamide,» *Biopolymers*, vol. 32, n.º 5, págs. 523-535, mayo de 1992, ISSN: 0006-3525. DOI: [10.1002/bip.360320508](https://doi.org/10.1002/bip.360320508).
- [160] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola y J. R. Haak, «Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, n.º 8, págs. 3684-3690, oct. de 1984, ISSN: 0021-9606. DOI: [10.1063/1.448118](https://doi.org/10.1063/1.448118).
- [161] T. Darden, D. York y L. Pedersen, «Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, n.º 12, págs. 10 089-10 092, jun. de 1993, ISSN: 0021-9606. DOI: [10.1063/1.464397](https://doi.org/10.1063/1.464397).

- [162] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti y H. J. Berendsen, «Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes,» *Journal of Computational Physics*, vol. 23, n.º 3, págs. 327-341, mar. de 1977, ISSN: 00219991. DOI: [10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).
- [163] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey y M. L. Klein, «Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 79, n.º 2, págs. 926-935, jul. de 1983, ISSN: 0021-9606. DOI: [10.1063/1.445869](https://doi.org/10.1063/1.445869).
- [164] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley y T. Hendrickson, «Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, n.º 16, págs. 6127-6129, ago. de 1990, ISSN: 0002-7863. DOI: [10.1021/ja00172a038](https://doi.org/10.1021/ja00172a038).
- [165] M. F. Adasme et al., «PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA,» *Nucleic Acids Research*, vol. 49, n.º W1, W530-W534, jul. de 2021, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: [10.1093/nar/gkab294](https://doi.org/10.1093/nar/gkab294).
- [166] B. J. Grant, A. P. C. Rodrigues, K. M. ElSawy, J. A. McCammon y L. S. D. Cavas, «Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures,» *Bioinformatics*, vol. 22, n.º 21, págs. 2695-2696, nov. de 2006, ISSN: 1367-4811, 1367-4803. DOI: [10.1093/bioinformatics/btl461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl461).
- [167] GetContacts, *GetContacts*.
- [168] E. F. Pettersen et al., «UCSF ChimeraX : Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers,» *Protein Science*, vol. 30, n.º 1, págs. 70-82, ene. de 2021, ISSN: 0961-8368. DOI: [10.1002/pro.3943](https://doi.org/10.1002/pro.3943).
- [169] B. O. Community, *Blender - a 3D Modelling and Rendering Package*, Stichting Blender Foundation, Amsterdam, 2018.
- [170] H. Wickham, *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016, ISBN: 978-3-319-24277-4.
- [171] H. Schägger y G. von Jagow, «Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa,» *Analytical Biochemistry*, vol. 166, n.º 2, págs. 368-379, nov. de 1987, ISSN: 00032697. DOI: [10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- [172] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall, «Protein measurement with the Folin phenol reagent,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, n.º 1, págs. 265-275, nov. de 1951, ISSN: 0021-9258.
- [173] G. L. Peterson, «A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which Is More Generally Applicable,» *Analytical Biochemistry*, vol. 83, n.º 2, págs. 346-356, dic. de 1977, ISSN: 00032697. DOI: [10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).

- [174] P. Smith et al., «Measurement of protein using bicinchoninic acid,» *Analytical Biochemistry*, vol. 150, n.º 1, págs. 76-85, oct. de 1985, ISSN: 00032697. DOI: [10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- [175] R. E. Brown, K. L. Jarvis y K. J. Hyland, «Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances,» *Analytical Biochemistry*, vol. 180, n.º 1, págs. 136-139, jul. de 1989, ISSN: 00032697. DOI: [10.1016/0003-2697\(89\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90101-2).
- [176] M. E. Pullman, H. S. Penefsky, A. Datta y E. Racker, «Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 235, págs. 3322-3329, nov. de 1960, ISSN: 0021-9258.
- [177] J. Weiser, P. S. Shenkin y W. C. Still, «Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO),» *Journal of Computational Chemistry*, vol. 20, n.º 2, págs. 217-230, ene. de 1999, ISSN: 0192-8651, 1096-987X. DOI: [10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19990130\)20:2<217::AID-JCC4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19990130)20:2<217::AID-JCC4>3.0.CO;2-A).
- [178] F. Mendoza-Hoffmann et al., «Inhibitory to Non-Inhibitory Evolution of the ζ Subunit of the F1FO-ATPase of Paracoccus Denitrificans and α -Proteobacteria as Related to Mitochondrial Endosymbiosis,» *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 10, pág. 1184200, ago. de 2023, ISSN: 2296-889X. DOI: [10.3389/fmolb.2023.1184200](https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1184200).
- [179] E. Padan, D. Zilberstein y S. Schuldiner, «pH homeostasis in bacteria,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, vol. 650, n.º 2-3, págs. 151-166, dic. de 1981, ISSN: 0304-4157. DOI: [10.1016/0304-4157\(81\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(81)90004-6).
- [180] I. R. Booth, «Regulation of cytoplasmic pH in bacteria,» *Microbiological Reviews*, vol. 49, n.º 4, págs. 359-378, dic. de 1985, ISSN: 0146-0749. DOI: [10.1128/mr.49.4.359-378.1985](https://doi.org/10.1128/mr.49.4.359-378.1985).
- [181] B. Baumann, J. R. van der Meer, M. Snozzi y A. J. Zehnder, «Inhibition of denitrification activity but not of mRNA induction in Paracoccus denitrificans by nitrite at a suboptimal pH,» *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 72, n.º 3, págs. 183-189, 1997, ISSN: 0003-6072. DOI: [10.1023/a:1000342125891](https://doi.org/10.1023/a:1000342125891).



OPEN ACCESS

EDITED BY

Boris Feniouk,
Lomonosov Moscow State University,
Russia

REVIEWED BY

Paola Turina,
University of Bologna, Italy
Anna Lapashina,
Lomonosov Moscow State University,
Russia

*CORRESPONDENCE

Francisco Mendoza-Hoffmann,
✉ francisco.mendoza.hoffmann@
uabc.edu.mx
José J. García-Trejo,
✉ jjgartre@unam.mx

†PRESENT ADDRESS

Francisco Mendoza-Hoffmann,
Cuerpo Académico de Microbiología
Aplicada, Facultad de Ciencias Químicas
e Ingeniería, Universidad Autónoma de
Baja California (U.A.B.C.), Tijuana, Baja
California, México
Damiano Buratto,
Institute of Quantitative Biology,
Zhejiang University, Hangzhou, China

†These authors have contributed equally
to this work

RECEIVED 11 March 2023

ACCEPTED 01 August 2023

PUBLISHED 17 August 2023

CITATION

Mendoza-Hoffmann F, Yang L, Buratto D,
Brito-Sánchez J, Garduño-Javier G,
Salinas-López E, Uribe-Álvarez C, Ortega R,
Sotelo-Serrano O, Cevallos MÁ,
Ramírez-Silva L, Uribe-Carvajal S,
Pérez-Hernández G, Celis-Sandoval H and
García-Trejo JJ (2023), Inhibitory to non-
inhibitory evolution of the ζ subunit of the
 F_1F_0 -ATPase of *Paracoccus denitrificans* and
 α -proteobacteria as related to
mitochondrial endosymbiosis.
Front. Mol. Biosci. 10:1184200.
doi: 10.3389/fmolb.2023.1184200

COPYRIGHT

© 2023 Mendoza-Hoffmann, Yang, Buratto,
Brito-Sánchez, Garduño-Javier, Salinas-
López, Uribe-Álvarez, Ortega, Sotelo-
Serrano, Cevallos, Ramírez-Silva, Uribe-
Carvajal, Pérez-Hernández, Celis-Sandoval
and García-Trejo. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s) and
the copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Inhibitory to non-inhibitory evolution of the ζ subunit of the F_1F_0 -ATPase of *Paracoccus denitrificans* and α -proteobacteria as related to mitochondrial endosymbiosis

Francisco Mendoza-Hoffmann^{1,2*†}, Lingyun Yang^{2†},
Damiano Buratto^{3†}, Jorge Brito-Sánchez¹,
Gilberto Garduño-Javier¹, Emiliano Salinas-López¹,
Cristina Uribe-Álvarez⁴, Raquel Ortega¹, Oliver Sotelo-Serrano¹,
Miguel Ángel Cevallos⁵, Leticia Ramírez-Silva⁶,
Salvador Uribe-Carvajal⁴, Gerardo Pérez-Hernández⁷,
Heliodoro Celis-Sandoval⁴ and José J. García-Trejo^{1*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), Ciudad de México, México, ²Human Institute, ShanghaiTech University, Shanghai, China, ³Shanghai Institute for Advanced Immunochemical Studies, ShanghaiTech University, Shanghai, China, ⁴Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), Ciudad de México, México, ⁵Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), Ciudad de México, México, ⁶Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), Ciudad de México, México, ⁷Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México, México

Introduction: The ζ subunit is a potent inhibitor of the F_1F_0 -ATPase of *Paracoccus denitrificans* (PdF₁F₀-ATPase) and related α -proteobacteria different from the other two canonical inhibitors of bacterial (ϵ) and mitochondrial (IF₁) F_1F_0 -ATPases. ζ mimics mitochondrial IF₁ in its inhibitory N-terminus, blocking the PdF₁F₀-ATPase activity as a unidirectional pawl-ratchet and allowing the PdF₁F₀-ATP synthase turnover. ζ is essential for the respiratory growth of *P. denitrificans*, as we showed by a $\Delta\zeta$ knockout. Given the vital role of ζ in the physiology of *P. denitrificans*, here, we assessed the evolution of ζ across the α -proteobacteria class.

Methods: Through bioinformatic, biochemical, molecular biology, functional, and structural analyses of several ζ subunits, we confirmed the conservation of the inhibitory N-terminus of ζ and its divergence toward its C-terminus. We reconstituted homologously or heterologously the recombinant ζ subunits from several α -proteobacteria into the respective F-ATPases, including free-living photosynthetic, facultative symbiont, and intracellular facultative or obligate parasitic α -proteobacteria.

Results and discussion: The results show that ζ evolved, preserving its inhibitory function in free-living α -proteobacteria exposed to broad environmental changes that could compromise the cellular ATP pools. However, the ζ inhibitory function was diminished or lost in some symbiotic α -proteobacteria where ζ is non-

essential given the possible exchange of nutrients and ATP from hosts. Accordingly, the ζ gene is absent in some strictly parasitic pathogenic Rickettsiales, which may obtain ATP from the parasitized hosts. We also resolved the NMR structure of the ζ subunit of *Sinorhizobium meliloti* (Sm- ζ) and compared it with its structure modeled in AlphaFold. We found a transition from a compact ordered non-inhibitory conformation into an extended α -helical inhibitory N-terminus conformation, thus explaining why the Sm- ζ cannot exert homologous inhibition. However, it is still able to inhibit the PdF₁F₀-ATPase heterologously. Together with the loss of the inhibitory function of α -proteobacterial ϵ , the data confirm that the primary inhibitory function of the α -proteobacterial F₁F₀-ATPase was transferred from ϵ to ζ and that ζ , ϵ , and IF₁ evolved by convergent evolution. Some key evolutionary implications on the endosymbiotic origin of mitochondria, as most likely derived from α -proteobacteria, are also discussed.

KEYWORDS

evolution, ATP synthase, α -proteobacteria, mitochondria, endosymbiosis, zeta subunit, ζ , *Paracoccus denitrificans*

Introduction

The F₁F₀-ATP synthase is the ubiquitous nanomotor that fuels life with the chemical energy of ATP to drive most of the endergonic biochemical reactions and work processes in cells. The ATP synthase is the terminal multiprotein complex of oxidative phosphorylation or photophosphorylation of most living beings. When the transmembrane ion gradient is partially or totally collapsed (in ischemia, anaerobiosis, uncoupling in bacteria and mitochondria, or in the darkness in photophosphorylation), the ATP synthase is thermodynamically prone to reverse its intrinsic rotation from clockwise (CW, viewed from F₀ to F₁) to counterclockwise (CCW) and, therefore, to hydrolyze ATP, thus becoming an ATP-driven primary ion pump. To prevent the futile and deleterious F₁F₀-ATPase activity, the ATP synthases of different organisms have acquired different inhibitory proteins or protein domains. Thus, nature designed, by evolution, several F₁F₀-ATPase inhibitory proteins, such as bacterial ϵ (Sternweis and Smith, 1980), α -proteobacterial ζ (de la Rosa-Morales, 2005; Morales-Rios et al., 2010), and mitochondrial IF₁ (Pullman and Monroy, 1963), to fully prevent futile ATP hydrolysis (Krah, 2015; Mendoza-Hoffmann et al., 2018; Zarco-Zavala et al., 2018). These proteins complement a partial MgADP inhibitory mechanism present in ATP synthases, including the one of *Paracoccus denitrificans* (Zharova and Vinogradov, 2004), which has been demonstrated *in vitro* but not *in vivo*. Therefore, in the case that it actually exists *in vivo*, this Mg-ADP inhibition is evidently insufficient to prevent wasteful F₁F₀-ATPase activity. Otherwise, the inhibitory functions of bacterial ϵ , α -proteobacterial ζ , and mitochondrial IF₁ would be physiologically and evolutionarily unnecessary. Recently, we showed that this inhibitory MgADP only partially inhibits the F₁F₀-ATPase activity in *Paracoccus denitrificans* (PdF₁F₀-ATPase) (Zarco-Zavala et al., 2020). In contrast, the natural inhibitory “zeta” (ζ) subunit of this PdF₁F₀-ATPase (Morales-Rios et al., 2010; Zarco-Zavala et al., 2014; Garcia-Trejo et al., 2016) exerts a full inhibitory activity that completely stalls the F₁-ATPase (Zarco-Zavala et al., 2020). The key biological role of ζ has also been illustrated by the severe delay in respiratory growth of a ζ null *P. denitrificans* knockout mutant relative to the wild-type strain (Pd1222) (Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b). This Pd $\Delta\zeta$ mutant also demonstrated the unidirectional pawl/ratchet mechanism of ζ to block the reverse PdF₁F₀-ATPase activity selectively and allow the full

PdF₁F₀-ATP synthase turnover rate to favor the cellular bioenergetic ATP production (Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b). This Pd $\Delta\zeta$ mutant also supported that the same key role and unidirectional pawl/ratchet mechanism of ζ very likely also works for the other inhibitory bacterial ϵ and mitochondrial IF₁ proteins, although with different structures (Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b; Zarco-Zavala et al., 2018). Recent studies by other researchers suggest that besides MgADP and ζ , the ϵ subunit has an apparent inhibitory role in *P. denitrificans* (Pd- ϵ). However, instead of showing a clear activation in their truncated Pd- $\epsilon^{\Delta CT}$ mutants, their results show that the stronger and more significant PdF₁F₀-ATPase activation occurred exclusively when ζ was deleted but not when only Pd- ϵ was truncated (Varghese et al., 2018; Jarman et al., 2021); the details of these studies are discussed in Supplementary Material. It is evident that, in general, the ϵ subunit from *P. denitrificans* and most, if not all, α -proteobacteria have completely lost the inhibitory and ATP binding properties present in other non- α -proteobacterial inhibitory ϵ subunits (see the work of Zarco-Zavala et al. (2014), Mendoza-Hoffmann et al. (2018a, 2018b), and Mendoza-Hoffmann et al. (2022) and Supplementary Material); therefore, the ζ subunit acquired fully these inhibitory and regulatory properties in *P. denitrificans* and related α -proteobacteria.

