



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CLONACIÓN, SOBRE-EXPRESIÓN,
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LAS SUBUNIDADES ÉPSILON Y DE 11KDA
PRESENTES EN LA ATP SINTASA DE
Paracoccus denitrificans

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

EDGAR MORALES RÍOS



Tutor: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MÉXICO, D. F. a 24 de Agosto de 2011

CLONACIÓN, SOBRE-EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES ÉPSILON Y DE 11
kDa PRESENTES EN LA ATP SINTASA DE *Paracoccus denitrificans*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José de Jesús García Trejo en el laboratorio 117, en el Departamento de Biología del Edificio 'F' de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. José de Jesús García Trejo
Dra. Marietta Tuena Sangri
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Facultad de Química, UNAM
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Marietta Tuena Sangri, del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo algunos experimentos de ultracentrifugación diferencial.

Se reconoce la colaboración del Dr. Heliodoro Celis Sandoval, del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de obtención de cromatóforos de diferentes Alfa-proteobacterias.

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

Se reconoce la colaboración del Dr. Alfredo Torres Larios, del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de clonación de las subunidad épsilon carente de 9 aminoácidos del carboxilo terminal.

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza, del Departamento de Genética Molecular de la Facultad de Medicina, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de secuenciación de proteínas mediante espectrometría de masas y degradación de Edman.

Se reconoce la colaboración del Dr. John E. Walker, del Mitochondrial Biology Unit del Medical Research Council en Cambridge, UK, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de escalamiento de la purificación de la PdF₁ y la PdF₁F₀.

Se reconoce la colaboración del Dr. Kurt Wütrich, del Scripps Research Institute en La Jolla, California, USA, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de resolución de la estructura atómica de la subunidad ζ de la ATP sintasa de *P. denitrificans*.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Paulina Cortés Hernández en los experimentos de producción de anticuerpos poli-clonales en conejo.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (B43814-M) y PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN213809). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 01 Septiembre de 2011

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Diego Gonzalez Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Leticia H. Ramirez Silva	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Xóchitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química, al Instituto de Fisiología Celular, a la Facultad de Medicina y al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional De Cardiología 'Ignacio Chávez', donde me alojaron generosamente para poder realizar este trabajo durante estos años.

A la Doctora Marietta Tuena Sangri y al Doctor Armando Gómez Puyou quienes han sido mi inspiración como investigadores en este maravilloso campo de la Bioquímica desde que tuve el honor de conocerlos.

A mi tutor, el Doctor José de Jesús García Trejo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio desde mi tesis de licenciatura. De él he aprendido la belleza de la Bioenergética y la Termodinámica, así como la inmensa pasión que tiene por la ciencia, gracias José.

A mi padre Luis Morales Franco quién me enseñó que incluso las cosas más sencillas se deben hacer bien. Además por el increíble apoyo que he recibido durante estos 30 años, nunca lo olvidaré. Gracias Papá.

A mi madre Concepción Ríos Álvarez por siempre escucharme, aconsejarme e impulsarme. Ella es el mayor ejemplo de vida para mi. Nunca lo hubiera logrado sin ti. Gracias Mamá.

A mi hermano Daniel Morales Ríos de quien he aprendido muchas cosas, aunque no lo crea.

A mis abuelos Macaria Álvarez, Domingo Ríos y Josefina Franco de quienes aprendí que no importa de dónde vengas, tú puedes llegar a ser lo que tú quieras, si trabajas por ello.

A mis tíos Dario Morales y Ana Ríos porque fueron como mis segundos padres.

A mis primos Efren Morales y Fabián Morales, mis hermanos, porque hemos compartido una vida juntos, además porque con ellos iniciamos ese gran proyecto Mors, que tantas aventuras nos han dado.

A mis compañeros de la banda Mors: Alberto Hernández, Emmanuel Galván, Hugo Guerrero y Jonathan Leal. Con quien he compartido mis triunfos y derrotas en tantos y tantos eventos. Gracias amigos. Están en orden alfabético para que no se peleen.

A mis compañeros de laboratorio Fernando Minauro, Margarita López, Fernanda de la Rosa, Paulina Cortés, Sergio Couoh, Mariel Zarco y Carlos Chávez, con quienes, a lo largo de estos años, he compartido ideas, experimentos, enseñanzas así como experiencias de vida.

Finalmente quiero agradecer a mi esposa, mi mejor amiga, mi compañera, mi confidente, mi cómplice, mi inspiración, y sin embargo también; mi más duro árbitro, Viridiana Olin Sandoval. Gracias por las increíblemente largas conversaciones-discusiones de ciencia, por las críticas objetivas y siempre atinadas. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu comprensión, por tu paciencia. GRACIAS POR TODO. A ti te dedico esta tesis, todo este trabajo y esfuerzo. Siempre seremos tu y yo. TE AMO.

¡Gracias!

CLONACIÓN, SOBRE-EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES ÉPSILON Y DE 11 kDa PRESENTES EN LA ATP SINTASA DE *Paracoccus denitrificans*

CARÁTULA.....	1
RECONOCIMIENTOS.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE.....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
I. <i>Paracoccus denitrificans</i>	12
II. La ATP sintasa.....	16
III. Mecanismos de inhibición de la ATPasa mediados por subunidad	
i) F ₁	18
ii) Subunidad ε de bacterias.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
I. Amplificación, clonación y sobre-expresión de la subunidad de 11 kDa (ζ)	
y de la subunidad ε.....	25
II. Purificación de la subunidades ζ y ε.....	26
III. Cultivo de <i>Paracoccus denitrificans</i> cepa PD1222.....	28
IV. Aislamiento de vesículas invertidas de <i>P. denitrificans</i>	29
V. Determinación de proteína por el método de Lowry modificado.....	30
VI. Determinación de la actividad de hidrólisis.....	30
VII. Obtención de Partículas Sub-Bacterianas (PSB) a partir de membranas de	
<i>Paracoccus denitrificans</i>	32
VIII. Geles nativos azules y segunda dimensión desnaturante (BN- PAGE).....	32
i. 2da dimensión desnaturante.....	33
IX. Purificación de la F ₁ de <i>P. denitrificans</i> (PdF ₁) mediante el método de	
extracción con cloroformo.....	33
X. Pruebas de unión de la proteína de ζ en la PdF ₁	34
XI. Pruebas de oligomerización de la subunidad ζ.....	34
XII. Determinación de la estructura secundaria de las subunidades ζ y ε	
mediante dicroísmo circular.....	34
XIII. Síntesis de ATP.....	35

XIV.	Anticuerpos policlonales anti- ζ	35
XV.	SDS-PAGE Schagger y von Jagow.....	36
XVI.	Inmunodetecci3n por medio de la transferencia de la subunidad de 11 kDa a membranas de PVDF en presencia de amortiguador CAPS.....	38
XVII.	Acoplamiento de los anticuerpos policlonales anti- ζ	39
XVIII.	Desprendimiento de la subunidad de ζ de la PdF1.....	39
XIX.	Determinaci3n de la actividad de ATPasa mediante el m3todo espectrofotom3trico.....	40
XX.	Análisis de membranas de otras α -proteobacterias en busca de la subunidad ζ	40
	i. Aislamiento de cromat3foros de las α - proteobacterias.....	40
	ii. Tinci3n por actividad <i>in</i> <i>gel</i>	41
XXI.	Entrecruzamientos de la PdF1.....	42
XXII.	Entrecruzamiento de las PSB.....	42
XXIII.	Geles de poliacrilamida con SDS no reductor y segunda dimensi3n reductora.....	42
XXIV.	Modelado molecular de la subunidad ϵ y ζ de <i>P.</i> <i>denitrificans</i>	43
XXV.	Dinámica molecular del modelo estructural de la subunidad ϵ de <i>P. denitrificans</i>	44
XXVI.	Remoci3n del extremo carboxilo terminal de la subunidad ϵ de la PdF1.....	44
XXVII.	Prote3lisis limitada de la subunidad ζ i. Tripsina.....	45
	ii. Quimotripsina.....	46
XXVIII.	C3lulas de <i>P. denitrificans</i> cultivadas en condiciones de anaerobiosis.....	46
XXIX.	Estructura at3mica de la subunidad ζ de <i>P. denitrificans</i>	47
XXX.	Purificaci3n de la PdF1 con Q-sefarosa.....	47
XXXI.	Purificaci3n de la PdF1F0 con Q-sefarosa.....	48
RESULTADOS Y DISCUSI3N.....		50
I.	Amplificaci3n, clonaci3n y sobre-expresi3n de la subunidad de ζ y de la subunidad ϵ	50
II.	Purificaci3n de las subunidades ζ y ϵ	51
III.	Reconstituci3n de las subunidades ζ y ϵ	52
IV.	Pruebas de uni3n entre la subunidad ζ y la subunidad ϵ recombinantes a la PdF1.....	53
V.	Anticuerpos policlonales anti subunidad ζ	55
VI.	Desprendimiento de la subunidad de la PdF1.....	56
VII.	Identificaci3n de la subunidad ζ en otras α -proteobacterias.....	58
VIII.	Entrecruzamientos.....	59

IX.	Oligomerización de la subunidad ζ de <i>P. denitrificans</i>	63
X.	Determinación de la estructura secundaria de las subunidades ζ y ϵ mediante dicroísmo circular.....	64
XI.	Modelado estructural de la subunidad ϵ de <i>P. denitrificans</i>	65
XII.	Purificación de la subunidad ϵ sin el fragmento extra.....	67
XIII.	Purificación de PdF ₁ con Q-sefarosa.....	68
XIV.	Purificación de PdF ₁ F ₀ con Q-sefarosa.....	69
XV.	Proteólisis limitada de la subunidad ζ	70
XVI.	Células de <i>P. denitrificans</i> cultivadas en condiciones de anaerobiosis.....	71
XVII.	Estructura atómica de la subunidad ζ de <i>P. denitrificans</i>	72
CONCLUSIONES.....		75
PERSPECTIVAS.....		76
LITERATURA CITADA.....		77
APÉNDICES		
I.	Artículos publicados durante el doctorado.....	81

RESUMEN

Comparando el perfil de bandas de la F₁-ATPasa y del complejo F₁F₀ de *Paracoccus denitrificans* en un SDS-PAGE, se resuelve una nueva proteína de un peso de 11 kDa, adicional a las 5 subunidades canónicas que se encuentran en las F₁-ATPasas hasta el momento descritas para bacterias, α , β , γ , δ , y ϵ . Geles de dos dimensiones (2D-PAGE) confirman la presencia de esta proteína de 11 kDa unida a la ATP sintasa de *P. denitrificans*, tal como se observa en los complejos F₁ y F₁F₀ aislados. Las subunidades de 11 kDa y ϵ recombinantes fueron clonadas, sobre-expresadas, purificadas y reconstituidas en la F₁F₀ en partículas sub bacterianas y en la F₁ soluble. La subunidad que tuvo un efecto inhibitorio fue la subunidad de 11 kDa, no así la subunidad ϵ . Nombramos a la subunidad de 11 kDa como la subunidad ' ζ ' de la ATP sintasa de *P. denitrificans*. Esta subunidad interactúa con las subunidades α y β en el estado inhibido de la PdF₁, pero en su estado activo, la subunidad ζ , deja de interactuar con las subunidades α y β y se reacomoda para interactuar parcialmente con la subunidad ϵ entre otras subunidades. Estudios estructurales de dicroísmo circular y de resonancia magnética nuclear, resolvieron la estructura secundaria y terciaria de la subunidad ζ aislada, lo cual combinado con experimentos de proteólisis limitada mostraron que el dominio inhibitorio de esta subunidad se encuentra el extremo N-terminal y/o en el C-terminal que se encuentran adyacentes en la estructura terciaria de esta nueva proteína inhibidora.

La subunidad ζ también se encontró en *Rhodobacter sphaeroides* asociada a su F₁F₀-ATPasa nativa. Además, la actividad de F₁-ATPasa de cromatóforos de *R. sphaeroides* fueron inhibidos parcialmente por la subunidad ζ de *P. denitrificans*.

Todos estos datos nos demuestran un nuevo mecanismo de inhibición del nanomotor F₁F₀-ATPasa de *P. denitrificans* y de otras α -proteobacterias.

ABSTRACT

Comparing the band profile in SDS-PAGE of the F₁-ATPase and of the F₁F₀ complex of *Paracoccus denitrificans*, a novel 11-kDa protein was resolved in addition to the 5 canonical α , β , γ , δ , and ϵ subunits present in all known bacterial F₁-ATPase complexes. BN-PAGE followed by 2D-SDS-PAGE confirmed the presence of this 11-kDa protein bound to the native F₁F₀-ATP synthase of *P. denitrificans*, as it was observed after being isolated. The recombinant 11 kDa and ϵ subunits of *P. denitrificans* were cloned, overexpressed, isolated, and reconstituted on the particulate F₁F₀ and soluble F₁-ATPase complexes. The 11-kDa protein, but not the ϵ subunit, inhibited the F₁F₀ and F₁-ATPase activities of *P. denitrificans*. We named the 11-kDa protein, the ' ζ ' subunit of the ATP synthase. This subunit interacts with α and β subunits in the inactive PdF₁ but in the active PdF₁, the ζ subunit is re-oriented away from α and β subunits but interacting partially with ϵ among other subunits. Structural studies of circular dichroism and nuclear magnetic resonance resolved the secondary and tertiary structure of the isolated ζ subunit, these results together with limited proteolysis showed that the inhibitory domain of this subunit is found on the N-terminal and/or C-terminal domains which are close to each other in the tertiary structure of this novel inhibitory protein.

The ζ subunit was also found in *Rhodobacter sphaeroides* associated to its native F₁F₀-ATPase.

Taken together, the data unveils a novel inhibitory mechanism exerted by this 11-kDa protein on the F₁F₀-ATPase nanomotor of *P. denitrificans* and closely related α -proteobacteria.

ABREVIATURAS

ATP. Adenosina Trifosfato.

Bis-Tris. 2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propaneidol.

BN-PAGE. Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida.

CAPS. Ácido Ciclohexilamino-propiosulfónico.

EACA. Ácido aminohexanóico

EDTA. Ácido Etileno-amino-tetracético.

IF₁. Proteína inhibidora de la F₁F₀-ATPasa mitocondrial.

LDAO. Óxido de Dimetil-dodecil amina.

PBS ó PBST. Amortiguador de fosfatos con o sin Tween 20.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

PDB. Banco de datos de proteínas.

PdF1. F1 de *Paracoccus denitrificans*.

PdF1FO. PdF1FO de *Paracoccus denitrificans*. PMSF. Fenilmetanosulfonil Fluoruro.

PSB. Partículas Sub Bacterianas.

PVDF. Poliviniliden difluoruro.

SDS-PAGE. Electroforesis de geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil-sulfato de sodio.

TCA. Ácido tricloroacético.

Tris. Hidrometil amino-metano.

WB. Western blot.