Given its biological relevance, we studied here the evolution of ζ across the α -proteobacteria class. To this aim, we carried out bioinformatic, molecular biology, biochemical, and structural analyses of several ζ subunits in distinct bacterial families, including strictly free-living respiratory (*Paracoccus denitrificans*, Pd- ζ) or photosynthetic (*Cereibacter sphaeroides*, Cs- ζ , and *Rhodospirillum rubrum*, Rr- ζ), facultative symbiotic (*Rhizobium etli*, Re- ζ , and *Sinorhizobium meliloti*, Sm- ζ), and strictly parasitic (*Wolbachia pipientis*, Wp- ζ) α -proteobacteria. The results confirmed that the ζ subunit is a protein family (DUF 1476) essentially exclusive of the α -proteobacteria class. We confirmed the strong conservation of the functional N-terminal inhibitory domain of ζ and its divergence toward the C-terminus. We also carried out homologous or heterologous reconstitution of several ζ subunits into the respective α -proteobacterial F₁ or F₁F₀-ATPases. The results showed that the evolution of ζ and the preservation or loss of its inhibitory function is in concordance with its bioenergetic requirement in different bacterial families, environments, and lifestyles. Finally, we resolved and correlated the NMR and

AlphaFold (AF) structures of the ζ subunit from *S. meliloti* with its lack of inhibitory function. Taken together, the data show that bacterial ϵ , α -proteobacterial ζ , and mitochondrial IF_1 emerged independently by convergent evolution as F_1F_0 -ATPase inhibitors. These results also have important implications in the endosymbiotic evolution from α -proteobacteria to mitochondria and putative important future applications.

Materials and methods

Experimental methods

Purification of F_1 and solubilization of F_1F_0

Sub-bacterial particles (SBP) from *P. denitrificans* and the other non-photosynthetic α -proteobacteria were prepared as previously described (Morales-Rios et al., 2010), and chromatophores were prepared from *R. capsulatus*, *R. rubrum*, or *C. sphaeroides* cultures, as described previously (Behrens and De Meis, 1985). The F_1 from *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (Pd), *Rhizobium etli* CFN42 (Re), or *Sinorhizobium meliloti* 1,023 (Sm) strains was purified from SBP or inverted membranes, as described previously (Zarco-Zavala et al., 2014). The same procedure was used to purify the F_1 -ATPase of *Rhodobacter capsulatus* from chromatophores. Solubilization of the F_1F_0 -ATPase from SBP or chromatophores was carried out as described for the preparation of Blue Native Electrophoresis (BN-PAGE) with 2–4 mg/mg of protein of digitonin (Schagger and von Jagow, 1991).

F_1 – ATPase and F_1F_0 – ATPase activities

We measured the *P. denitrificans*, *R. etli*, and *S. meliloti* F_1 -ATPase activities using a pyruvate kinase and lactate dehydrogenase coupled assay that follows the NADH oxidation, as described previously (Morales-Rios et al., 2010; Zarco-Zavala et al., 2014). The reaction mixture contained 50 mM of Tris/acetate (pH 8.0), 250 mM of sucrose, 3 mM of Mg^{+2} acetate, 30 mM of K^{+1} acetate, 1.5 mM of PEP, 3 mM of ATP, 200 μ M of NADH, 4 U/ml of PK, and 4 U/ml of LDH. Reactions started by adding the F_1 (or F_1F_0) ATPases to the reaction cells. Measurements were carried out using 0.15% LDAO as an ATPase activator. In the ATPase assays of chromatophores or SBP, we also added 0.03 μ g/ μ L of rotenone and 5 mM of sodium cyanide. In chromatophores, the ATPase assays also included sulfite (≤ 2 mM) and 2 μ M of FCCP.

Cloning, expression, and purification of recombinant ζ subunits from several α -proteobacteria

The recombinant ζ subunits were PCR-amplified using genomic DNA of the strains *P. denitrificans* Pd1222, *R. etli* CFN42, *S. meliloti* 1,021, and *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 (formerly *Rhodobacter sphaeroides*) and designed primers (Supplementary Table S1). The ζ gene from *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 inserted into pET3a was purchased from GeneScript. The ζ amplicons were ligated into a pJET1.2 subcloning vector (Thermo Fisher Scientific), and competent cells of *E. coli* DH5 α were transformed with this construction. The cloned ζ genes were confirmed by NdeI and BamHI double digestion and subsequently ligated into a pT7-7 plasmid, with the exception of ζ from *C. sphaeroides* (Cs- ζ), which was cloned into pET3a (Supplementary Figure S3). The pT7-7/ ζ or

pET3a/ ζ constructs were sequenced and then transformed into competent *E. coli* BL21 (DE3) pLys S codon plus cells. The recombinant ζ subunits were overexpressed and purified as described previously (Morales-Rios et al., 2010; Zarco-Zavala et al., 2014).

Circular dichroism experiments

Far UV CD measurements of Pd- ζ and Sm- ζ were carried out at a concentration of 0.07 mg/ml at 25°C on a Jasco J715 spectropolarimeter using a quartz cell with 0.1 cm pathlength. The protein samples were previously filtered and diluted in 25 mM of phosphate buffer with pH 8.0. The results were expressed as mean residue ellipticity at the wavelength (λ) given by

$$MRE = MRW \times \theta_{\lambda} / 10 \times d \times c,$$

where MRW is the mean residue weight for the peptide bond, θ_{λ} is the observed ellipticity (degrees) at wavelength λ , d is the pathlength (cm), and c is the protein concentration (mg/ml). The spectra obtained were an average of three scans. The secondary structure content was calculated with the BeStSel online software (<https://bestsel.elte.hu/index.php>). See references in the link and also the work of Micsonai et al. (2022a) and Micsonai et al. (2022b) for further details.

Inhibitory homologous and heterologous ζ reconstitution assays

The F_1 , F_1F_0 , SBP, or chromatophores from each strain (*P. denitrificans*, *R. etli*, *S. meliloti*, *R. capsulatus*, *C. sphaeroides*, or *R. rubrum*) were preincubated with the indicated concentrations of the recombinant Pd- ζ , Re- ζ , Sm- ζ , Cs- ζ , or Rr- ζ in the presence of 1 mM of sulfite and 1 mM of ATP and $MgCl_2$ in a buffer containing 20 mM of Tris/HCl and 250 mM of sucrose at pH 8.0. The reconstituted samples were incubated for 20 min at room temperature; the ATPase activities of the samples were then measured by the coupled spectrophotometric method described previously.

^{13}C , ^{15}N uniform double labeling of recombinant Sm- ζ

The ^{13}C , ^{15}N uniformly double-labeled Sm- ζ was overexpressed in *E. coli* BL21 cells transformed with the pT7-7/Sm- ζ plasmid. Cells were incubated in minimal M9 media at 37°C until they reached an absorbance of 0.7 at 600 nm. Afterward, 1 mM IPTG was added, and cells were incubated at 37°C overnight. The cells were then harvested by centrifugation, and the pellet was stored at $-80^{\circ}C$ until used. Incubations were performed with continuous shaking at 200 rpm. The M9 minimal media used had [$^{13}C_6$]-D-glucose (4 g/L) and (0.5 g/L) $^{15}NH_4Cl$ as sole carbon and nitrogen sources (Sigma-Aldrich), respectively. Purification of the ^{13}C , ^{15}N uniformly double-labeled Sm- ζ was carried out as described previously for the purification of the non-labeled recombinant ζ subunits.

Structure determination of Sm- ζ by solution NMR spectroscopy

The buffer of the sample was exchanged to 50 mM of NaCl and 25 mM of phosphate buffer at pH 6.8. Next, the sample was

concentrated to 1 mM of Sm- ζ using a 3 kDa centricon, with 0.5 mM of DSS, 4.5 mM of NaN₃, and 5% of D₂O. Afterward, the sample was transferred into the NMR tube and then acquired in a Bruker AVANCE III HD 800 MHz spectrometer for a [¹⁵N, ¹H] HSQC (heteronuclear single quantum coherence) spectra (Supplementary Figure S5). The structure of the Sm- ζ subunit was determined by solution NMR spectroscopy following the automated J-UNIO protocol (Serrano et al., 2012; Serrano et al., 2014). The backbone NMR experiments 4D APSY-HACANH, 5D APSY-HACACONH, and 5D APSY-CBCACONH were recorded at 293 K on a Bruker AVANCE III HD 800 MHz spectrometer. The sidechain NMR experiments 3D¹⁵N-resolved, 3D¹³C (aliphatic)-resolved, and 3D¹³C (aromatic)-resolved [¹H,¹H]-NOESY experiments were recorded at 293 K with a mixing time of 120 ms on a Bruker AVANCE III HD 800 MHz spectrometer. To avoid sample instability, 25% non-uniform sampling was used for each sidechain experiment. The final 20 conformers with the lowest residual CYANA target function values were then subjected to energy minimization. First, each NMR conformer was solvated with full atom TIP3P water containing Cl⁻ and K⁺ ions at ~0.15 M to mimic the physiological ionic strength. Then, energy minimization and calculation of the conformers were carried out using the GROMACS 2018 (Pronk et al., 2013) package and the Amber14SB (Maier et al., 2015) force field. After the minimization, the energy of the system was computed on each NMR model. In particular, the energy of the protein was computed in a vacuum, while the solvation contribution was computed using Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (APBS) software (Jurris et al., 2018). The final structure is shown in Figures 7, 8, and all structure calculation parameters and statistics are shown in Supplementary Table S2. The structure was deposited in the RCSB PDB with the PDB_id 7VKV and in the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) with the entry 36,447.

Molecular simulation methods *in silico*

Molecular dynamics of the Pd- ζ and Sm- ζ subunits

The starting structure of Pd- ζ was the PDB_id 2LL0, and that of Sm- ζ was the PDB_id 7VKV. They were processed identically with the *pdb4amber* script, and the starting topology and input coordinate files were created using the LEaP module in AmberTools21 (Case et al., 2005). The AMBER ff99SB (Hornak et al., 2006) force field parameters were used for all the protein residues. Na⁺ counterions were added randomly to neutralize the system, which were then solvated in a truncated octahedron box with explicit TIP3P waters (Jorgensen et al., 1983), with box limits at 10 Å from the protein surface.

The system was minimized with a restraint of 10 kcal mol⁻¹ Å⁻² on all protein atoms, using 1,000 steps of steepest descent followed by 4,000 conjugate gradient steps. Next, the minimized structure was heated from 10 to 298.15 K for 50 ps at constant volume with a 5 kcal mol⁻¹ Å⁻² backbone restraint using the Langevin thermostat with a collision frequency of 5 ps⁻¹. Afterward, the system was equilibrated for 500 ps with a 1 atm constant pressure at 298.15 K with a backbone restraint of 1 kcal mol⁻¹ Å⁻², employing the Langevin thermostat and a relaxation time of 5 ps for the Berendsen barostat.

The constant-pH molecular dynamics were performed in triplicate at pH 8.0 for 100 ns with a time step of 2 fs, with all protonable residues allowed to change their protonation states every 200 fs, and 200 fs of solvent relaxation followed any successful protonation changes. Periodic boundary conditions were used, and the particle-mesh Ewald sums (Darden et al., 1993) were employed to treat the electrostatic interactions with a 10 Å cutoff. The SHAKE algorithm (Ryckaert et al., 1977) was used to constrain hydrogen bonds. The GB implicit solvent model (Onufriev et al., 2004) was used during the protonation state change attempts with a salt concentration of 0.1 M. All the simulations were run in GPUs using the *pmemd.cuda* module in Amber20. Each MD simulation was analyzed individually, as shown in Supplementary Material.

Results

We started with a preparative bioinformatic analysis of the ζ and ϵ subunits of the ATP synthases of α -proteobacteria to update sequence files and alignments and to confirm the fact that the main inhibitory function of the F₁F₀-ATPase in α -proteobacteria was lost in ϵ and it was acquired by ζ in α -proteobacteria (see the first section of Supplementary Material and Supplementary Figures S1, S1.1). Afterward, with the role of ζ as the main inhibitor of the α -proteobacterial F-ATPase already established, we focused on the evolution of ζ along several α -proteobacterial species to define whether the inhibitory function of ζ is preserved or not all along the α -proteobacteria class. This also aimed to study the evolution of this subunit in relation to the close relationship of α -proteobacteria with the endosymbiotic origin of mitochondria (Archibald, 2015; Ku et al., 2015). We carried out a comprehensive phylogenetic analysis of ζ , as described in the Supplementary Material, all along the α -proteobacteria class. In the resulting phylogeny, closest to the ζ gene of *P. denitrificans* (α PATPs ζ) (Mendoza-Hoffmann et al., 2022) (around 2:30 o'clock of the circular ζ 's phylogeny, Figure 1), there are some members of the *Paracoccus* genus and some photosynthetic α -proteobacteria, such as *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides* (now renamed *Cereibacter sphaeroides* (Hördt et al., 2020)), and in some of them, we confirmed the conservation of the inhibitory function of ζ (see the following section). In close proximity to *P. denitrificans* in the Rhodobacterales order, we also find some marine α -proteobacteria, such as *Jannaschia* sp., in which we previously confirmed its heterologous inhibitory function (Zarco-Zavala et al., 2014). Around 6:00 o'clock of the ζ cladogram (Figure 1), there are some nitrogen-fixing Rhizobiales, which are more distant to our reference *P. denitrificans* ζ (Pd- ζ), which were also studied here (see the following section). In this ζ cladogram, some ζ sequences branched outside their respective orders, as in some Rhodobacterales and Rhizobiales, but these inconsistencies were corrected when rRNAs were used for the cladogram construction (see Figure 9), so these discrepancies are likely a result of horizontal transfer or small gene size.

Conservation and evolution of the ζ subunit in photosynthetic and marine α -proteobacteria compared with the ζ subunit of *P. denitrificans*

We started with functional studies of the ζ subunits by cloning and overexpressing the recombinant ζ s from some of the

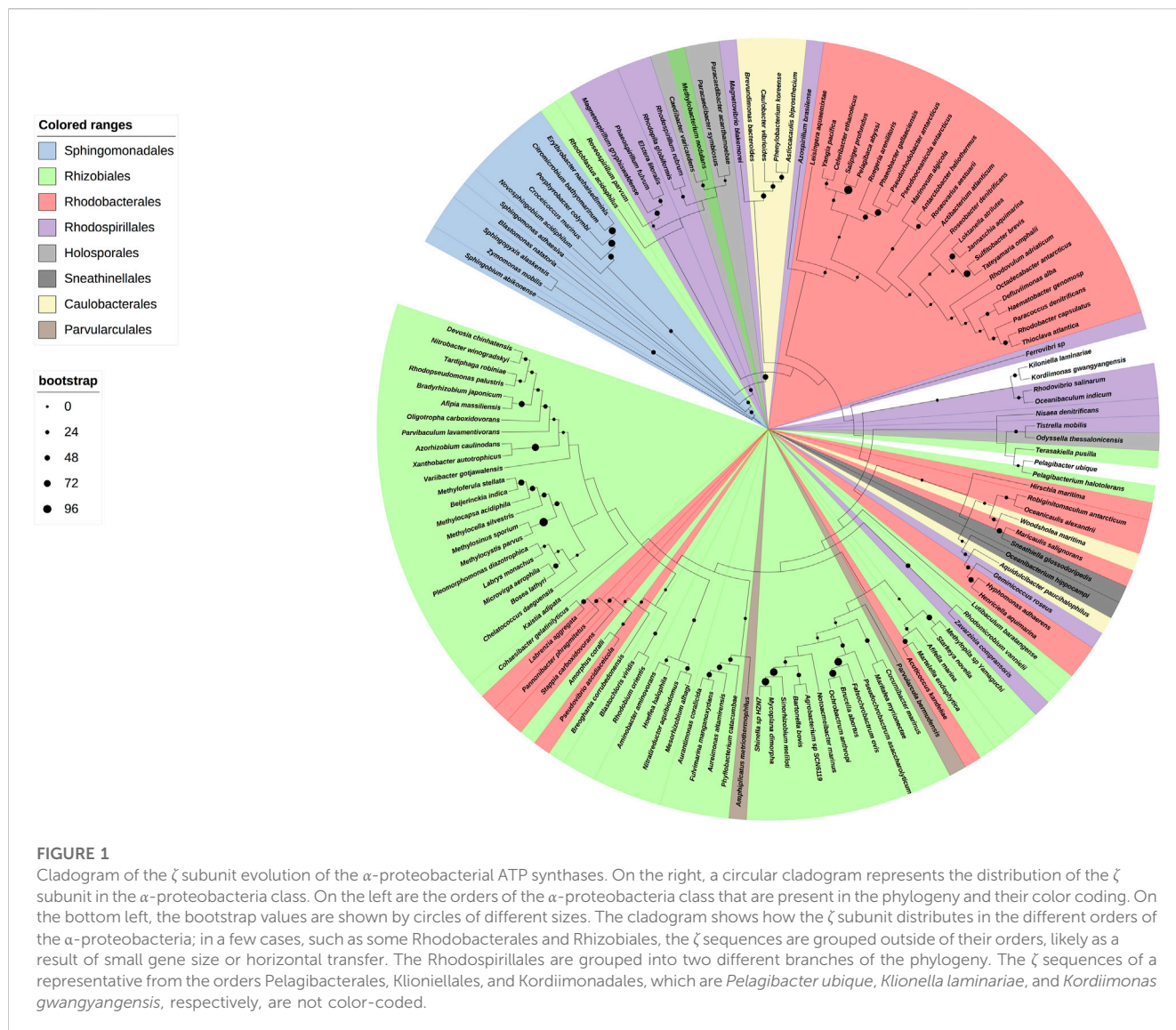


FIGURE 1

Cladogram of the ζ subunit evolution of the α -proteobacterial ATP synthases. On the right, a circular cladogram represents the distribution of the ζ subunit in the α -proteobacteria class. On the left are the orders of the α -proteobacteria class that are present in the phylogeny and their color coding. On the bottom left, the bootstrap values are shown by circles of different sizes. The cladogram shows how the ζ subunit distributes in the different orders of the α -proteobacteria; in a few cases, such as some Rhodobacterales and Rhizobiales, the ζ sequences are grouped outside of their orders, likely as a result of small gene size or horizontal transfer. The Rhodospirillales are grouped into two different branches of the phylogeny. The ζ sequences of a representative from the orders Pelagibacterales, Kiloniellales, and Kordiimonadales, which are *Pelagibacter ubique*, *Klionella laminariae*, and *Kordiimonas gwangyangensis*, respectively, are not color-coded.

aforementioned α -proteobacteria, initially with the purification of the F_1 -ATPase from photosynthetic α -proteobacteria, closely related to *P. denitrificans* in the same Rhodobacterales order. The ATP synthases from some of these photosynthetic α -proteobacteria were functionally characterized (Turina et al., 1992; Maldonado et al., 1998; Feniouk et al., 1999; Feniouk et al., 2002; Turina et al., 2004; Feniouk et al., 2005). Although we previously observed the ζ subunit of *C. sphaeroides* (Cs- ζ) bound to its CsF_1F_0 -ATP synthase of chromatophores (Morales-Rios et al., 2010), we did not confirm that Cs- ζ inhibited its own ATP synthase. The close relationship between *P. denitrificans* and *C. sphaeroides* (Figures 1, 9) strongly suggests that the inhibitory function of ζ should be conserved in Cs- ζ . Together with *C. sphaeroides*, another closely related α -proteobacteria to *P. denitrificans* is *Rhodobacter capsulatus* (Zarco-Zavala et al., 2014) (Figures 1 and Supplementary Figure S1), suggesting that the ATP synthase of *R. capsulatus* (RcF_1F_0 -ATPase) should harbor the ζ -binding site at the INGECORE or $\alpha_{DP}\beta_{DP}\gamma$ interface (Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b; Zarco-Zavala et al., 2018) of the Rc - F_1F_0 ATPase. Therefore, we purified the F_1 -ATPase of *R. capsulatus* (RcF_1),

obtaining a functional F_1 -ATPase with the canonical α , β , γ , δ , and ϵ subunits and a sixth 11 kDa subunit migrating similar to Pd- ζ of Pd- F_1 (Morales-Rios et al., 2010), below a 15 kDa subunit presumably being Rc- ϵ (Figure 2A). The identity of these subunits as Rc- ϵ and Rc- ζ were confirmed by Western blot analyses carried out separately with monoclonal anti- ϵ (Figure 2B upper panel) and polyclonal anti- ζ (Figure 2B lower panel) antibodies.

To confirm the presence of ζ in other photosynthetic α -proteobacteria, we analyzed the chromatophores of several of these species, including *Rhodospirillum marinarum* (Rm), *Rhodospseudomonas palustris* (Rp), *Rhodovibrio salinarum* (Rsa), *Rhodospirillum rubrum* (Rr), *Rhodobacter capsulatus* (Rc), and *Phaeospirillum fulvum* (Pf). The anti- β and anti- ζ Western blot analyses confirmed the presence of ζ in chromatophores of all of these photosynthetic α -proteobacteria, besides the presence of the catalytic β subunit (Figure 2C). Some of these ζ bands were relatively weak compared to that of *P. denitrificans* (first lane of Figure 2C). The weakness of these signals could be the result of a lower affinity of the antibody anti- ζ for the ζ subunits from relatively distant

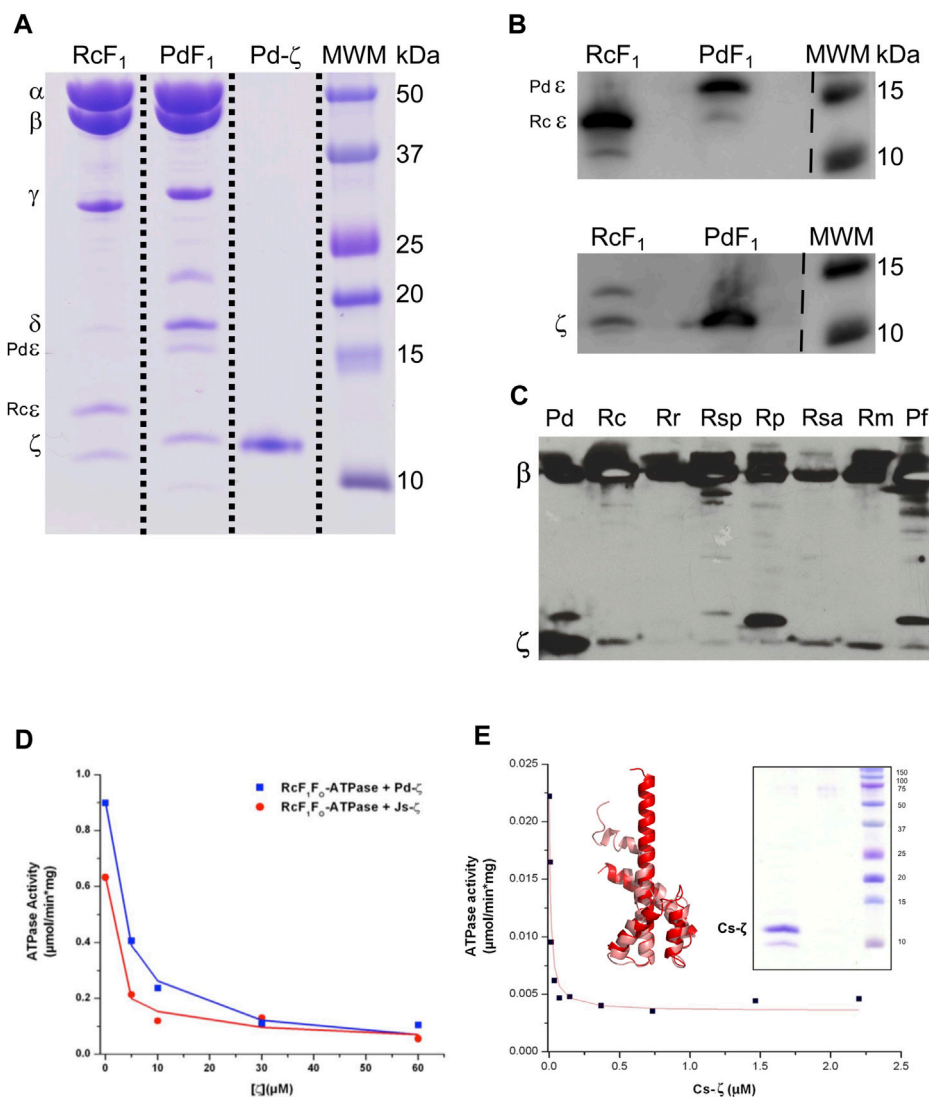


FIGURE 2

Purification and inhibition of the F_1 -ATPase from *R. capsulatus* and the F_1F_0 -ATPase of *C. sphaerooides*. **(A)** Coomassie-stained SDS-PAGE of the purification of *R. capsulatus* F_1 (F_1Rc). All the subunits of the $Rc F_1$ are present: α , β , γ , δ , ϵ , and ζ . The subunit $Rc-\epsilon$ has a molecular weight of 13 kDa, which is lower than that of $Pd-\epsilon$ (15.8 kDa). **(B)** Detection of subunits $Rc-\epsilon$ and $Rc-\zeta$ by WB. The upper and lower images are the same PVDF membrane; it was revealed first as the bottom one (anti- ζ), and after stripping, it was exposed to anti- ϵ antibodies and revealed again. These two images were spliced where indicated by discontinuous lines to remove empty lanes. **(C)** WB anti- β and anti- ζ of the enriched F_1 -ATPases by the chromatophore's chloroform extraction from photosynthetic α -proteobacteria; the whole PVDF membrane was incubated with both antibodies; this image was not spliced. **(D)** The F_1F_0 complex of *R. capsulatus* (RcF_1F_0) was solubilized from chromatophores. This F_1F_0 complex was preincubated in the presence of increasing concentrations of the recombinant $Pd-\zeta$ (blue) or the recombinant ζ of *Jannaschia* sp. ($Js-\zeta$, red). Afterward, the RcF_1F_0 -ATPase activity was determined by the coupled ATPase assay as described in Materials and methods. Lines represent the non-linear fitting to a non-competitive inhibitor model, and average data of duplicate experiments are shown. **(E)** The recombinant $Cs-\zeta$ was reconstituted into chromatophores of *C. sphaerooides*, and the inhibition of the CsF_1F_0 -ATPase by $Cs-\zeta$ was determined by the same coupled ATPase assay. The plot shows a representative experiment of three independent ones. Curve fitting was made as before and the $appIC_{50}$ of $Cs-\zeta$ to inhibit its own CsF_1F_0 -ATPase was 9.7 ± 2.7 nM (average \pm SD). Inset left: the $Cs-\zeta$ structure modeled by Phyre2 and refined in Swiss-Model (salmon) or by AlphaFold (red) with respective identities of 100% and 90% to our cloned $Cs-\zeta$ protein. Inset right: Coomassie-stained SDS-PAGE gel of the purified $Cs-\zeta$.

photosynthetic α -proteobacteria. For instance, the ζ subunit of *R. rubrum* ($Rr-\zeta$) is one of the most distant to $Pd\zeta$ (Supplementary Figure S1A, and Figure 9 around 2 o'clock). In summary, these results show that ζ is expressed and spread as α -proteobacterial F_1 -ATPase inhibitor along most, if not all, photosynthetic α -proteobacteria.

To confirm the inhibitory function of ζ in photosynthetic and non-photosynthetic α -proteobacteria, we performed heterologous

reconstitution of the available recombinant ζ subunits from *P. denitrificans* ($Pd-\zeta$) and *Jannaschia* sp. ($Js-\zeta$) into the ATP synthase from photosynthetic α -proteobacteria. The latter is another marine α -proteobacteria of the Rhodobacterales order, also closely related to *P. denitrificans* (see Figures 1, 10 and Supplementary Figure S1A). It is worth recalling that in previous experiments, $Js-\zeta$ was able to inhibit the PdF_1 -ATPase (Zarco-Zavala et al., 2014). With these antecedents, we carried out heterologous

reconstitution of Pd- ζ and Js- ζ into the F_1F_0 -ATPase of *R. capsulatus* (Rc- F_1F_0) solubilized from chromatophores. As expected, from their close proximity (Zarco-Zavala et al. (2014) and Figure 1 and Supplementary Figure S1A), we observed a potent inhibitory activity of Pd- ζ and Js- ζ subunits on the Rc- F_1F_0 -ATPase (Figure 2D). These results showed that both Pd- ζ and Js- ζ subunits can bind productively to the INGECORE binding site of Rc- F_1F_0 -ATPase. The $appIC_{50}$ of the Pd- ζ to inhibit the Rc- F_1F_0 -ATPase obtained was 3.76 μ M, and the corresponding $appIC_{50}$ of Js- ζ was 1.12 μ M. These $appIC_{50}$ values are, as expected from heterologous reconstitutions, higher than the $appIC_{50}$ of Pd- ζ of 0.44–0.55 μ M (see Supplementary Material and the work of Morales-Rios (2011)) to inhibit its own Pd- F_1F_0 -ATPase in SBP.

In parallel, we were able to clone, overexpress, and purify the recombinant ζ subunit from *C. sphaeroides* (Cs- ζ) (Figure 2E, inset) and reconstituted it into the Cs- F_1F_0 -ATP synthase of *C. sphaeroides* chromatophores. Interestingly, we obtained an average $appIC_{50}$ of 9.7 \pm 2.7 nM of the Cs- ζ to inhibit its own Cs- F_1F_0 -ATPase in chromatophores after three independent determinations (Figure 2E shows a representative curve). This value is in the nM range, much lower than the observed $appIC_{50}$ of Pd- ζ (or Js- ζ) to inhibit the Pd- F_1F_0 -ATPase in PSB, which are in the μ M range. Recently, three new AlphaFold (AF)-modeled structures of the Cs- ζ protein were uploaded, and the structure closest to our cloned Cs- ζ protein was 90% identical (AF-A0A3G6WKK1-F1-model-v4. pdb). We aligned this AF-Cs- ζ model (red in Figure 2E, inset) with our own model of the cloned Cs- ζ constructed in Phyre2 and refined in SWISS-MODEL (salmon in Figure 2E, inset). Our Cs- ζ model shows, as expected, the Pd- ζ -like structure with the inhibitory N-terminus was partially disordered; however, the AF-Cs- ζ model shows the N-terminus with the inhibitory extended α -helix conformation (Figure 2E, inset). As in other ζ structures described in the following text, this shows that the transition from the disordered to the ordered α -helical extended inhibitory structure of Pd- ζ may take place in Cs- ζ , as confirmed here experimentally (Figure 2E). In summary, the Cs- ζ is the ζ subunit of α -proteobacteria showing the highest affinity for its target homologous F_1F_0 -ATPase found so far (Figure 2E), even higher than the affinity of Pd- ζ or Js- ζ (Zarco-Zavala et al., 2014). As we will see, these high-affinity ζ subunits are found in free-living α -proteobacteria subjected to extreme environmental changes. Thus, they require a high-affinity and strongly inhibitory ζ subunit of the F_1F_0 -ATPase to prevent futile ATP consumption and cope with the variable, thus challenging living environments that face α -proteobacteria.