INTRODUCCION

I. *Paracoccus denitrificans*

Paracoccus denitrificans es un micro-organismo de forma cocoide, gram negativo, sin motilidad y fue aislado de suelo por primera vez por Beijerinck (1) bajo el nombre de *Micrococcus denitrificans*. La selección original de la especie fue basada en su habilidad de convertir nitrato (NO_3^-) a óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) o nitrógeno molecular (N_2). Esta especie se encuentra clasificada taxonómicamente dentro del Super Reino de las bacterias, Phylum Proteobacterias, Clase Alfa proteobacterias, Orden Rhodobacterales, Familia Rhodobacteraceae y del Género *Paracoccus* (2). Las especies del género *Paracoccus* tienen un alto contenido de (G+C) que va del 63.8 al 70.2% (3). Además, las especies dentro de este género, utilizan un amplia variedad de compuestos inorgánicos para crecer incluyendo acetona, dimetilformamida, tiocianato, además de que dos cepas de *Paracoccus denitrificans* crecen en disulfuro de carbono. Por estas propiedades de crecimiento se ha propuesto a este género como biorremediador. Actualmente, a *P. denitrificans*, junto con *Nitrosomonas europaea* se les utiliza en biotecnología para descontaminar aguas con altas concentraciones de amonio (4) particularmente porque utiliza nitrato y sus productos de reducción como aceptores de electrones como una alternativa a la utilización de oxígeno durante el crecimiento respiratorio o anaerobio (5).

La clase de las α -proteobacterias es un grupo que tiene cercanía filogenética con el protoendosimbionte aerobio que, según la teoría de Lynn Margulis, fue engullido por otra bacteria fermentativa y con el paso de la evolución, este endosimbionte dio origen a las mitocondrias que conocemos actualmente (6). La evidencia que apoya esta teoría endosimbiótica fue inicialmente comparativa entre la estructura y función de las cadenas respiratorias de las α -proteobacterias y las actuales mitocondrias, y posteriormente a raíz de las similitudes entre las secuencias de ADN y de las proteínas mitocondriales, cuyos

homólogos se encuentran presentes en las α -proteobacterias. Por ejemplo, funcionalmente se relacionó a *P. denitrificans* con el origen mitocondrial dado que esta bacteria resultó poseer los cuatro complejos respiratorios presentes en las mitocondrias, a diferencia de algunas eubacterias como *Escherichia coli* que carecen del complejo IV o citocromo oxidasa. Además de esto, la función respiratoria de *P. denitrificans* medida como velocidad de consumo de oxígeno por medio de polarimetría con un electrodo de oxígeno mostró una propiedad única de las mitocondrias que no está presente en el resto de las bacterias: *P. denitrificans* mostraba una aceleración de la velocidad respiratoria en respuesta a la adición de ADP como sustrato de la fosforilación oxidativa, lo cual se denomina “control respiratorio”, abreviado C.R. Cuantitativamente el “C.R.” es el cociente entre la velocidad respiratoria en presencia de ADP sobre la velocidad en ausencia del mismo, y *P. denitrificans* mostró un C.R. de 1.85, el cual es un valor similar al de las mitocondrias aisladas y que tienen funcionalmente acopladas la respiración y la síntesis de ATP (7). Comparativamente, el mismo valor de C.R. en otras bacterias es de 1, es decir que no responden a la adición del ADP como lo hacen las mitocondrias acopladas. Así mismo, se observó que la respiración de *P. denitrificans* responde de manera similar a la respiración mitocondrial cuando se adicionan inhibidores o desacoplantes de la cadena respiratoria (7). Estas similitudes funcionales evidenciaron una posible cercanía evolutiva entre las α -proteobacterias como *P. denitrificans* y el proto-endosimbionte que dio origen a las mitocondrias, sin embargo la evidencia más sólida para apoyar estas aseveraciones proviene de la construcción de árboles de relaciones filogenéticas utilizando las estructuras primarias de las subunidades apocitocromo b, COXI y COXII de la citocromo oxidasa (8). Este tipo de análisis es posible ya que *P. denitrificans* posee en su membrana citoplasmática a los complejos respiratorios: complejo I o NADH deshidrogenasa, II o succinato deshidrogenasa, III o ubiquinol-citocromo c oxido-reductasa, IV o citocromo c oxidasa, purificados previamente a partir de membranas de *P. denitrificans* como se

describe en las referencias (9), (10), (11) y (12), respectivamente. Estos complejos han sido purificados y caracterizados, excepto por el complejo V o ATP sintasa. Los complejos respiratorios de *P. denitrificans* que se han purificado han resultado ser versiones 'sencillas' de su contraparte mitocondrial, es decir son complejos multiproteicos que contienen menos subunidades comparados con sus homólogos mitocondriales. Gracias a esto, algunas α -proteobacterias han sido utilizadas como modelo de estudio para poder comparar el comportamiento de estos complejos con su contraparte mitocondrial, dado que los análisis estructurales a nivel atómico son mas sencillos de realizar con proteínas mas pequeñas. Tal es el caso del complejo IV o la citocromo oxidasa de *P. denitrificans*, el cual fue purificado, caracterizado y además se logró resolver su estructura cristalográfica y así proponer el mecanismo de acción de su homólogo en las mitocondrias (13). En esta misma línea, aún no se ha purificado al complejo V o ATP sintasa de este micro-organismo, el complejo clave en la fosforilación oxidativa, esto se debe a que no se ha logrado purificar una F_1 -ATPasa ni un complejo F_1F_0 estable de esta bacteria; es probable que la latencia funcional como ATPasa del complejo F_1F_0 de *P. denitrificans*, que se discutirá mas adelante, haya interferido con intentos previos de aislar a esta enzima de forma nativa y funcional. Las secuencias de los genes de las subunidades de la F_1 y de la F_0 de *P. denitrificans* se encuentran separados entre sí, pero los genes de ambos subcomplejos están localizados en uno solo de los dos cromosomas que posee este micro-organismo (14). La ATP sintasa de *P. denitrificans* es particularmente importante porque se ha observado que tiene la velocidad de síntesis más rápida que se ha observado en las ATP sintasas hasta ahora descritas y en contraste, en cuanto a la actividad de ATPasa se refiere, es una de las más lentas que se ha observado hasta el momento, de tal manera que se puede concluir que el complejo F_1F_0 de *P. denitrificans* es un factor de acoplamiento unidireccional que funciona casi exclusivamente en el sentido de la síntesis del ATP (15-17). En nuestro grupo se ha observado que esta

actividad de ATPasa puede ser activada por oxianiones tales como el fosfato inorgánico (Pi), el bicarbonato, el arsenato, el vanadato y el sulfito, siendo este último el que más activa la hidrólisis de ATP de la enzima, de $0.02\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg prot})^{-1}$ a $450\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg prot})^{-1}$ en cuanto a velocidades máximas se refiere (18). Los mecanismos de activación que se han propuesto para el sulfito son; 1. El sulfito modifica la afinidad del sitio de unión del Mg^{2+} -ADP desprendiéndolo de su sitio inhibitorio (19-22), evitando así que la enzima se auto-inhiba cinéticamente, 2. por otro lado se ha observado (23) que al mutar a la glicina 305 de la subunidad γ por alanina en la F_1F_0 -ATP sintasa de *Rhodospirillum rubrum*, el sulfito ya no tiene efecto activador alguno sobre la k_{CAT} de la F_1 -ATPasa, sugiriendo que la región del residuo G305 puede ser parte del sitio de unión al sulfito. 3. Finalmente en otro trabajo de nuestro grupo (24) se observó que al incubar a vesículas invertidas de *P. denitrificans* con sulfito y titular con la proteasa tripsina, el incremento en la actividad de ATPasa mostró un comportamiento aditivo en los efectos del sulfito y la proteasa. Esto sugiere que el sulfito tiene efectos estructurales exponiendo a la hidrólisis por la tripsina a una, o varias subunidades responsables de la inhibición de dicha actividad en el complejo F_1F_0 .

En nuestro laboratorio (25) se purificó a la F_1 y a la F_1F_0 ATP sintasa de *P. denitrificans* y se encontró que además de las subunidades características de la F_1 -ATPasa de *E. coli* y el resto de las bacterias descritas previamente, las cuales son: α , β , γ , δ y ϵ (Tabla 1), había una sexta subunidad adicional de un peso aproximado de 11 kDa, la cual en un gel de poliacrilamida desnaturizante en presencia de SDS (SDS-PAGE), migra por debajo de la subunidad ϵ (25). Coincidentemente, si se compara en un carril paralelo a la F_1 -ATPasa de *P. denitrificans* con la F_1 -ATPasa mitocondrial conteniendo a su inhibidor intrínseco, la subunidad de 11 kDa de *P. denitrificans* co-migra con la denominada proteína inhibidora mitocondrial o IF_1 , la cual es la encargada de inhibir la actividad de

F₁F₀-ATPasa en las mitocondrias cuando el gradiente electroquímico de protones se abate (26).

II. La ATP sintasa

Tabla 1. Composición de subunidades de las diferentes ATP sintasas de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bos taurus*. En subíndices, la estequiometría con respecto a γ . Modificado de (27)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Bos taurus</i>	Pesos moleculares (kDa)
F ₁	α_3	α_3	α_3	55.1
	β_3	β_3	β_3	50.1
	γ	γ	γ	32.4
	δ	OSCP	OSCP	21.0
	ϵ	δ	δ	15.1
		ϵ	ϵ	5.7
		IF1	IF1	10.0
F ₀	a	Sub. 6	Sub. 6	19.0
	b ₂	Sub. 4	b	24.0
	c ₁₀	Sub. 9 ₁₀	c ₉₋₁₅	7.6
		Sub. 7	d	?
		e	e	?
		f	f	?
		g	g	?
		h	F6	?
		Sub. 8	A6L	?

El complejo V o F₁F₀-ATP sintasa es un motor rotacional que acopla la energía en forma de gradiente electroquímico de protones y de unión del nucleótido en su forma de Mg²⁺-ADP y fosfato, a la síntesis de ATP (28-31). El gradiente es provocado por el paso de los electrones a través de la cadena de respiratoria, utilizando como sustratos los

equivalentes reductores o metabolitos que provienen de las diversas vías metabólicas (NADH, FADH, Succinato). Cuando esto sucede en la bacteria, se bombean protones del lado citosólico al espacio periplásmico y se forma un gradiente por las diferencias de cargas y de pH en ambos lados de la membrana, el gradiente electroquímico de protones o $\Delta\mu_{H^+}$. Debido a este último, los protones tienden a regresar hacia el citoplasma, este flujo de protones es facilitado por el canal F_0 de la ATP sintasa, finalmente este flujo de protones a través de F_0 es acoplado conformacionalmente a la síntesis de ATP en la cabeza catalítica o F_1 para sintetizar al ATP a partir de ADP y P_i . Para ser transportados, los protones encuentran un hemicanal formado entre las subunidades a y el anillo de subunidades c . Cada una de las subunidades c contiene un carboxilo esencial que se protona secuencialmente del lado periplásmico, cede el protón a una arginina esencial de la subunidad a y se desprotona del lado citosólico. La protonación de cada subunidad c en un hemicanal, y la desprotonación de otra subunidad c en el otro hemicanal le confiere un movimiento giratorio al anillo de subunidades c , el cual arrastra a la subunidad ϵ y ésta a su vez a la subunidad γ , juntas estas subunidades son denominadas 'rotor', el cual gira con respecto al hetero-hexámero de subunidades α , β , que junto con las subunidades δ , b y a , forman el 'estator'. Para demostrar que el 'rotor' gira con respecto al estator, se realizaron varios experimentos de entrecruzamiento y marcaje fluorescente de la subunidad γ , pero el experimento más concluyente fue en el que se le unió un filamento fluorescente a las subunidades γ o ϵ de la F_1 , o al anillo de subunidades c (para el último caso) que se encontraba inmovilizada por la subunidad β , que es parte del 'estator' y por microscopía de fluorescencia, se observó directamente y por primera vez, el movimiento rotacional (32-35). Los 3 sitios catalíticos de la F_1 -ATPasa se encuentran formados entre las subunidades α y β . Al moverse, la subunidad γ provoca movimientos conformacionales simultáneos en los 3 sitios catalíticos los cuales provocan los cambios de afinidad por los nucleótidos de adenina y el fosfato, de acuerdo al modelo de cambio

de unión de Boyer (36). En este modelo, las tres conformaciones de los sitios catalíticos abierta, semiabierta y cerrada se alternan en respuesta al giro de la subunidad γ . En la conformación abierta se tiene una alta afinidad por el ADP y el Pi, en la conformación semiabierta el ADP y el Pi están unidos a la enzima, finalmente en la conformación cerrada sucede la condensación entre el ADP y el Pi para así sintetizar al ATP.

Como mencionamos anteriormente, la enzima se comporta como un motor molecular reversible, es decir que puede girar tanto en el sentido de la síntesis del ATP como en el sentido opuesto de su hidrólisis, la porción soluble o F_1 puede ser separada experimentalmente y mantener su capacidad hidrolítica (37). El giro hacia el sentido de la hidrólisis de ATP es utilizado por la célula para producir un gradiente de protones, que es utilizado para mantener el estado metabólico de la célula. Para regular el giro de la enzima en el sentido de ATPasa, los organismos presentan varios sistemas; para el caso del complejo V mitocondrial de los eucariontes, se tiene la IF_1 que es una proteína de un peso de 10 kDa que evita el giro de la enzima en el sentido de la hidrólisis de ATP (26). Para los cloroplastos, se presenta un mecanismo en el cual se produce un enlace disulfuro interno en la subunidad γ , además de la inhibición por Mg^{2+} -ADP y la subunidad ϵ . Finalmente para el caso de las bacterias hasta ahora estudiadas, el mecanismo de inhibición es llevado a cabo por la subunidad ϵ , subunidad que al igual que la proteína IF_1 , evita el giro de la enzima en el sentido de la hidrólisis del ATP (38).

III. Mecanismos de inhibición de la ATPasa mediados por subunidad

i) IF_1

En eucariontes se ha descrito a la proteína inhibidora de la ATPasa de las mitocondrias o IF_1 , la cual es una proteína de 84 residuos de aminoácidos y un peso de 10 kDa que tiene la función principal de inhibir el sentido de la hidrólisis de ATP por la F_1F_0 -ATPasa (26). Se ha observado que esta proteína entrecruza a una distancia de 12\AA con las subunidades γ ,

δ y ϵ que son parte del rotor de la enzima (39) y además el carboxilo terminal de la IF_1 se ha observado que entrecruza con la subunidad OSCP, que es parte del estator cuando no está inhibiendo a la enzima. La IF_1 se une a la ATP sintasa con una estequiometría de 1:1 (40).