Unfortunately, we could not grow *Jannaschia* sp. (kindly donated by Prof. Mary Ann Moran) to estimate the $appIC_{50}$ of Js- ζ for its own Js-ATP synthase. Nevertheless, it is evident that in free-living α -proteobacteria, the ζ subunit is a potent F_1F_0 -ATPase inhibitor with nM or μ M affinities for their respective or homologous free-living α -proteobacterial F_1F_0 -ATPases. Although we were unable to clone the recombinant ζ from *R. capsulatus* (Rc- ζ) and to estimate its $appIC_{50}$ to inhibit its own Rc-ATP synthase, we consider that Rc- ζ is likely a potent Rc- F_1F_0 -ATPase inhibitor. This is because of the very close relationship of *R. capsulatus* with *P. denitrificans*, *C. sphaeroides*, and *Jannaschia* sp. (see Figures 1, 10; Supplementary Figure S1) and the previous results showing the strong conservation of the ζ inhibitory function in free-living α -proteobacteria. It was also

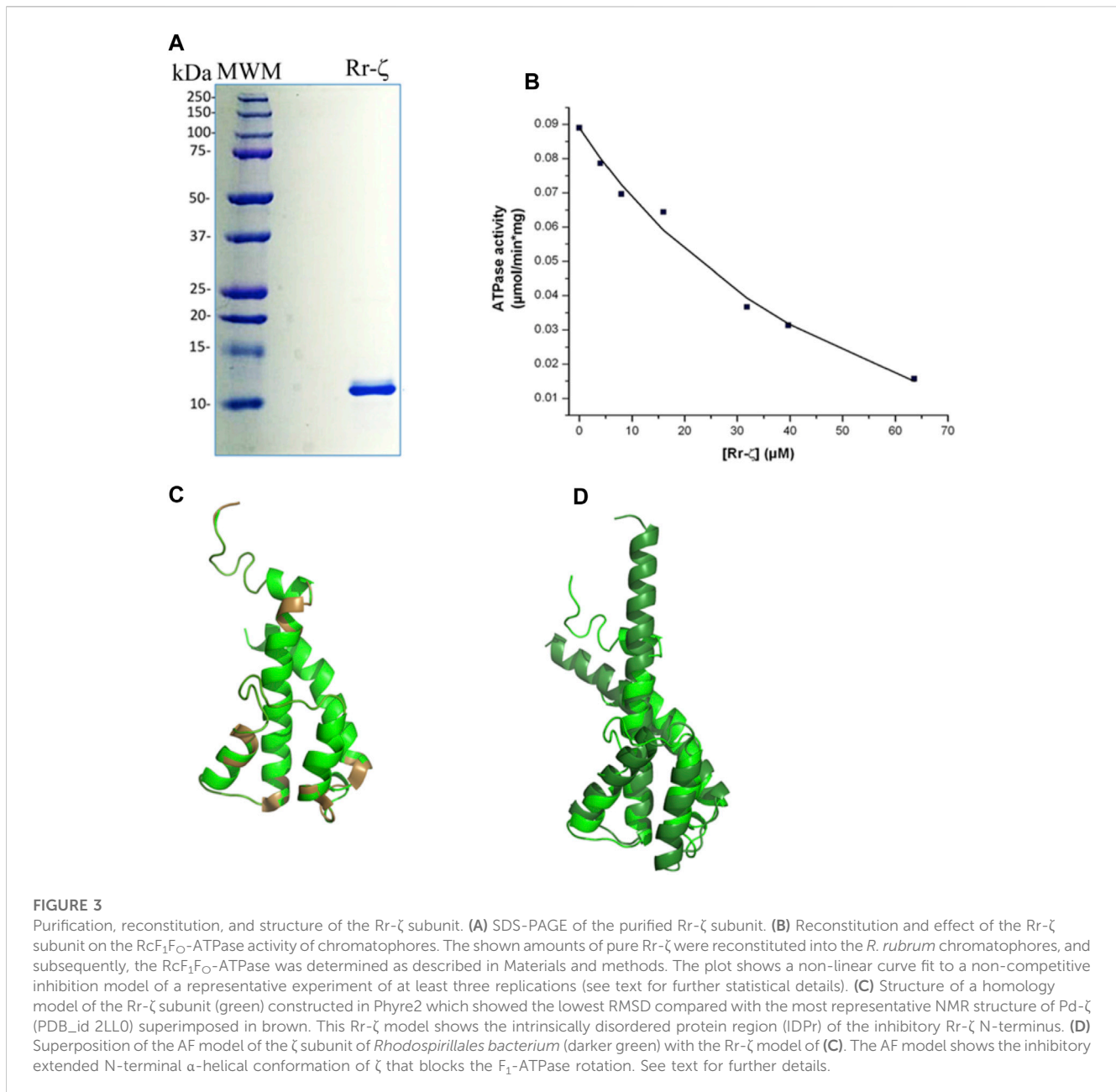
important to assess this functional conservation of ζ in more distant and free-living photosynthetic α -proteobacteria, such as *Rhodospirillum rubrum* (Rr- ζ). This α -proteobacterium belongs to the order Rhodospirillales but not to the Rhodobacterales (Figures 1, 9). The sequence of Rr- ζ is more divergent from the Pd- ζ than the previous ζ 's of Rhodobacterales (see Supplementary Figure S1A).

To assess the homologous inhibitory capacity of Rr- ζ on chromatophores from *R. rubrum*, we overexpressed and purified the Rr- ζ subunit (Figure 3A) and reconstituted it into the Rr- F_1F_0 -ATPase in conditions promoting the productive binding of the Rr- ζ by the entrance rotation alpha helix locking (ERAHL) mechanism (Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b; Zarco-Zavala et al., 2018). These ATPase assays showed a clear dose-dependent Rr- ζ inhibition of the Rr- F_1F_0 -ATPase of chromatophores with an $appIC_{50}$ of 18.4 \pm 8.2 μ M on average, after three independent determinations, and fitting the data to a non-competitive inhibition mechanism (see the representative curve in Figure 3B) (Zarco-Zavala et al., 2014). This $appIC_{50}$ of Rr- ζ to inhibit its own Rr-ATP synthase is about 35-fold higher than the $appIC_{50}$ of the Pd- ζ (0.55 μ M) to inhibit its own Pd- F_1F_0 -ATPase complex in SBP (see Figure 6D) and \approx 1,900-fold higher than that of Cs- ζ (9.7 nM, see the previous reference). This shows clearly that the inhibitory function of ζ is still preserved not only in the Rhodobacterales order (Figure 1 and Supplementary Figure S1) but also in the Rhodospirillales order. However, it is worth emphasizing that this Rr- ζ inhibitory function has a very low affinity compared to Pd- ζ or Cs- ζ . In addition, we also tried to obtain a heterologous inhibition of the Rr- ζ into the Pd- F_1F_0 -ATPase and Pd- F_1F_0 -ATPase complexes of *P. denitrificans*. However, the results never showed any inhibitory activity of Rr- ζ on Pd- F_1F_0 -ATPase using a large excess of 30 μ g of Rr- ζ in SBP from *P. denitrificans* (data not shown).

These observations indicate that the ζ subunit of photosynthetic free-living α -proteobacteria, such as *C. sphaeroides*, and the more distant *R. rubrum* ζ subunits preserve their inhibitory function, although the latter exhibits a relatively much lower affinity. The data, thus, show a tendency to lose the inhibitory function of ζ in α -proteobacteria that are more distant from *P. denitrificans*.

We also tried to correlate this preserved inhibitory function of the "photosynthetic" ζ subunits with their structure. In the first approach, we modeled the structure of Rr- ζ by homology with the Pd- ζ subunit preserving as expected, essentially the same ζ fold as Pd- ζ , with the inhibitory N-terminus intrinsically disordered, and the globular domain folded as four- α -helix bundle (Figure 3C). The Rr- ζ is slightly larger than the Pd- ζ (Supplementary Figure S1A) due to a 3-aa insertion in the loop between α -helices 3 and 4 (at position 81 in the numbering of Pd- ζ); this is depicted as a brown loop (bottom of Figure 3C) that does not align well with Pd- ζ (Rr- ζ in green in Figure 3C). There is also a single 1-aa insertion in position four of the N-terminus of Rr- ζ compared with Pd- ζ , and it is also clear that the N-terminus of Rr- ζ is more divergent from Pd- ζ than the other Rhodobacterales ζ -subunits closer to *P. denitrificans* (Supplementary Figure S1A). These results explain why Rr- ζ is still able to inhibit, although weakly, its own Rr- F_1F_0 -ATPase but unable to inhibit the Pd- F_1F_0 -ATPase heterologously, most likely because of the divergent N-terminus of Rr- ζ (Supplementary Figure S1A).

In a second approach to look for a structure–function correlation of the Rr- ζ , we further investigated the ζ structures



modeled in AF named DUF 1476, finding 22 structures of ζ s from Rhodospirillaceae *bacterium* within the Rhodospirillales order and very closely related to Rr- ζ (see the following link: [https://alphafold.ebi.ac.uk/search/text/duf1476?organismScientificName=Rhodospirillaceae bacterium](https://alphafold.ebi.ac.uk/search/text/duf1476?organismScientificName=Rhodospirillaceae%20bacterium)). Within these 22 structures, we found one with a higher identity to Rr- ζ named AF-A0A7V7E8W8-F1-model_v4. pdb. This structure, among others, was aligned to our model of Rr- ζ , and we found that the RMSD between this AF model and our Rr- ζ model was the smaller one (2.034 Å), as calculated in PyMol (Figure 3D). Other AF Rhodospirillaceae *bacterium* models had higher RMSD and lower identity than our Rr- ζ model. In the structural alignment (Figure 3D), the AF-A0A7V7E8W8-F1-model_v4. pdb was longer than Rr- ζ in the C-terminus. Still, its inhibitory N-terminus is similar to the Rr- ζ . The full identity between our model and the

AF model is 38%, confirming them as closely related orthologous proteins. Interestingly, as found with other AF ζ structures, the AF Rhodospirillaceae- ζ structure does not show the intrinsically disordered N-terminus as in the Pd- ζ NMR structure (PDB_id 2LL0), but the inhibitory extended α -helical N-terminus that blocks the rotation of the central rotor of the PdF₁ and PdF₁F₀-ATPases (Morales-Rios et al., 2015; Garcia-Trejo et al., 2016; Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b; Zarco-Zavala et al., 2018). Although AF does not show the experimental (NMR, X-ray, or Cryo-EM) protein structures, it shows some putative conformers of the protein of interest as predicted from the available experimental structures (Jumper et al., 2021). Therefore, it seems worth considering that the AF extended α -helical N-terminal structures represent the inhibitory ζ conformations that might be reached in the appropriate

conditions, either spontaneously in solution or after its productive binding to a compatible F_1 -ATPase. With these considerations, the AF-modeled ζ structures closer to the Rr- ζ structure show that these ζ subunits may, therefore, reach the extended α -helical N-terminus inhibitory conformation. This interpretation is in full concordance with the inhibitory function of Rr- ζ working on its own Rr F_1F_0 -ATPase (Figure 3B). In summary, these data show that the ζ subunits of marine and photosynthetic α -proteobacteria are conserved enough to be able to undergo the inhibitory N-terminal transition from non-inhibitory intrinsically disordered (IDPr) to the extended α -helical structure to inhibit unidirectionally the α -proteobacterial F_1F_0 -ATPase.

Evolution of the ζ subunit in facultative symbiotic, facultative pathogenic, and strictly parasitic α -proteobacteria

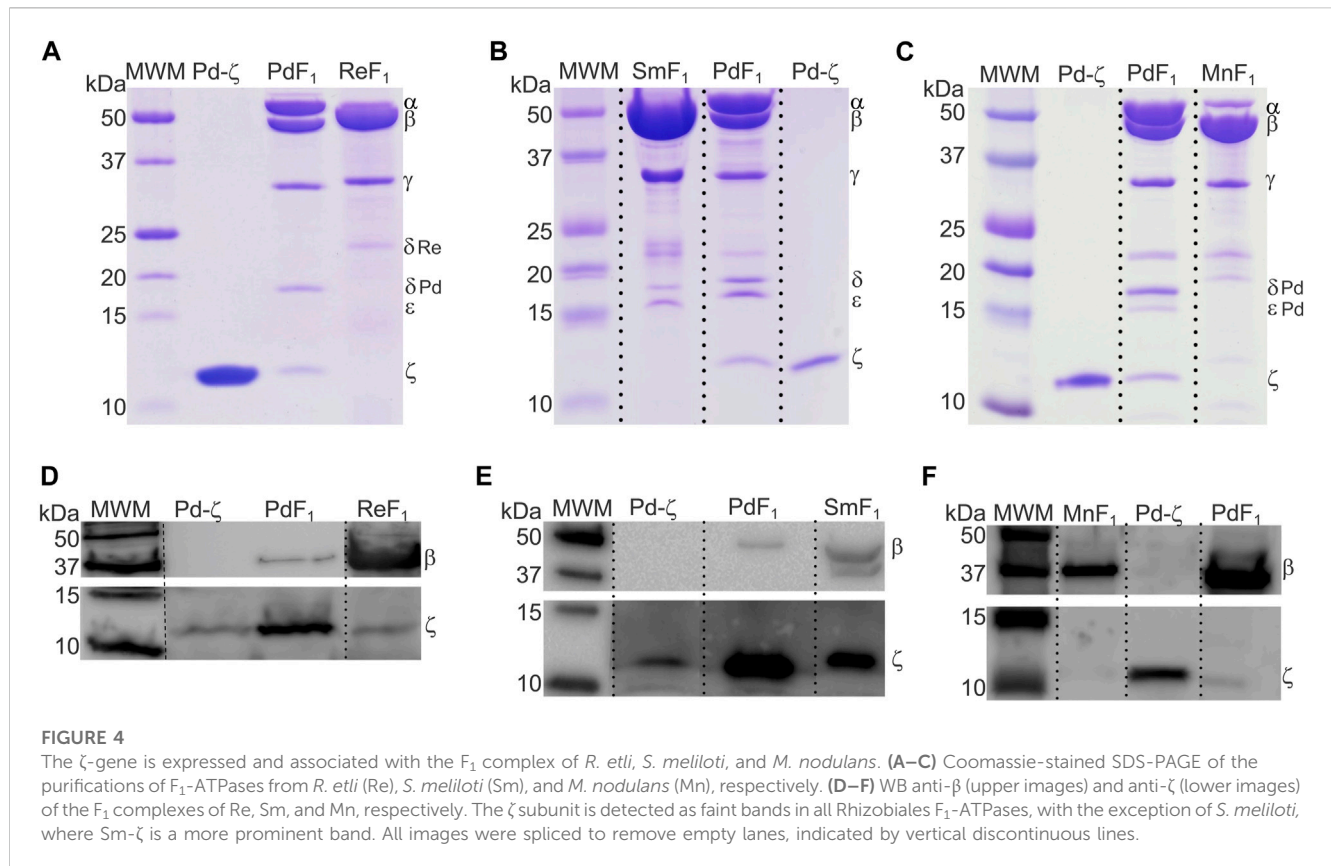
So far, we described the functional and structural properties of the ζ subunits from free-living α -proteobacteria closely (Rhodobacterales) and distantly (Rodospirillales) related to Pd- ζ , confirming, perhaps non-expectedly, the conservation of the inhibitory function of these ζ subunits. We, thus, turned our focus to the ζ subunits of symbiotic, pathogenic, and parasitic α -proteobacteria in order to define whether the inhibitory function of ζ is preserved in α -proteobacteria of different lifestyles, either closely or distantly related to *P. denitrificans*. To this aim, we isolated and functionally characterized the ζ subunits and F_1 - or F_1F_0 -ATPases from facultative nitrogen-fixing symbiotic Rhizobiales α -proteobacteria (green in Figures 1, 9). The F_1 -ATPases were isolated first from *R. etli*, *S. meliloti*, and *Methylobacterium nodulans*. All of these are facultative symbionts of legume plant roots, where they exchange nutrients for fixed nitrogen with legume plants. We grew these bacteria aerobically in rich LB media and isolated the F_1 -ATPase from inverted membranes, prepared as described in *Materials and methods*. The isolation of the F_1 -ATPases from these Rhizobiales α -proteobacteria produced the canonical F_1 -ATPase pattern of the five protein bands in Coomassie-stained SDS-PAGE gels, namely, the α , β , γ , δ , and ϵ subunits, but we could not see clearly the sixth ζ band of the Pd F_1 -ATPase (see Morales-Rios et al. (2010) and Zarco-Zavala et al. (2014) and the third lanes of Figures 2A, 4A–C). We considered that ζ was either absent or present in very low amounts, non-detectable by Coomassie staining. Therefore, we carried out immunodetection by anti- ζ Western blot analyses, with our polyclonal anti-Pd- ζ antibody (Morales-Rios et al., 2010), including a control with a monoclonal anti- β . The results showed clearly the presence of trace amounts of ζ in all F_1 -ATPases of Rhizobiales α -proteobacteria, i.e., *R. etli* (F_1 Re), *S. meliloti* (F_1 Sm), and *M. nodulans* (F_1 Mn), in addition to the presence of the control β subunit (Figures 4D–F). However, the ζ band intensities were weak compared with the Pd- ζ band (F_1 Pd). Although this might be due to the sequence diversity of the Rhizobiales ζ subunits, the lack of a clear ζ band intensity in the Coomassie-stained gels (Figures 4A–C) evidences that ζ is present in very low amounts in Rhizobiales F_1 -ATPases. This indicates that either the ζ subunits of Rhizobiales are sub-expressed at low levels and/or they have a lower affinity for their respective F_1 -ATPases, thus becoming dissociated from the soluble F_1 -ATPase during the purification of the enzyme.