En la estructura cristalográfica (41) se observa que la IF_1 establece contactos con las subunidades α , β , y γ , entonces se propone que la IF_1 evita tanto los cambios conformacionales de las subunidades β catalíticas como la rotación del rotor con respecto al estator, evitando así que el ATP sea hidrolizado. La IF_1 se oligomeriza dependiendo del pH en el que se encuentre, cuando el pH es de aproximadamente 6.5, la IF_1 se encuentra en su forma inhibitoria más activa que se ha propuesto es la forma dimérica de la proteína (42). En tejido cardíaco, en condiciones de hipoxia ocasionada por isquemia ya sea quirúrgica o patológica, el gradiente electroquímico de protones se colapsa y la enzima tiende termodinámicamente a utilizar el ATP que hay en la célula para re-establecer en lo posible al gradiente electroquímico mitocondrial, y así mantener las funciones principales de la célula. En células humanas en cultivo, se ha observado que al inhibir la respiración, la IF_1 mantiene la concentración de ATP en el citosol, a expensas del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\psi_m$) y así evita que la célula entre en apoptosis o necrosis (43). Cuando el pH se alcaliniza, la IF_1 deja de ser activa como inhibidor, lo cual se ha propuesto está ligado a la auto-asociación de la IF_1 como tetrámero inactivo (42), pero esto no se ha demostrado. Las condiciones *in vitro* de $pH \approx 8$ son similares a las condiciones de mitocondrias energizadas por un sustrato oxidable que al respirar generan un $\Delta\mu_{H^+}$, dado que el transporte de los protones de la matriz hacia el espacio intermembranal alcaliniza a la primera donde se localiza la porción catalítica (F_1) de la ATP sintasa. Por lo tanto, en condiciones energizadas en la mitocondria la enzima gira prácticamente solo en el sentido de la síntesis de ATP, gracias a que el $\Delta\mu_{H^+}$ libera a la enzima de la inhibición ejercida por la IF_1 en condiciones desenergizadas. Se ha

observado un retraso de forma sigmoïdal en el curso temporal del inicio de la fosforilaci3n oxidativa, y se ha propuesto que 3ste se debe a que la velocidad inicial de la s3ntesis de ATP tambi3n es inhibida por la IF₁ (44). En este modelo, se propone tambi3n que la aceleraci3n de la velocidad de s3ntesis de ATP se debe a la presencia del $\Delta\mu_{H^+}$, el cual induce la disociaci3n (45, 46) o alternativamente el reacomodo de la IF₁ sin disociarse de la ATP sintasa, de tal manera que el gradiente de protones desinhibe a la enzima previamente bloqueada por la IF₁. En resumen, la IF₁ inhibe los dos sentidos funcionales de la enzima, tanto el giro del rotor hacia hidr3lisis del ATP como el sentido contrario hacia su s3ntesis, sin embargo, al establecerse un $\Delta\mu_{H^+}$ la IF₁ se mueve y as3 deja de inhibir el sentido de la s3ntesis de ATP. La regi3n m3nima inhibitoria de la IF₁ se encuentra en los residuos del 14-47, el cual es el dominio 3ntimamente unido entre el rotor (γ) y el estator (β) de la F₁-ATPasa de acuerdo a las estructuras cristalogr3ficas disponibles (41, 47). Por el otro lado, en el dominio carboxilo terminal existen motivos repetidos que abarcan series de 7 amino3cidos, las denominadas h3ptadas, en esta parte se forman 'zippers' o cremalleras de leucina entre dos mon3meros, es decir que el d3mero de la prote3na es antiparalelo (48), adem3s se ha propuesto que este dominio carboxilo-terminal se une a la subunidad OSCP cuando la IF₁ no se encuentra inhibiendo a la enzima (49). Sin embargo, este dominio carboxilo terminal dimerizante no se ha resuelto estructuralmente en el IF₁ end3geno unido a la F₁-ATPasa, a diferencia del dominio N-terminal inhibitorio que se ha demostrado hace contactos directos con las subunidades γ y β de la IF₁ bloqueando as3 la actividad de la enzima.

ii) Subunidad ϵ de bacterias

La subunidad ϵ es la subunidad encargada de la inhibici3n de la actividad de ATPasa bacteriana, pero mantiene intacta la actividad de ATP sintasa de la F₁F₀-ATP sintasa (38). Esta subunidad pesa en promedio 15 kDa en las diferentes bacterias. Se compone de dos dominios; el amino terminal, que es un dominio de s3banas β y el carboxilo terminal, el

cual está compuesto de dos alfa hélices muy móviles. Se ha resuelto la estructura cristalográfica del tallo central en la F_1 de *E. coli* (50), inicialmente por medio de la reconstitución de las subunidades γ y ε (51) observándose que una de las dos alfa-hélices de ε se encuentran extendidas hacia el dominio de la subunidad γ que están en contacto con las subunidades α y β . Además en otro trabajo (38) por medio de entrecruzadores con la enzima soluble, se observa que la subunidad ε entrecruza con las subunidades α y β . Con base en estos resultados se ha propuesto que este dominio carboxilo terminal sufre un cambio de conformación muy amplio, en el cual se extienden las dos regiones de alfa hélice del carboxilo terminal y así se logra el entrecruzamiento con las subunidades α y β . Además, se ha propuesto que la subunidad ε , al extender su extremo carboxilo terminal se entrelaza con la subunidad γ y así evita que la enzima gire en el sentido de hidrólisis de ATP de la enzima. En *Bacillus* PS3 se ha demostrado que esta subunidad une ATP (52) y así mantiene la conformación 'cerrada', la cual permite el giro de la enzima, sin embargo cuando hay una baja concentración de ATP, se favorece la conformación abierta, la cual evita que la enzima gire en el sentido de la hidrólisis de ATP, pero el sentido de la síntesis no se ve alterado. Por lo tanto, la subunidad ε funciona como un trinquete, permitiendo el giro del motor molecular hacia un lado pero evitando el giro hacia el otro sentido. Recientemente se resolvió la estructura cristalina de la F_1 -ATPasa de *E. coli* conteniendo a la subunidad ε en la forma extendida la cual resuelve claramente que las dos α -hélices de ε se entrelazan con la subunidad γ para inhibir así la rotación intrínseca de la enzima (53); en este trabajo se propone que además de las conformaciones "extendida" o inhibitoria y "cerrada" o no-inhibitoria de ε , el cambio de una a otra conformación pasa por un estado intermedio semi-extendida o semi-cerrada que es similar al inicialmente encontrado en la estructura resuelta de las subunidades γ y ε reconstituidas (53) como se muestra en la figura 1.

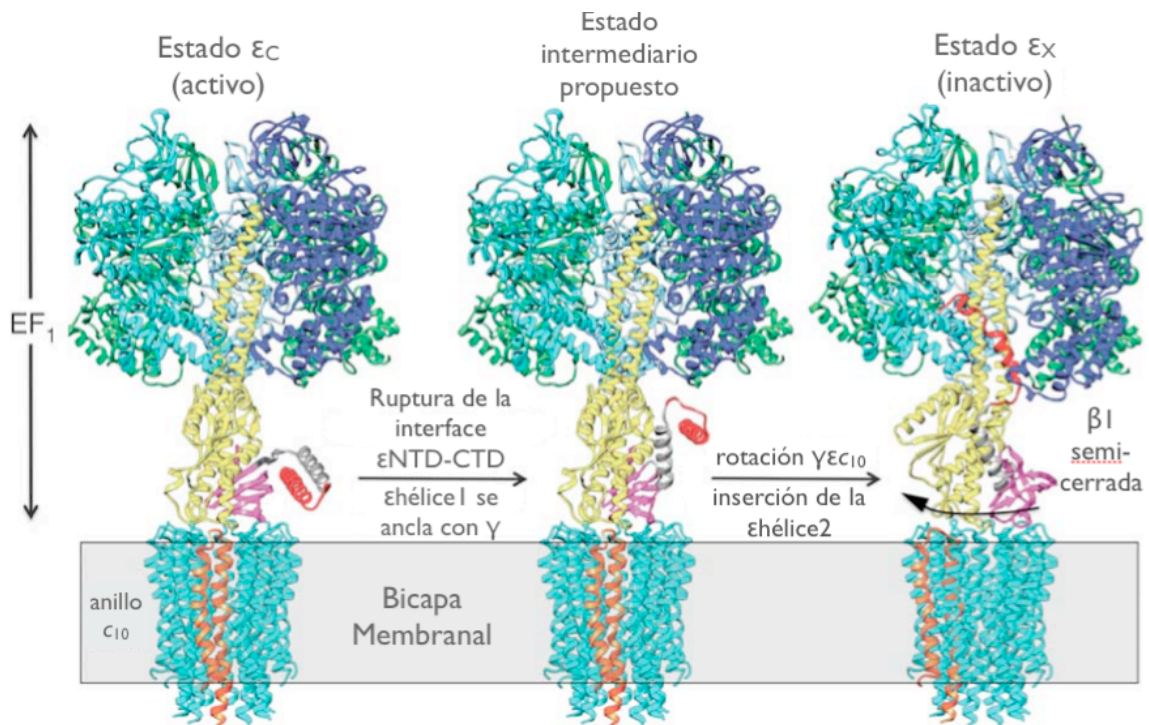


Figura 1. Modelo de inhibición de la actividad de la F_1 -ATPasa mediado por la subunidad ϵ , modificado de (53). El modelo atómico fue compuesto con las estructuras del anillo de subunidades c_{10} de levadura (54) y la F_1 -ATPasa de *E. coli* (53). Se muestra la membrana en gris donde se encuentra el anillo de subunidades c_{10} , como parte de la F_0 . La subunidad α_1 no se muestra para poder observar en la cavidad del hetero-hexámero $\alpha_3\beta_3$. La parte F_1 sobresale de la membrana. El primer modelo nos muestra el estado ϵ_c o activo de la F_1 , donde puede hidrolizar al ATP. Se muestra la interfase dominio amino terminal-dominio carboxilo terminal de la subunidad ϵ (ϵ NTD-CTD). La ϵ -hélice 1 (ϵ 82–105) se muestra en gris y la ϵ -hélice 2 (ϵ 106–138) en rojo. Cuando esta interfase se abre la ϵ -hélice 1 se ancla con la subunidad γ . El segundo modelo muestra un estado intermedio que se propone donde la ϵ -hélice 1 ya está anclada a la subunidad γ ; posteriormente ocurre una rotación de las subunidades $\epsilon\gamma c_{10}$ y la ϵ -hélice 2 se ancla a la subunidad γ . Finalmente se origina el tercer modelo, el modelo ϵ_x , en donde ϵ NTD se encuentra totalmente extendido e inactiva a la F_1 mientras que la subunidad β_1 se encuentra en estado semi-cerrado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el caso de *Paracoccus denitrificans*, no se ha descrito un mecanismo de inhibición de la actividad de ATPasa. Entonces este proyecto se enfocará en determinar si la subunidad de 11 kDa y/o la subunidad ϵ presentes en la F_1F_0 -ATP sintasa de este organismo son las responsables de la regulación del sentido de hidrólisis de ATP en este

micro-organismo, así como determinar los parámetros cinéticos de dicha inhibición y el mecanismo de inhibición de dichas subunidades, si es el caso.

HIPÓTESIS

El mecanismo de inhibición de la actividad de F₁-ATPasa en *Paracoccus denitrificans* está mediado por la subunidad. Una de las posibles responsables, es la subunidad ϵ al igual que en las demás bacterias descritas hasta ahora. El otro candidato es la subunidad de 11 kDa. En este último caso el mecanismo de inhibición sería un nuevo mecanismo totalmente diferente a los mecanismos ya conocidos.

OBJETIVOS

- ▶ Determinar qué subunidad o subunidades son las responsables de la inhibición de la actividad de la F₁-ATPasa en *Paracoccus denitrificans*
- ▶ Analizar las estructuras secundarias/terciarias de las subunidades de 11 kDa y ϵ de la ATP sintasa de *P. denitrificans*
- ▶ Resolver el mecanismo de inhibición de la o las subunidades que se encuentran inhibiendo a la PdF₁-ATPasa de *P. denitrificans*

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Amplificación, clonación y sobre-expresión de la subunidad de 11 kDa (ζ) y de la subunidad ϵ de *Paracoccus denitrificans*

Subunidad ζ

La subunidad de 11 kDa de la F₁F₀ de *P. denitrificans* purificada, fue analizada mediante degradación de Edman, para conocer la secuencia primaria de su amino terminal, a partir de esta secuencia (TTFDDRERAXEAKF) se realizó un análisis mediante el programa BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) y se encontró en el primer blanco una proteína hipotética de *P. denitrificans*, la Pden_2862 cuya función era desconocida. Al analizar la secuencia completa de esta proteína en el programa TrEMBL, alojado en el servidor ExPASy (www.expasy.org) se encontró que el peso aproximado es de 11.6 kDa y el punto isoeléctrico es de 4.76. Con la secuencia del gen, de un tamaño de 380 pares de bases que codifica dicha proteína, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

-PdzNTerm (5'TATATTCATATGACCACATTTGACGACCGC)

-PdzCTerm (5'-TATACTA- AGCTTTCAGATCTCGCTGATGATCTG)

Usando como templado el ADN cromosomal de *P. denitrificans*, con sitios de restricción para las enzimas NdeI (5') y HindIII (3'), se llevó a cabo una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de ADN obtenido fue analizado por geles de agarosa al 1.0% y purificados con el sistema para purificar ADN a partir de geles (Promega) y fueron secuenciados mediante secuenciación directa, obteniendo como resultado un alineamiento con el 100% de identidad con la secuencia deseada. El producto de PCR fue clonado en el vector pT7-7 que confiere a la célula hospedera, en este caso *E. coli* cepa DH-5 α , resistencia a ampicilina, con el fin de obtener una cantidad considerable del vector con el gen de la proteína de 11 kDa insertado en su secuencia. Con dicho vector, se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL21 en la cual el vector utilizará la maquinaria de transcripción y traducción de *E. coli* para sobre-expresar a la

proteína de interés. Ya transformadas y seleccionadas por su resistencia a ampicilina (100µg/ml), al alcanzar una absorbencia de 0.6 unidades a 600 nm, las células fueron inducidas con 1 mM de IPTG para sobre-expresar a la proteína.

Subunidad ϵ

Se utilizó la misma metodología para clonar y sobre-expresar a la subunidad ζ , pero para este caso se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

-PdeNTerm (5'-TACTAACATATGGCCGACACGATG)

-PdeCTerm (5'-ATAATAAGCTTCTAATGCGGGAAATTC)

El fragmento amplificado resultante fue de 477 pares de bases.

II. Purificación de la subunidades ζ y ϵ

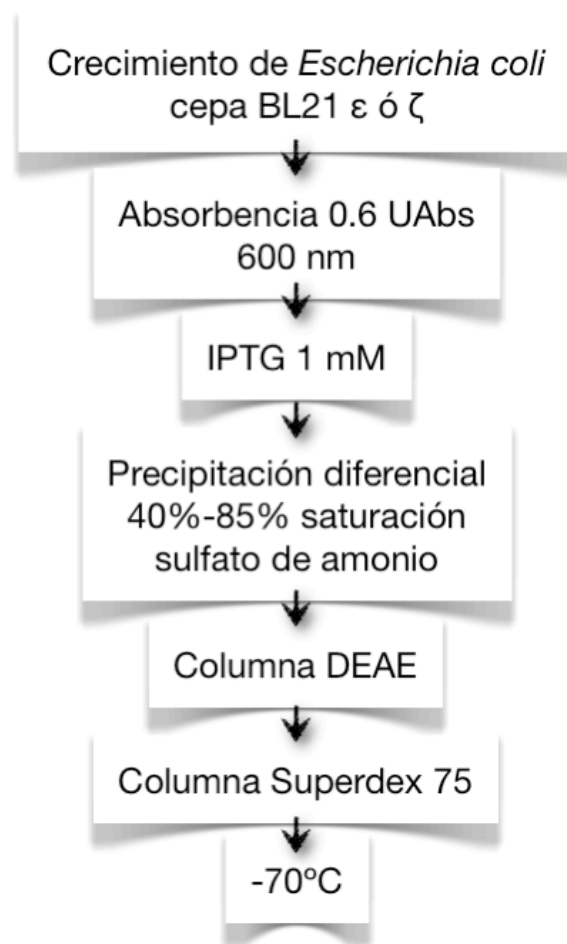


Figura 2. Diagrama de flujo de la purificación de las subunidades ϵ y ζ . Los amortiguadores aparecen descritos a detalle en el apartado escrito.