To assess these possibilities, we cloned the recombinant ζ subunits from *S. meliloti* (Sm- ζ) and *R. etli* (Re- ζ) chromosomal

DNA to determine the $appIC_{50}$ of these Rhizobiales ζ subunits to inhibit their F_1 and/or F_1F_0 -ATPase complexes. The recombinant Sm- ζ and Re- ζ subunits were purified as described previously for Pd- ζ (Morales-Rios et al., 2010; Zarco-Zavala et al., 2014) to achieve high purity (>95% according to Coomassie staining, Figures 5A,B). The highest yield and purity were always obtained with the Sm- ζ (Figures 5A, B). In addition, the Sm- ζ was also the more intense band in anti- ζ Western blots compared with the homologous Re- ζ and Mn- ζ subunits (Figures 4D–F); therefore, further functional and structural studies of Rhizobiales ζ s were carried out with Sm- ζ .

Before carrying out the functional analyses with Sm- ζ , we confirmed the proper folding of the protein by the content of α -helical secondary structure determined by circular dichroism (CD) spectroscopy, compared with Pd- ζ as the reference. As can be seen in Figure 5C, the CD spectra of Pd- ζ and Sm- ζ subunits are almost identical and superimpose very well to each other, indicating that in solution, the α -helical content of the Sm- ζ is very similar to that of Pd- ζ . This indicates the proper folding of the Sm- ζ , at least as the overall α -helical content, suggesting that the globular part of Sm- ζ is folded similarly as the native Pd- ζ subunit in solution (see PDB_id 2LL0 and Figure 8A). We calculated the α -helical content from the CD data of the Pd- ζ and Sm- ζ subunits as described in *Materials and methods*. In summary, the estimated α -helical contents of Pd- ζ and Sm- ζ were 74.8% and 75.7%, respectively, i.e., very close values indicating a similar amount of α -helix in both proteins, as in the Pd- ζ subunit (see PDB_id 2LL0, the work of Zarco-Zavala et al. (2014), and Figure 8A).

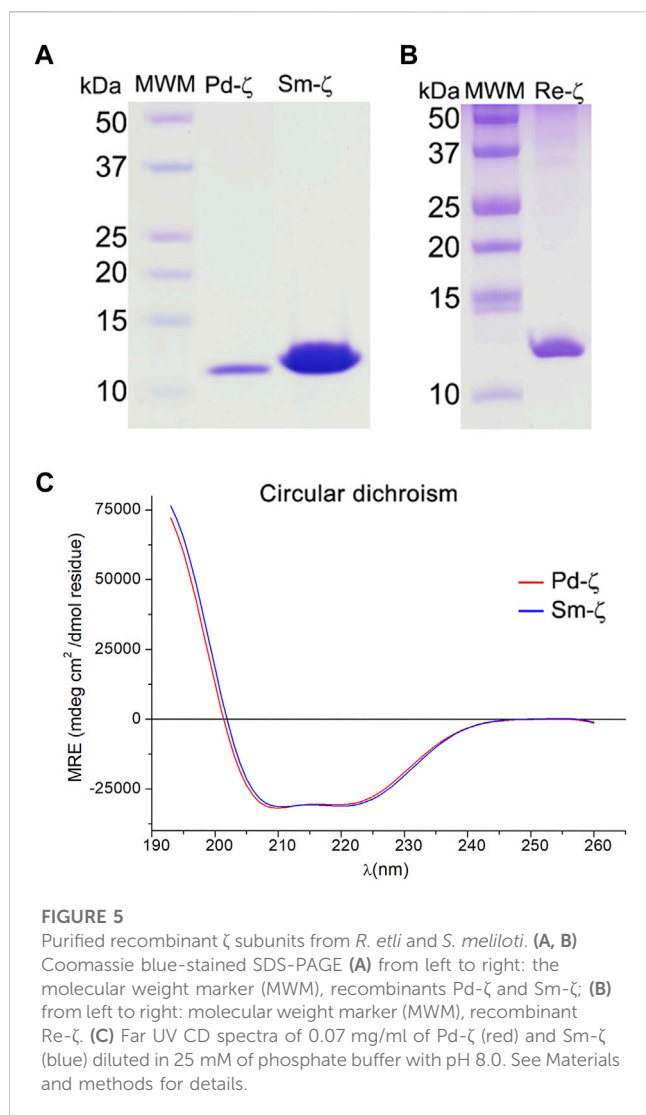
Once confirmed that Sm- ζ is folded similarly to the Pd- ζ subunit, we carried out the homologous reconstitution of Sm- ζ into the isolated Sm F_1 -ATPase, which also showed more clearly the contents of α , β , γ , δ , and ϵ subunits better than other Rhizobial F_1 -ATPases (see Figures 4A–C). This enzyme showed an Sm F_1 -ATPase activity ($11.24 \pm 0.79 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{pt.})$) higher than that of Pd $F_1^{\Delta\zeta}$ ($4.48 \pm 1.21 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{pt.}$), which is with the Pd $F_1^{\Delta\zeta}$ isolated from the ζ knockout mutant Pd $\Delta\zeta$ (Mendoza-Hoffmann et al., 2018) and Mn F_1 ($5.53 \pm 0.03 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{pt.})$) ATPases and similar to that of Re F_1 ($10.37 \pm 2.57 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{pt.})$). Therefore, our Sm F_1 was an optimal preparation to assess the inhibitory function of Sm- ζ since it lacked most of its endogenous Sm- ζ and, thus, showed one of the highest F_1 -ATPase activities of the α -proteobacterial F_1 -ATPases isolated here. Somehow unexpectedly, we observed no inhibitory effect of the Sm- ζ whatsoever on its own Sm F_1 -ATPase after reconstitution experiments with increasing concentrations to reach an excess of Sm- ζ up to 30 μg in the presence of MgATP (see Figure 6A) in conditions where the Pd- ζ inhibits fully the Pd F_1 ATPase and Pd F_1F_0 -ATPase activities (Mendoza-Hoffmann et al., 2018; Zarco-Zavala et al., 2018). After repeating this in an identical duplicated experiment (see red circles in Figure 6A), observing no inhibitory function of Sm- ζ on the Sm F_1 -ATPase on average, we carried out a non-identical replication of this experiment extending the preincubation of Sm- ζ with Sm F_1 by 24 h instead of 20 min (as described in *Materials and methods*) to make sure there was enough time to reveal any inhibitory function of Sm- ζ on Sm F_1 , in case there were any (red squares in Figure 6A). Once more, there was no inhibitory function of Sm- ζ on the Sm F_1 -ATPase whatsoever. Given this non-inhibitory result, we assayed the putative heterologous inhibitory function of Sm- ζ on the Pd F_1 -ATPase. Surprisingly, we observed a strong inhibition of the Pd F_1 -



ATPase after reconstitution with large amounts (15–20 μ g) of Sm- ζ (Supplementary Figure S2A). To confirm these results, we used the full $PdF_1F_O^{\Delta\zeta}$ -ATPase of SBP lacking the endogenous ζ (Mendoza-Hoffmann et al., 2018a, 2018b) to estimate an $appIC_{50}$. With this experiment (Figure 6E), we confirmed that the Sm- ζ exerted a dose-dependent strong inhibition of the $PdF_1F_O^{\Delta\zeta}$ -ATPase of SBP. We estimated an $appIC_{50}$ after repeating this experiment three times and obtained an average $appIC_{50}$ value of $1.45 \pm 0.38 \mu$ M after adjusting the data points to the non-competitive inhibition model (see Figure 6E). This value is 2.6-fold higher than the $appIC_{50}$ of Pd- ζ ($0.55 \pm 0.36 \mu$ M) estimated in the PdF_1F_O -ATPase of SBP with the same kinetic inhibition model and with appropriate statistical significance (Figure 6E; Supplementary Figure S2B). These values are in concordance with the productive binding of the Sm- ζ into the PdF_1F_O -ATPase with lower affinity than its homologous Pd- ζ , as expected from a heterologous reconstitution. In a reciprocal experiment, we assayed the putative heterologous inhibition of the Rhizobiales F_1 -ATPases (Sm F_1 and Re F_1) with the recombinant Pd- ζ . After the custom reconstitution of Pd- ζ in the presence of MgATP into Sm F_1 and Re F_1 ATPases, we could not observe any inhibitory function of the Pd- ζ whatsoever. Instead of repeating these experiments with negative results, we used a considerable excess of recombinant Pd- ζ , $\geq 100\mu$ g to confirm that there were no inhibitory effects of Pd- ζ on Sm F_1 and Re F_1 ATPases (see Figures 6B,C). These results indicate that the structural differences (Figures 6F, 8A, C) between Pd- ζ and Sm- ζ (and/or Pd F_1 and Sm F_1 , see Supplementary Material) make Sm- ζ unable to inhibit its own Sm F_1 -ATPase and Pd- ζ non-compatible to inhibit the Rhizobiales Sm F_1 and Re F_1 ATPases. However, Sm- ζ can inhibit

heterologously the Pd F_1 - and Pd F_1F_O -ATPases. Thus, the Pd F_1 and Pd F_1F_O nanomotors are somehow able to induce the inhibitory N-terminal extended- α -helical conformer of Sm- ζ but not their own Sm F_1 -ATPase.

We knew, at this point, that Sm- ζ exhibits an α -helical content similar to that of Pd- ζ , according to the CD results (Figure 5C), and therefore, the overall folding of both ζ subunits (Sm- ζ and Pd- ζ) should be similar. However, to analyze more deeply the structure of Sm- ζ and look for structural differences between Pd- ζ and Sm- ζ that could explain the functional differences of both ζ subunits, we resolved the NMR structure of Sm- ζ in a similar fashion to our previous solution structure of Pd- ζ ((Zarco-Zavala et al., 2013; Serrano et al., 2014; Zarco-Zavala et al., 2014) and PDB_id 2LL0). The structure resolved, showing the 20 most representative conformers of Sm- ζ exhibited a similar globular folding as Pd- ζ , as expected from the CD results (Figure 5C). However, the Sm- ζ N-terminus showed a radically different structure compared with Pd- ζ . In the case of Pd- ζ , we consistently observed the inhibitory N-terminus as an intrinsically disordered protein region (IDPr) with high mobility in solution, which shifts to an extended N-terminal α -helix after its productive binding to the INGECORE of the $\alpha_{DP}\beta_{DP}\gamma$ interface of the Pd F_1 (Garcia-Trejo et al., 2016) and Pd F_1F_O ATPases (Morales-Rios et al., 2015). In the case of Sm- ζ , its N-terminus is not disordered in solution at all, it forms a well-folded α -helix, but it is not extended; instead, it bends toward the C-terminal α -helix so that the final conformer of Sm- ζ in solution is a globular and compact 5- α -helix bundle (Figures 7, 8), in contrast to the 4- α -helix bundle of Pd- ζ (PDB_id 2LL0 and Figure 8A). Figure 7A, B shows two side views of the NMR structure of Sm- ζ (PDB_id code 7VKV), with the N- and C-termini of Sm- ζ viewed from the “back” and “front” of the



protein, respectively. For more clarity, the N- and C-termini of Sm- ζ are colored violet and red, respectively, in Figure 7C, with the red C-terminus viewed at the front and the violet N-terminus protruding from the back, respectively (Figure 7C). Here, the Sm- ζ has the same orientation and view as in Figure 7A. As can be seen, there is no IDPr at the N-terminus of Sm- ζ as in the case of Pd- ζ (PDB_id 2LL0 and Figure 8A). One of the first questions that emerge from this structure is whether it is consistent with the content of α -helix determined in solution by CD (Figure 5C). Accordingly, the content of α -helix of Sm- ζ was calculated as the number of aa's in α -helical structure from the most representative conformer of the 20 resolved by NMR (PDB_id 7VKV) with the STRIDE site (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py>), giving an α -helical content of 72.1%. This is in good agreement with the 75.7% of α -helix as obtained by our CD experiments (Figure 5C). As an internal control, the α -helical content of the most representative control Pd- ζ conformer was also calculated from the NMR PDB_id 2LL0, and we obtained a value of 60.5%, which is similar but lower to the 74.8% of α -helical content calculated from the CD spectra (Figure 5C). The slight discrepancies of smaller α -helical content obtained by NMR in both Sm- ζ and Pd- ζ may be due to the differences in the media used for both

determinations, particularly in the slightly acidic pH of the media necessary for the NMR experiments (pH \approx 6.0–6.8), whereas the CD spectra of both Sm- ζ and Pd- ζ were carried out at more basic pH (pH 8.0). We have shown that the more effective inhibitory activity of Pd- ζ is obtained at more alkaline (pH 8.0) than at more acidic pH (6.0) (Morales-Rios et al., 2010; Morales-Rios, 2011; Zarco-Zavala et al., 2014; Mendoza-Hoffmann et al., 2018; Zarco-Zavala et al., 2018); therefore, it seems consistent to see a slightly higher α -helical content in both Sm- ζ and Pd- ζ by CD at pH 8.0 than by NMR at pH \approx 6.0–6.8. In summary, the CD and NMR structures of Sm- ζ complement each other very well and show that the solution structure of Sm- ζ is a globular 5- α -helical bundle devoid of the disordered N-terminal IDPr, i.e., in radical contrast to the IDPr of Pd- ζ , although both structures may present similar α -helical contents at pH 8.0.

The ordered and α -helical folded structure of Sm- ζ explains why it is unable to inhibit its own SmF₁-ATPase (Figure 6A). It seems that the activation energy for the transition from the 5- α -helical bundle to the extended N-terminal α -helical inhibitory conformation is a thermodynamic and/or kinetic barrier that is too high and cannot be properly triggered by the SmF₁-ATPase. Looking for primary structure differences between the Sm- ζ and the Pd- ζ , we found significant changes in the first 14 N-terminal residues, which, as we demonstrated, harbor the inhibitory domain of Pd- ζ (Zarco-Zavala et al., 2014) (see the red box in Figure 6F). These changes, together with a few others in the rest of Sm- ζ and possibly in the INGECORE $\alpha_{DP}\beta_{DP}\gamma$ interface of the SmF₁ (Mendoza-Hoffmann, 2018) (see Supplementary Figure S7), should explain the inability of the SmF₁-ATPase to trigger the inhibitory transition from the compact 5- α -helical globular Sm- ζ conformer (Figures 7, 8) to the extended N-terminal inhibitory form of Sm- ζ (Figure 8D). In summary, the data show that Sm- ζ has a compact non-inhibitory 5- α -helical globular conformation that likely leaves the isolated SmF₁-ATPase essentially devoid of bound Sm- ζ as detected by SmF₁ SDS-PAGEs and anti- ζ Western blots (Figure 4).