Como se muestra en el diagrama de la figura 2, se cosechó un litro de células inducidas con IPTG 1 mM (isopropil-tiogalactopiranosido de Invitrogen, USA) al alcanzar una absorbencia de 0.6 UA a 600 nm. Posteriormente se lavaron con un amortiguador que contenía 20 mM de NaCl y 10 mM de Tris pH 7.0. La pastilla se resuspendió en un amortiguador con 20 mM fosfato de sodio pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.07% PMSF. La suspensión de células fue sonicada a 110 Watts en baño de hielo 10 veces 10 segundos cada una, dejando enfriar por intervalos de 50 segundos, se agregó DNAsa (Boehringer, Alemania) a una relación de 1 mg/g de células, se centrifugó 10 minutos a 15000 rpm en el rotor SS-34 (Sorvall) a 4°C y al sobrenadante se llevó a 40% de saturación de sulfato de amonio incubando 15 minutos en baño de hielo. Se centrifugó nuevamente 10 minutos a 15000 rpm en el rotor SS-34 (Sorvall) a 4°C, al sobrenadante se le agregó un 45% adicional de saturación de sulfato de amonio y se incubó durante 15 minutos en baño de hielo para alcanzar un porcentaje final de 85% de saturación; posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 15000 rpm en el rotor SS-34 (Sorvall) a 4°C y el botón resultante se resuspendió en el amortiguador conteniendo 20 mM fosfato de sodio pH7.0, 1 mM EDTA, 0.07% PMSF. Para remover el exceso de sulfato de amonio se utilizó un filtro Amicon de corte de 5 kDa (Millipore, USA), se diluyó la muestra 1:10 con el mismo amortiguador y se centrifugó 30 minutos a 3800 rpm a 4°C en el rotor 75006445 (Sorvall/Heraeus), este proceso se repitió tres veces, al final el sulfato de amonio en la muestra queda diluido aproximadamente 6000 veces. La muestra desalada se pasó ahora por una columna de intercambio aniónico (DEAE), ya que a pH 7.0 la proteína tiene una carga parcial positiva. Para eluirla, se utilizó un gradiente de fosfato de sodio de 20 mM a 40 mM. Las fracciones se analizaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 16% de acuerdo al método reportado (55). Se concentraron las fracciones con un mayor enriquecimiento de la subunidad de 11 kDa. La muestra concentrada se cargó a una columna de filtración en gel denominada Superdex

75 con el sistema de HPLC ÄKTA (Amersham) a un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones puras se concentraron y se almacenaron a -70°C.

III. Cultivo de *Paracoccus denitrificans* cepa PD1222

Se inoculó con una asada de *P. denitrificans*, cepa PD1222 (adquirida al Biól. Juan Estrada Mora, Jefe del cepario del CINVESTAV campus Zacatenco) a 3 tubos con 5 ml de medio Luria Bertani previamente esterilizado.

Medio Luria Bertani: Para 950 ml de H₂O desionizada se agrega: triptona 10 g., extracto de levadura 5 g., NaCl 10 g. Se ajustó el volumen a 1 litro con H₂O desionizada y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 psi en ciclo líquido.

Los tubos se incubaron a 37°C, en agitación orbital a 160 rpm durante 24 hrs. Cada uno de estos tubos, una vez turbios, se inocularon a un matraz con 50 ml de medio Luria Bertoni previamente esterilizado y se mantuvo a 37°C con agitación orbital de 160 rpm, durante 24 hrs. Con cada uno de estos matraces con 50 ml de cultivo, se inoculó un matraz con 900 ml de medio succinato previamente esterilizado, adicionando 25 µg/ml de rifampicina.

Medio succinato: ácido succínico 1%, fosfato de potasio 50 mM, cloruro de amonio 75 mM, sulfato de sodio 11.5 mM, cloruro de magnesio 1.25 mM, ácido cítrico 1 mM, solución madre de sal 1 ml/l. (solución madre de sal: cloruro de calcio 0.1 M, cloruro de hierro 90 mM, cloruro de manganeso 50 mM, cloruro de zinc 25 mM, cloruro de cobalto 10 mM, ácido bórico 10 mM, disuelto en HCl 1:1)

Se incubó a 37°C con agitación de 160 rpm durante 24 hrs.

IV. Aislamiento de vesículas invertidas de *P. denitrificans* (56)

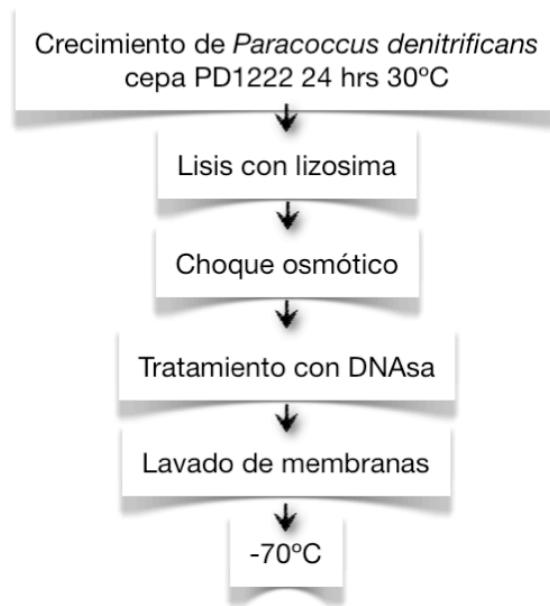


Figura 3. Diagrama de flujo del método para aislar vesículas invertidas de *P. denitrificans*. Los amortiguadores están descritos a detalle en el apartado escrito.

Como se observa en la figura 3, una vez que el medio con succinato alcanzó una lectura de absorbencia de 1.5 a 690 nm, se centrifugó el volumen total (2.7 litros) a 6000 rpm durante 15 min (centrífuga Sorvall rotor RC-5B) resuspendiendo la pastilla en un volumen total de 750 ml de NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7.5). La muestra resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min. (centrífuga Sorvall rotor RC-5B), se reunió en 2 tubos grandes y se resuspendió en un volumen total de 800 ml de sacarosa 0.5 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), posteriormente se añadió EDTA 5 mM y enseguida se añadió lizosima: 264 µg, se incubó a 30°C durante 3 horas con una leve agitación. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min (centrífuga Sorvall rotor RC-5B), la pastilla resultante, se resuspendió en un volumen total de 45 ml de Tris-acetato 0.1 M pH 7.5 + ATP 10 mM + 405 ml de H₂O + PAB 5 mM + PMSF 1 mM con agitación suave. Después de 20 minutos, se añadió MgCl₂ 5 mM y DNasa I (la punta de una espátula) y se incubó a

30°C hasta que se disminuyó la viscosidad. La muestra se centrifugó (centrífuga Sorvall rotor SLA 1500) a 13,000 rpm durante 60 min.

Se resuspendió la película roja en 45 ml de MgSO₄ 1 mM + Tris-acetato 10 mM + para-aminobenzamidina (PAB) 5 mM + PMSF 1 mM (pH 7.5) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 40 min. (centrífuga Sorvall rotor SLA 1500), la película roja se resuspendió nuevamente en un volumen de 7-9 ml de sacarosa 250 mM + Tris-HCl 10 mM + PAB 5 mM + PMSF 1 mM (pH 7.5) y se almacenó a -70°C.