An intriguing question is why the Sm- ζ is unable to inhibit its own SmF₁-ATPase but still able to inhibit heterologously the PdF₁-ATPase. This observation indicates that the PdF₁-ATPase is somehow able to trigger the transition from the compact non-inhibitory (5- α -helical bundle) conformer of Sm- ζ into the extended N-terminal α -helical inhibitory conformer of Sm- ζ . We looked for structural insights that might explain this heterologous inhibitory effect of Sm- ζ , so we looked for the putative Sm- ζ structures modeled in AF. We found six structures of Sm- ζ predicted by the AF database, but these structures had different sequences and structures, originating from different *S. meliloti* strains (see Supplementary Table S3). When we compare the sequence of these AF models with the sequence of the Sm- ζ structure that we resolved by NMR (PDB_id 7VKV), they have the following identities: 100%, 99%, 58.65%, 57.28%, 60.19%, and 60.19% (Supplementary Table S3). We compared these AF models with each other (Figure 8D) and with our NMR structure (Supplementary Figure S6). Interestingly, when AF used Sm- ζ sequences with 100% and 99% identity with our Sm- ζ , it predicted a different structure (Figure 8D). This AF structure shows the extended N-terminal α -helical inhibitory conformation (Figures 8D, Supplementary Figures S6A–D), similar to the AF models of *C. sphaerooides* (Figure 2D) or Rhodospirillaceae bacterium

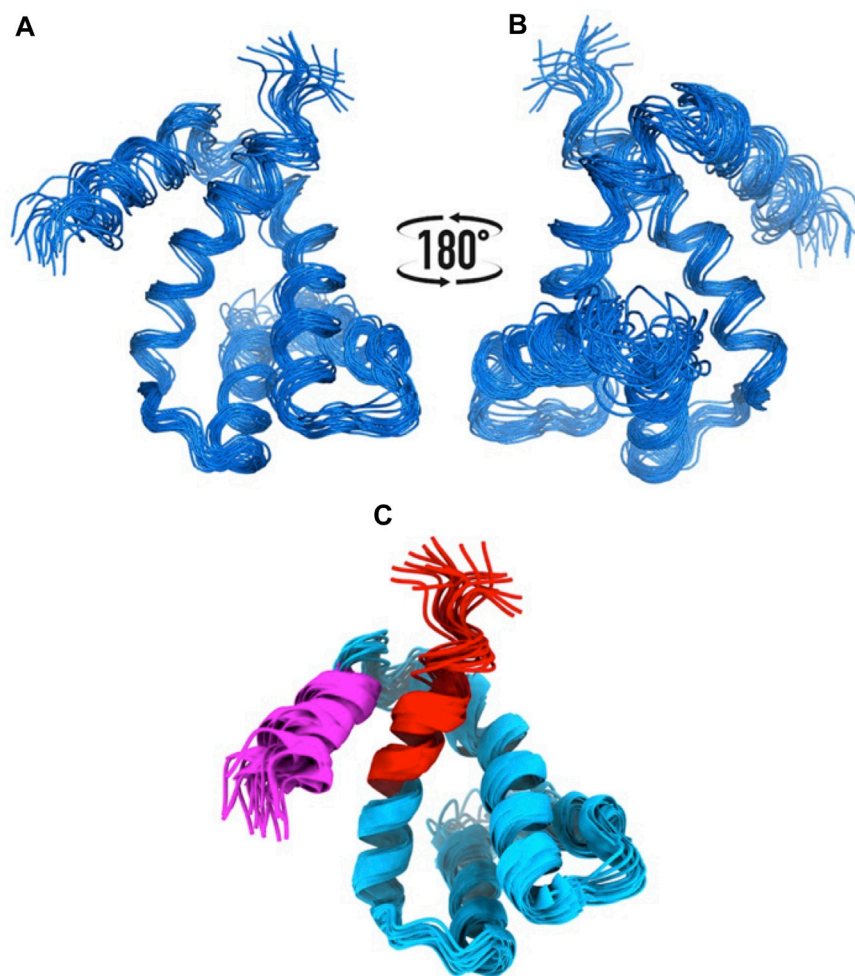


FIGURE 7

NMR structure of the Sm- ζ . (A), (B) Bundle of 20 superimposed conformers, where only backbone atoms are shown. (C) Ribbon representation of the 20 conformers; the N-terminus is colored in magenta, and the C-terminus is colored in red.

the N-terminal α -helical extended inhibitory conformation (Figure 8D; Supplementary Figure S6A). This is in full agreement with our observation that the Sm- ζ is somehow able to inhibit, after heterologous reconstitution, the PdF₁ and PdF₁F₀-ATPases of *P. denitrificans*. How the ATP synthase of *P. denitrificans* is able to induce the transition to the N-terminal extended inhibitory conformation of Sm- ζ will be a question addressed in the discussion.

The absence of the α PATPs ζ gene and the ζ subunit in Rickettsiales and other parasitic or symbiotic α -proteobacteria

Once we found that ζ has lost its inhibitory potency in some symbiotic α -proteobacteria, it seemed possible that the gene could have been lost in strictly parasitic or symbiotic α -proteobacteria, given that symbionts and parasites may obtain nutrients or ATP directly from their hosts. For instance, it is well known that Rickettsiales have an inward ATP membrane transporter that consumes the host's cellular ATP (Andersson et al., 1998). This would make the ζ subunit

totally dispensable given that the Rickettsiales ATP synthase is not so urged to synthesize ATP, but it could still hydrolyze it as a proton pump to keep the transmembrane proton gradient to fulfill the chemiosmotic energy requirements of the Rickettsiales. In the search of the α PATPs ζ gene, we found it absent in most of the Rickettsiales and in some other α -proteobacteria as in the Rhodospirillales order (see Figure 9). We also found the latter to be, in all cases, facultative or free-living extracellular symbionts. As described previously (Mendoza-Hoffmann et al., 2022), we found that the α PATPs ζ gene is absent in the family Holosporaceae from the order Holosporales, the family Acetobacteraceae from the order Rhodospirillales, and most of the species in the order Rickettsiales. This lack of Rickettsiales' ζ may have important implications in the search for the identity of the mitochondrial endosymbiont that evolved into the present mitochondria (Mendoza-Hoffmann et al., 2022). Therefore, in order to prevent the possibility of the α PATPs ζ gene being present but skipped or missed in our bioinformatics search in Rickettsiales, we confirmed biochemically that the ζ subunit is totally absent in one species of these Rickettsiales. We isolated the F₁-ATPase from *Wolbachia pipientis* (WpF₁), grown as an intracellular

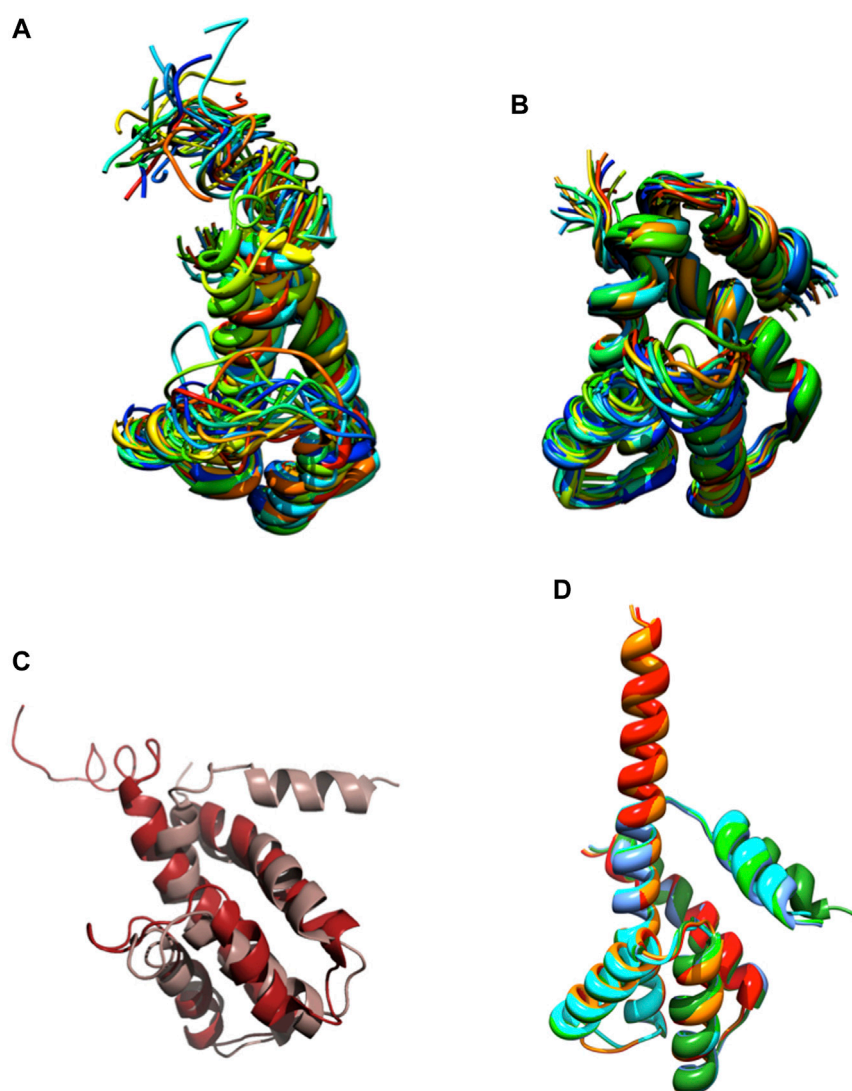


FIGURE 8

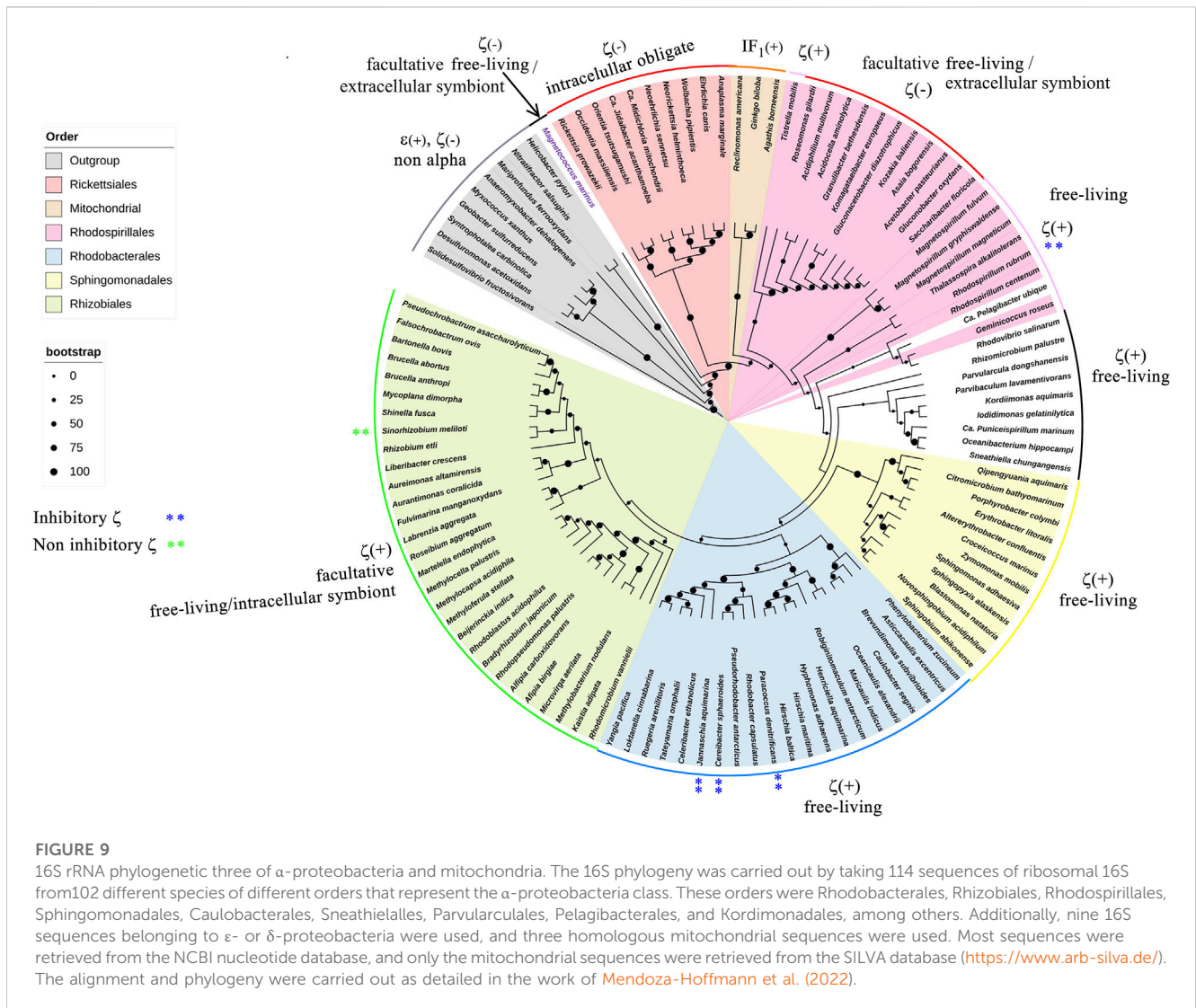
NMR and AF structures of Pd- ζ and Sm- ζ . **(A)** The 20 conformers originally resolved by NMR of the Pd- ζ subunit in rainbow ribbons with the N-terminus showed as an IDPr highly mobile region. **(B)** The 20 NMR conformers of the Sm- ζ showed in rainbow ribbons, with its N-terminus folded as a first α -helix of a 5- α -helix globular bundle, twisted and interacting with the fifth α -helix. **(C)** Superposition of the Pd- ζ (PDB_id 2LLO, red) and Sm- ζ (PDB_id 7VKV, light brown) showing the opposing orientations of their N-termini. **(D)** Structures of AF models of Sm- ζ subunits identical to our NMR-resolved ζ (red), nearly identical (orange), and more divergent (dark and light green, cyan, and blue) to the NMR-resolved Sm- ζ (PDB_id 7VKV) shown in **(B)**. The closest AF models to our NMR-resolved SM- ζ (red and orange) show the inhibitory N-terminal extended Sm- ζ conformation, whereas the less-similar Sm- ζ structures (light green, dark green, blue, and cyan) show the non-inhibitory 5- α -helical globular bundle conformation. See the text and [Supplementary Figure S6](#); [Supplementary Table S2](#) for further details.

symbiotic host in human erythrocytes; since the latter lack mitochondria, this ensured the absence of putative contaminant mitochondrial F-ATPase (mtF-ATPase) present, for instance, in yeast that was used before as the *W. pipientis* host (Uribe-Alvarez et al., 2019). As expected, from the absence of the α PATPs ζ gene in *W. pipientis*, we found by WpF₁ purification and anti- ζ Western blot that Wp- ζ is totally absent in the WpF₁-ATPase (Figure 10C), where we confirmed the presence of the α , β , γ , and ϵ subunits (Figures 10A, B). This experiment demonstrates biochemically the absence of both the α PATPs ζ gene and the ζ subunit protein in the Rickettsiales order of α -proteobacteria. As discussed in the following section, the absence of the ζ subunit in these α -proteobacteria orders may have important implications in the evolution of mitochondria from α -proteobacteria,

as suggested by Sagan (1967), Margulis and Chapman (1998), Andersson et al. (1998), Gray et al. (1999), Archibald (2015), and Ku et al. (2015).

MD simulation of the transition from the N-terminal disordered to the ordered inhibitory extended α -helical conformer in Pd- ζ

The structural details that induce the inhibitory transition from the N-terminal disordered to the ordered inhibitory α -helical conformer of Pd- ζ upon productive binding to PdF₁ are



far from being resolved here. However, in an attempt *in silico* to make evident that the Pd- ζ could undergo this transition from non-inhibitory and intrinsically disordered structure (PDB_id 2LL0) to the inhibitory N-terminal extended α -helical structure (PDB_id 5DN6), we were able to simulate this disordered to α -helical extended inhibitory transition in the Pd- ζ subunit by MD analysis carried out at constant pH 8.0, suggesting that this transition could be reached spontaneously in solution (Figure 11 and Supplementary Video S1). With this, we make evident that this inhibitory conformation was obtained, although at low statistical frequency, given that it was observed in only one of the MD analyses carried out in triplicate (see Supplementary Figure S8 and Supplementary Movie S1). Taken together with the extended inhibitory conformers predicted by AF, we show that this disordered to the α -helical extended inhibitory transition of ζ can be induced by the proper α -proteobacterial ATP synthase, preferably the one from *P. denitrificans*. Alternatively, it may also take place spontaneously, although perhaps sporadically, in the Pd- ζ isolated in solution at the optimal inhibitory pH of 8.0.

Furthermore, we also carried out a similar MD analysis at constant pH 8.0 of the Sm- ζ NMR structure (PDB_id 7VKV) to compare it with that of Pd- ζ . The MD results clearly showed that the Sm- ζ was unable to undergo the transition from the compact non-inhibitory 5- α -helical bundle conformer (Figures 7, 8B) to the inhibitory N-terminal extended α -helical conformer (Figures 8D and Supplementary Figure S6A), at least in the triplicate MD simulations carried out. A representative video of the three MD replications of Sm- ζ can be seen in Supplementary Video S2, and the trajectories of the three replications are shown in Supplementary Figures S8A–D. In summary, the *in silico* MD results are in concordance with the inability of Sm- ζ to inhibit its own SmF₁-ATPase (Figure 6A) since it shows higher thermodynamic or kinetic requirements, and, thus, a lower probability than Pd- ζ , to achieve the transition from its non-inhibitory 5- α -helix bundle compact conformation to the inhibitory extended α -helical conformer. This inhibitory transition cannot be triggered by its own SmF₁-ATPase, but it can be somehow induced by the PdF₁ and PdF₁F₀ complexes.

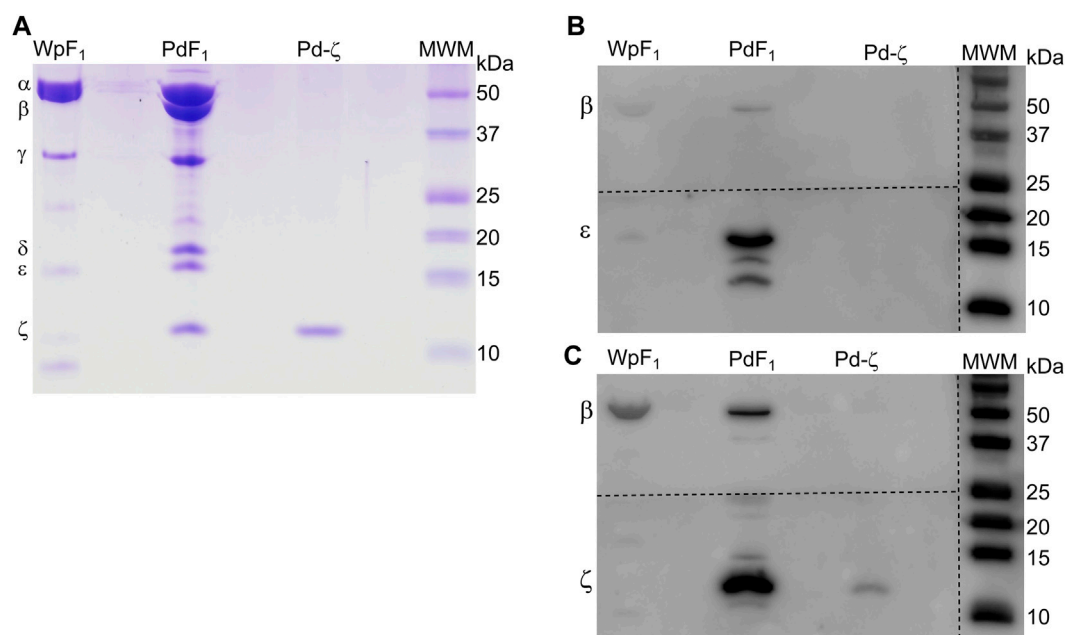


FIGURE 10

Confirmation of the absence of the ζ subunit in the F_1 of *W. pipientis*. **(A)** Coomassie-stained SDS-PAGE of the purification of *W. pipientis* F_1 (Wp). **(B)** WB anti- ϵ of the Wp F_1 complex. **(C)** WB anti- ζ of the Wp F_1 complex. The anti- ζ WB membrane was developed first. Then, the antibodies were removed (stripping), and the membrane was exposed to the anti- ϵ antibody and revealed again **(B)**. The membrane was cut to incubate with the different antibodies, as shown by the discontinuous lines.

Discussion

The results presented here open a new window by showing that, in general, ζ evolved in concordance with its functional and bioenergetic role in the different bacterial families. This is because we found that the inhibitory capacity of ζ is preserved in free-living, more environmentally challenged α -proteobacteria, reduced or lost in some symbiotic α -proteobacteria, and completely lost in some symbiotic or in most strictly parasitic Rickettsiales α -proteobacteria. The latter α -proteobacteria are less challenged by environmental changes and may obtain nutrients and/or ATP from their hosts, thus making the ζ subunit dispensable in symbiotic or parasitic α -proteobacteria. Exceptions to this evolutionary hypothesis of the ζ subunit may appear in nature, but more functional and evolutionary studies are needed to confirm this hypothesis and to show the exceptions on this trend of preserving the ζ inhibitory function in free-living α -proteobacteria and losing its function or the ζ gene in symbiotic and parasitic α -proteobacteria. The latter is coincidentally closely related to the endosymbiotic origin of mitochondria.

In addition, we resolved and correlated the NMR structure of the Sm- ζ with its lack of inhibitory function, which is in concordance with its compact 5- α -helical non-inhibitory conformation (Figures 7, 8). We also found by AF modeling that Sm- ζ may acquire the extended N-terminal α -helical inhibitory conformation as confirmed by heterologous inhibition of the Pd F_1 and Pd F_1F_0 ATPases (Figures 6E, 8D). We still need to explain the heterologous, but not homologous, inhibitory function of Sm- ζ on the Pd F_1 and Pd F_1F_0 ATPases. In this regard, we have recently shown that in hybrid F_1 -ATPases constructed with at

least one Pd F_1 -ATPase subunit (either Pd- α , Pd- β , or Pd- γ), these Pd F_1 -ATPase subunits induce the functional conformations of F_1 subunits from other species (i.e., bovine or thermophilic bacterial subunits) to rotate according to the newly described $3^\circ \times 120^\circ$ rotation unique of the Pd F_1 -ATPase and not according to the multiple rotary stepping in the other bacterial or mitochondrial F_1 -ATPases (Zarco-Zavala et al., 2020). This indicates that the Pd F_1 individual subunits have the potential to induce other heterologous F_1 subunits to adapt to their structure and catalytic rotary mechanism; thus, the Pd F_1 subunits work as robust dominant subunits (Watanabe et al., 2023). It seems, therefore, suitable to suggest that the Pd F_1 -ATPase, but not the Sm F_1 , is similarly able to induce the structural transition from the compact 5- α -helical non-inhibitory conformer of Sm- ζ (Figures 7, 8B), into its inhibitory N-terminal extended α -helical conformation (Figures 8D; Supplementary Figure S6A) to produce the observed Pd F_1 or Pd F_1F_0 -ATPase inhibition.

MD analyses have been previously helpful in analyzing the inhibitory and regulatory mechanisms of the ϵ subunit from non- α -proteobacteria (Krah and Takada, 2016; Krah et al., 2021; Krah et al., 2023) and the mitochondrial IF $_1$ (Dominguez-Ramirez et al., 2006), describing differences in regulatory ATP binding in ϵ and a hinge separating the inhibitory and anchoring domains of IF $_1$. Thus, we carried out MD analyses of the ζ subunit to shed light on the inhibitory and regulatory mechanisms of the ζ subunit. The MD analyses carried out here showed clearly that the inhibitory Pd- ζ subunit may experience, although sporadically, since it was observed in one of the 3 MD replications, a spontaneous transition from the N-terminus disordered conformation to the N-terminus extended α -helical conformation mimicking the inhibitory conformer of Pd- ζ

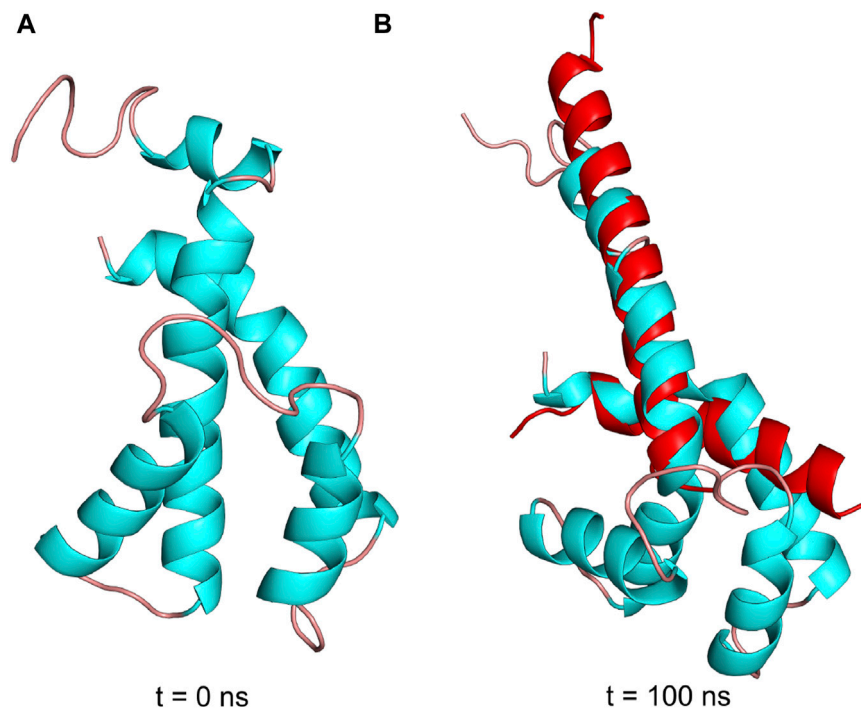


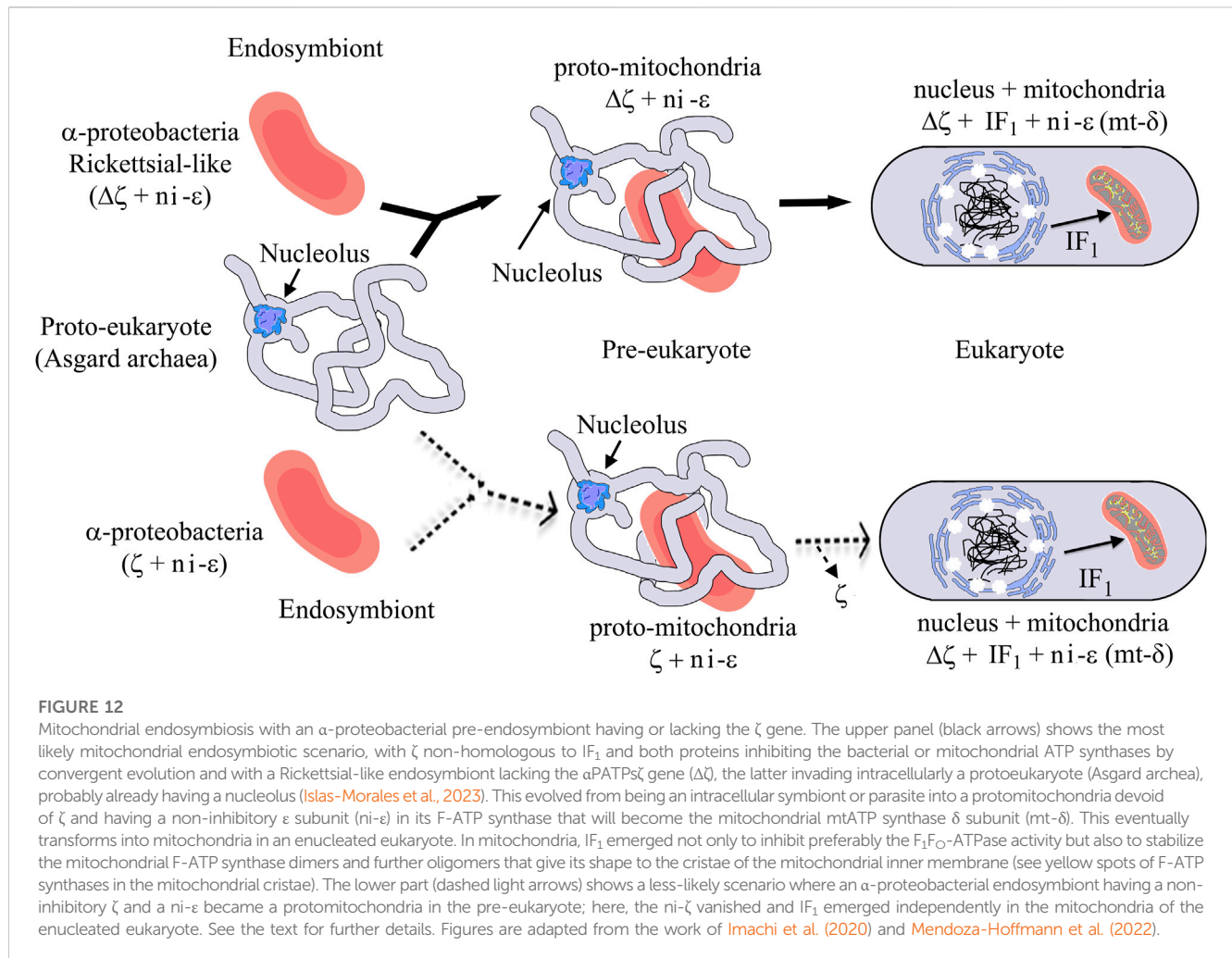
FIGURE 11

Pd ζ structures during simulation at pH 8. **(A)** Initial structure in the MD simulation at constant pH (pHMD). **(B)** Structure after 100 ns of MD simulation. In red is the structure of the N- and C-termini of Pd- ζ obtained by crystallography (PDB_id 5DN6). As can be seen, the pHMD simulation predicts the spontaneous ordering and formation of the extended N-terminal inhibitory α -helix of Pd- ζ , very similar to the inhibitory N-terminal extended conformation of Pd- ζ bound to its inhibitory site in the native PdF₁F₀- ζ complex (PDB_id 5DN6, red). See also [Supplementary Movie S1](#); [Supplementary Figures S8A–D](#) for details.

bound productively to the PdF₁ (Garcia-Trejo et al., 2016) or PdF₁F₀ complexes (Morales-Rios et al., 2015). However, in its three MD replications, the non-inhibitory Sm- ζ subunit was unable to experience a similar transition from the ordered and folded 5- α -helical bundle to the N-terminal extended inhibitory α -helical conformer of Sm- ζ (see [Figure 11](#) and [Supplementary Figure S8](#) and [Supplementary Videos 1, 2](#)). This is in concordance with the lack of inhibitory function of Sm- ζ on its own SmF₁-ATPase and indicates that a larger energetic barrier exists in Sm- ζ to achieve the transition from the compact non-inhibitory conformation to its N-terminal α -helical extended inhibitory conformer. Somehow, the PdF₁-ATPase, but not the SmF₁-ATPase, is able to overcome this energetic barrier due to its tendency to work as a dominant PdF₁-ATPase to induce functional conformations on the reconstituted ATP synthases' heterologous subunits from other species, adapted to the PdF₁-ATPase subunits (Watanabe et al., 2023), thus taking the Sm- ζ to the N-terminal α -helical extended inhibitory conformer.

Our evolutionary results might have important implications in the endosymbiotic evolution from α -proteobacteria to mitochondria. In the case of the origin of mitochondria, it is strongly suggestive that the origin of mitochondria, as shown by rRNA evolution ([Figure 9](#)), indicates that the parasitic or symbiotic α -proteobacteria lacking the ζ subunit are surrounded very closely by the origin of mitochondria ([Figure 9](#)), with the latter most likely evolving from these α -proteobacteria (John and Whatley, 1975a; John and Whatley, 1975b; Andersson et al., 1998; Gray et al., 1999; Archibald, 2015; Ku et al., 2015) (although some other proposals outside the α -proteobacteria

have also emerged (Martijn et al., 2018; Cevallos and Degli Esposti, 2022)). Thus, we suggest two scenarios, of which the most likely is the one in which mitochondria evolved from a pre-mitochondria originating from an endosymbiotic event involving a protoeukaryote (likely Asgard archaea, which probably already had a nucleolus, as shown recently (Islas-Morales et al., 2023)) and a Rickettsiales-like α -proteobacteria endosymbiont already lacking ζ ($\Delta\zeta$) and having a non-inhibitory ϵ subunit that eventually became the mitochondrial non-inhibitory δ subunit of the mitochondrial F-ATPase (mtATPase) (Mendoza-Hoffmann et al., 2022) ([Figure 12](#)). This settled the evolutionary pressure for the independent emergence by *evolutionary convergence* of the mitochondrial IF₁ as the endogenous inhibitor of the mtATPase, which is not homologous to the α -proteobacterial ζ subunit (Mendoza-Hoffmann et al., 2022). IF₁ eventually also promoted the mtATPase dimerization, oligomerization, and mitochondrial cristae formation, as we demonstrated previously (Minauro-Sanmiguel et al., 2005; Garcia et al., 2006). In a less-likely scenario, the protomitochondria might have evolved from a protoeukaryote and an endosymbiotic α -proteobacteria having a non-inhibitory ζ subunit that was eventually lost during the transition from protomitochondria to modern mitochondria, with the emergence of IF₁ by *convergent evolution* and the concomitant formation of mitochondrial cristae ([Figure 12](#), bottom panel). We propose this scheme based on the mutually exclusive presence of ζ or IF₁ in α -proteobacteria and mitochondria, respectively, and their non-homologous character (see also the work of Mendoza-Hoffmann et al. (2022)).



Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Author contributions

FM-H and LY contributed equally to this work. FM-H also carried out the purification of the F_1 and ζ preparations of *S. meliloti*, *R. etli*, and *M. nodulans*, besides the Wp- F_1 , and the cloning of rhizobial ζ s and wrote part of the paper. DB assisted in the refinement of the NMR structure of Sm- ζ . GG-J cloned the Cs- ζ . JB-S modeled the structure of Cs- ζ and Rr- ζ , overexpressed and carried out their functional studies, and prepared chromatophores. ES performed the ConSurf analysis and the *in silico* MD of Pd- ζ . CU-A and SU-C obtained the *W. pipientis* growth and bacterial cell harvesting. RO assisted in the microbiology of all strains used and in media preparation. OS-S assisted in the purification of the Pd- ζ subunit. MA-C assisted in the cloning of all recombinant ζ subunits used. LR-S designed, carried out, and analyzed the CD experiments. GP-H assisted, supervised, and provided infrastructure for the MD analysis of Pd- ζ . HC-S contributed to the growth of photosynthetic α -proteobacteria and in the preparation of chromatophores. JG-T designed the project, got

the main grant support, carried out functional studies with Sm- ζ and Pd- ζ , all the curve fitting analyses, and all the analysis of Alpha-Fold ζ structures, assisted in the CD experiments and secondary structure calculations, and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The main projects supporting this work are UNAM grants, PAPIIT-DGAPA numbers IN217520 and IN211923 to JG-T and IN201021 to LR-S, and the National Natural Science Foundation of China grant 21904088 to LY.

Acknowledgments

FM-H acknowledges CONACYT postdoctoral fellowship 770689. The technical support of Adan Martinez-Torres is gratefully acknowledged. Prof. Kurt Wüthrich is gratefully acknowledged for the agreement to show and use the NMR structure of Sm- ζ . The technical support of Claudia Peña-Segura in the growth of photosynthetic α -proteobacteria is gratefully acknowledged. Mary Ann Moran (Department of Marine Sciences, University of Georgia, United States) is gratefully acknowledged for the

kind donation of the *Jannaschia* sp. strains. Laura Camarena Mejía from the Institute of Biomedical Research (IIB) of UNAM, México, is acknowledged for the kind donation of *R. capsulatus*. The authors acknowledge the time and work of the reviewers, editors, and journal staff handling this particularly long paper. All suggestions improved the final version of this paper. This paper is dedicated to our beloved memory of Prof. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, a major authority in the ATP synthase and Bioenergetics fields, and advisor of JG-T, LR-S, and GPE, who sadly passed away in the course of this submission.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., et al. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133–140. doi:10.1038/24094
- Archibald, J. M. (2015). Evolution: gene transfer in complex cells. *Nature* 524, 423–424. doi:10.1038/nature15205
- Behrens, M. I., and De Meis, L. (1985). Synthesis of pyrophosphate by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* in the light and by soluble yeast inorganic pyrophosphatase in water-organic solvent mixtures. *Eur. J. Biochem.* 152, 221–227. doi:10.1111/j.1432-1033.1985.tb09187.x
- Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., et al. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. doi:10.1002/jcc.20290
- Cevallos, M. A., and Degli Esposti, M. (2022). New alphaproteobacteria thrive in the depths of the ocean with oxygen gradient. *Microorganisms* 10, 455. doi:10.3390/microorganisms10020455
- Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: an $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98, 10089–10092. doi:10.1063/1.464397
- de la Rosa-Morales, F. (2005). *Composición de subunidades y Mecanismo de Regulación de la F1FoATP sintasa de Paracoccus denitrificans*. *Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental), Facultad de Ciencias., Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.)*. Dirección General de Bibliotecas, 75.
- Domínguez-Ramírez, L., Gómez-Puyou, A., and de Gómez-Puyou, M. T. (2006). A hinge of the endogenous ATP synthase inhibitor protein: the link between inhibitory and anchoring domains. *Proteins* 65, 999–1007. doi:10.1002/prot.21189
- Feniouk, B. A., Cherepanov, D. A., Junge, W., and Mulikidjanian, A. Y. (1999). ATP-Synthase of rhodobacter capsulatus: coupling of proton flow through F₀ to reactions in F₁ under the ATP synthesis and slip conditions. *FEBS Lett.* 445, 409–414. doi:10.1016/S0014-5793(99)00160-x
- Feniouk, B. A., Cherepanov, D. A., Voskoboinikova, N. E., Mulikidjanian, A. Y., and Junge, W. (2002). Chromatophore vesicles of *Rhodobacter capsulatus* contain on average one F₀F₁-ATP synthase each. *Biophysical J.* 82, 1115–1122. doi:10.1016/S0006-3495(02)75470-2
- Feniouk, B. A., Mulikidjanian, A. Y., and Junge, W. (2005). Proton slip in the ATP synthase of rhodobacter capsulatus: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 184–194. doi:10.1016/j.bbabi.2004.10.010
- García, J. J., Morales-Rios, E., Cortes-Hernandez, P., and Rodriguez-Zavala, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Biochemistry* 45, 12695–12703. doi:10.1021/bi060339j
- García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernandez-Luna, E., Ortega, R., and Mendoza-Hernandez, G. (2016). The inhibitory mechanism of the zeta subunit of the F₁F₀-ATPase nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and related alphaproteobacteria. *J. Biol. Chem.* 291, 538–546. doi:10.1074/jbc.M115.688143
- Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476–1481. doi:10.1126/science.283.5407.1476
- Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., et al. (2020). Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.* 11, 468. doi:10.3389/fmicb.2020.00468
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65, 712–725. doi:10.1002/prot.21123
- Imachi, H., Nobu, M. K., Nakahara, N., Morono, Y., Ogawara, M., Takaki, Y., et al. (2020). Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface. *Nature* 577, 519–525. doi:10.1038/s41586-019-1916-6
- Islas-Morales, P. F., Cárdenas, A., Mosqueira, M. J., Jiménez-García, L. F., and Voolstra, C. R. (2023). Ultrastructural and proteomic evidence for the presence of a putative nucleolus in an Archaeon. *Front. Microbiol.* 14. doi:10.3389/fmicb.2023.1075071
- Jarman, O. D., Biner, O., and Hirst, J. (2021). Regulation of ATP hydrolysis by the ϵ subunit, ζ subunit and Mg-ADP in the ATP synthase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica biophysica acta. Bioenergetics* 1862, 148355. doi:10.1016/j.bbabi.2020.148355
- John, P., and Whatley, F. R. (1975a). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* 254, 495–498. doi:10.1038/254495a0
- John, P., and Whatley, F. R. (1975b). *Paracoccus denitrificans*: a present-day bacterium resembling the hypothetical free-living ancestor of the mitochondrion. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 39–40.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926–935. doi:10.1063/1.445869
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., et al. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci. a Publ. Protein Soc.* 27, 112–128. doi:10.1002/pro.3280
- Krah, A. (2015). Linking structural features from mitochondrial and bacterial F-type ATP synthases to their distinct mechanisms of ATPase inhibition. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 119, 94–102. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.005
- Krah, A., and Takada, S. (2016). On the ATP binding site of the ϵ subunit from bacterial F-type ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 332–340. doi:10.1016/j.bbabi.2016.01.007
- Krah, A., van der Hoeven, B., Mestrom, L., Tonin, F., Knobel, K. C. C., Bond, P. J., et al. (2021). A second shell residue modulates a conserved ATP-binding site with radically different affinities for ATP. *General Subj.* 1865, 129766. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129766
- Krah, A., Vogelaar, T., de Jong, S. L., Claridge, J. K., Bond, P. J., and McMillan, D. G. G. (2023). ATP binding by an F₁F₀ ATP synthase ϵ subunit is pH dependent, suggesting a diversity of ϵ subunit functional regulation in bacteria. *Front. Mol. Biosci.* 10, 1059673. doi:10.3389/fmolb.2023.1059673
- Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Sousa, F. L., Lockhart, P. J., Bryant, D., et al. (2015). Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature* 524, 427–432. doi:10.1038/nature14963
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015). ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. theory Comput.* 11, 3696–3713. doi:10.1021/acs.jctc.5b00255

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2023.1184200/full#supplementary-material>

- Maldonado, E., Dreyfus, G., Garcia, J. J., Gomez-Puyou, A., and de Gomez-Puyou, M. T. (1998). Unisite ATP hydrolysis by soluble *Rhodospirillum rubrum* F1-ATPase is accelerated by Ca²⁺. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 70–78. doi:10.1016/s0005-2728(97)00083-2
- Margulis, L., and Chapman, M. J. (1998). Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends Microbiol.* 6, 342–345. discussion 345–6. doi:10.1016/s0966-842x(98)01325-0
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P., and Ettema, T. J. G. (2018). Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature* 557, 101–105. doi:10.1038/s41586-018-0059-5
- Mendoza-Hoffmann, F. (2018). *Rol biológico de la subunidad ζ como un inhibidor unidireccional de la F1Fo-ATPasa de Paracoccus denitrificans* Departamento de Biología. Facultad de Química, Laboratorio del Dr José J. García-Trejo, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesi-UNAM, 193.
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Celis-Sandoval, H., Torres-Larios, A., and García-Trejo, J. J. (2022). Evolution of the inhibitory and non-inhibitory ε, ζ, and IF(1) subunits of the F(1)F(O)-ATPase as related to the endosymbiotic origin of mitochondria. *Microorganisms* 10, 1372. doi:10.3390/microorganisms10071372
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., and García-Trejo, J. J. (2018a). Control of rotation of the F1Fo-ATP synthase nanomotor by an inhibitory alpha-helix from unfolded epsilon or intrinsically disordered zeta and IF1 proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* 50, 403–424. doi:10.1007/s10863-018-9773-9
- Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, A., Cevallos, M. A., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Peña-Segura, C., et al. (2018b). The biological role of the ζ subunit as unidirectional inhibitor of the F1Fo-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Cell Rep.* 22, 1067–1078. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.106
- Miconai, A., Moussong, É., Murvai, N., Tantos, Á., Tóke, O., Réfrégiers, M., et al. (2022a). Disordered-ordered protein binary classification by circular dichroism spectroscopy. *Front. Mol. Biosci.* 9, 863141. doi:10.3389/fmolb.2022.863141
- Miconai, A., Moussong, É., Wien, F., Boros, E., Vadász, H., Murvai, N., et al. (2022b). BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 50, W90–W98. doi:10.1093/nar/gkac345
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and Garcia, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12356–12358. doi:10.1073/pnas.0503893102
- Morales-Rios, E. (2011). *Clonación, sobre-expresión, purificación y caracterización de las subunidades epsilon y de 11KDA presentes en la ATP sintasa de Paracoccus denitrificans*, Departamento de Bioquímica, Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM., 115.
- Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., et al. (2010). A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1Fo ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB J.* 24, 599–608. doi:10.1096/fj.09-137356
- Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13231–13236. doi:10.1073/pnas.1517542112
- Onufriev, A., Bashford, D., and Case, D. A. (2004). Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins* 55, 383–394. doi:10.1002/prot.20033
- Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., et al. (2013). Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 845–854. doi:10.1093/bioinformatics/btt055
- Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 238, 3762–3769. doi:10.1016/s0021-9258(19)75338-1
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular Dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341. doi:10.1016/0021-9991(77)90098-5
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14, 255–274. doi:10.1016/0022-5193(67)90079-3
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231. doi:10.1016/0003-2697(91)90094-a
- Serrano, P., Geralt, M., Mohanty, B., and Wuthrich, K. (2014). NMR structures of alpha-proteobacterial ATPase-regulating zeta-subunits. *J. Mol. Biol.* 426, 2547–2553. doi:10.1016/j.jmb.2014.05.004
- Serrano, P., Pedrini, B., Mohanty, B., Geralt, M., Herrmann, T., and Wüthrich, K. (2012). The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution. *J. Biomol. NMR* 53, 341–354. doi:10.1007/s10858-012-9645-2
- Sternweis, P. C., and Smith, J. B. (1980). Characterization of the inhibitory (epsilon) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 19, 526–531. doi:10.1021/bi00544a021
- Turina, P., Giovannini, D., Gubellini, F., and Melandri, B. A. (2004). Physiological ligands ADP and Pi modulate the degree of intrinsic coupling in the ATP synthase of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* 43, 11126–11134. doi:10.1021/bi048975+
- Turina, P., Rumberg, B., Melandri, B. A., and Graber, P. (1992). Activation of the H(+)-ATP synthase in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 267, 11057–11063. doi:10.1016/s0021-9258(19)49874-8
- Uribe-Alvarez, C., Chiquete-Félix, N., Morales-García, L., Bohórquez-Hernández, A., Delgado-Buenrostro, N. L., Vaca, L., et al. (2019). Wolbachia pipientis grows in *Saccharomyces cerevisiae* evoking early death of the host and deregulation of mitochondrial metabolism. *MicrobiologyOpen* 8, e00675. doi:10.1002/mb03.675
- Varghese, F., Blaza, J. N., Jones, A. J. Y., Jarman, O. D., and Hirst, J. (2018). Deleting the IF1-like zeta subunit from *Paracoccus denitrificans* ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biol.* 8, 170206. doi:10.1098/rsob.170206
- Watanabe, R. R., Kiper, B. T., Zarco-Zavala, M., Hara, M., Kobayashi, R., Ueno, H., et al. (2023). Rotary properties of hybrid F(1)-ATPases consisting of subunits from different species. *iScience* 26, 106626. doi:10.1016/j.isci.2023.106626
- Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., and García-Trejo, J. J. (2018). Unidirectional regulation of the F1Fo-ATP synthase nanomotor by the zeta pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 762–774. doi:10.1016/j.bbabi.2018.06.005
- Zarco-Zavala, M., Morales-Rios, E., Mendoza-Hernandez, G., Ramirez-Silva, L., Perez-Hernandez, G., and Garcia-Trejo, J. J. (2014). The zeta subunit of the F1Fo-ATP synthase of alpha-proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB J.* 28, 2146–2157. doi:10.1096/fj.13-241430
- Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Serrano-Navarro, P., Wuthrich, K., Mendoza-Hernández, G., Ramirez-Silva, L., et al. (2013). Corrigendum to “the ζ subunit of the α-proteobacterial F1Fo-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: a novel control mechanism of the central rotor” [biochim. Biophys. Acta 1817S (2012) S27–S28]. *Biochimica Biophysica Acta* 1827, 60. doi:10.1016/j.bbabi.2012.09.010
- Zarco-Zavala, M., Watanabe, R., McMillan, D. G. G., Suzuki, T., Ueno, H., Mendoza-Hoffmann, F., et al. (2020). The 3 × 120° rotary mechanism of *Paracoccus denitrificans* F1-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F1-ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2004). Energy-dependent transformation of F0F1-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 12319–12324. doi:10.1074/jbc.M311397200