V. Determinación de proteína por el método de Lowry modificado (57, 58)

La concentración de proteína de las muestras se determinó por medio de un método de Lowry modificado (58), precipitando las muestras con TCA previo a la determinación para eliminar cualquier interferencia. A la muestra (5-10µl) se le añadió 0.1 ml de desoxicolato (DOC) 0.15% incubando 10 min. a temperatura ambiente (agitando en Vortex cada 5 min.). Después se añadió 0.1 ml de TCA 72%, incubando 10 min. a 4°C (baño de agua + hielo) y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C, durante 15 min. (en una microfuga Eppendorf 5415 C). Se resuspendió la pastilla de proteína en 100 µl de agua. Se agregó 0.8 ml de mezcla a + b de Lowry incubando 10 min. a temperatura ambiente. Después se añadió 100 µl de Folin diluido 1:1 con agua y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se leyó la absorbencia de las muestras a 660 nm. en celda de 1 ml de plástico y con los datos obtenidos se realizó un ajuste lineal de la curva estándar y se interpolaron valores experimentales, reportando la concentración de proteína de la muestra original (mg/ml).

VI. Determinación de la actividad de hidrólisis

La actividad de hidrólisis del ATP catalizado por las ATPasas se determinó a través del fosfato liberado del ATP por las muestras que contienen a la F₁-ATPasa, ya sea particulada (PSB) o soluble. Para ello, una vez detenida la reacción de ATPasa, el fosfato liberado se acompleja con molibdato en medio ácido en donde, el complejo fosfo-

molibdato, se reduce presentando un color azul que se analiza mediante la absorción a 690 nm en el espectrofotómetro.

Para el caso de la F_1F_0 -ATPasa de *P. denitrificans* se ha observado además que la adición de sulfito estimula la actividad de hidrólisis del ATP (18).

Es por ello que en el análisis de actividad de hidrólisis además de la adición de ATP se han utilizado el sulfito y la temperatura como activadores.

El ensayo se realizó de la siguiente manera:

- a. Adicionamos 30 μ g de proteína a 1 ml de mezcla de reacción (KCl 125 mM, Tris 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0.1 mM, (pH 8.4) + 60 μ M de sulfito, agitando por 2 min. a 37°C.
- b. Iniciamos la reacción añadiendo ATP 5 mM durante exactamente 1 ó 2 min. Agitando y manteniendo la temperatura a 37°C.
- c. Transcurrido ese tiempo detenemos la reacción con 0.2 ml de TCA 30% frío y los tubos reposaron en hielo por 5 min.
- d. Se centrifugó a 5000 rpm, por 15 min. (microfuga Beckman)
- e. Se tomó 1 ml del SN + 2.6 ml de H_2O destilada + 1 ml de molibdato de amonio (disuelto en 3.3% de H_2SO_4 3.75 N), incubando por 10 minutos.
- f. Se añadió 0.2 ml de sulfato ferroso al 10% hasta que se desarrollara el color durante aproximadamente 10 min.
- g. Registramos la absorbencia a 690 nm. En paralelo a la determinación de actividad de hidrólisis de las muestras se realizó una curva estándar con valores desde 0-750 nmol de fosfato.
- h. Realizamos un ajuste lineal de los valores obtenidos en la curva estándar para después interpolar los valores experimentales.
- i. Los valores se expresaron generalmente como $nmol^*(min^{-1}*mg\ prote\acute{i}na^{-1})$.

VII. Obtención de partículas sub-bacterianas (PSB) a partir de membranas de *Paracoccus denitrificans*

Las vesículas invertidas de *P. denitrificans* se diluyeron a 10 mg/ml de proteína en un amortiguador que contenía glicerol 10%, sacarosa 250 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1mM, ATP-Mg 0.1 mM, 4-amino benzamidina (PAB) 2.5 mM y se sonicaron a 110 Watts en baño de hielo 8 veces durante 10 segundos cada una, para después se centrifugar a 15000 rpm en el rotor SS-34 (sorvall) durante 20 min. a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se puso en hielo, mientras se resuspendió la pastilla en el mismo amortiguador para volverlo a sonicar en baño de hielo por 8 veces durante 10 segundos cada vez. Se centrifugó a 15000 rpm en el rotor SS-34 (sorvall) durante 10 minutos a 4°C. Se juntan los dos sobrenadantes y se volvió a centrifugar a 45000 rpm en el rotor 50Ti durante 1 hora a 4°C. Las pastillas se resuspendieron en 3ml de amortiguador que contenía glicerol 10%, sacarosa 250 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA1 mM, Mg²⁺ATP 0.1 mM, 4-amino benzamidina (PAB) 2.5 mM y se almacenaron a -70°C. A partir de un lote de membranas, se obtienen aproximadamente 150 mg de PSB.

VIII. Geles nativos azules de poliacrilamida y segunda dimensión desnaturizante (BN-PAGE)

Las partículas sub-bacterianas (PSB) se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml en amortiguador de solubilización. Se solubilizaron con concentraciones crecientes de digitonina durante 1 hora a 4°C, se separó la fracción que no se solubilizó mediante una ultracentrifugación a 45000 rpm a 4°C durante 45 minutos en el rotor 75Ti y se carga en el gel añadiendo a la muestra 0.05µg de azul de Coomassie (SERVA) por mg de proteína solubilizada. Los geles se realizaron en gradiente de 4% a 12% de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 40V durante 18 horas, manteniendo la temperatura a 4°C, y finalmente se tiñó con una solución de azul de Coomassie.

i. 2da dimensión desnaturizante

Se analizaron las muestras mediante un BN-PAGE, pero antes de teñir con la solución de Coomassie, se cortó el carril y se incubó en SDS y DTT durante 1 hora. Posteriormente para cada una de las bandas del gel nativo que se quiera analizar se lleva a cabo un gel desnaturizante. El carril del gel nativo es cortado y colocado en posición horizontal con respecto a la parte superior del gel desnaturizante al 16% de acuerdo a la referencia (55). La electroforesis en 2D se lleva a cabo a 90V durante 2 horas. Al término de ésta, se tiñe el gel desnaturizante en solución de Coomassie.

IX. Purificación de la F₁ de *P. denitrificans* (PdF₁) mediante el método de extracción con cloroformo

Las PSB se diluyeron a 10 mg/ml en un amortiguador conteniendo glicerol 10%, sacarosa 250 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, ATP-Mg 0.1 mM, 4-Amino benzamidina (PAB) 2.5 mM pH 7.5, se extrajeron las membranas con cloroformo (59), agregando el cloroformo a una relación de 1:2. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en el rotor 75006445 (Sorvall/Heraeus) y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm en el rotor SS-34 (sorvall) durante 30 minutos 4°C, finalmente se centrifugó a 45,000 rpm durante una hora a 4°C en el rotor 50Ti. La fracción hidrosoluble, que es en donde se encuentra la PdF₁, se analizó mediante una cromatografía de afinidad (Di-Etil Amino-Hexil) con la que se purifica a la F₁ de mitocondrias de corazón de bovino (60). Para eluir a la enzima, se utilizó un gradiente de fosfato de sodio que va de 0 a 500mM pH 7.5. Las fracciones se analizaron mediante una SDS-PAGE al 16% de acuerdo al método de (55), aquellas con mayor grado de pureza se concentran y se pasan por una cromatografía de filtración en gel (Superdex 200). Las fracciones se analizan por una SDS-PAGE, las más puras se concentran y se guardan a -70°C.

X. Pruebas de unión de la subunidad ζ en la F_1 soluble de *P. denitrificans*

Se utilizó una F_1 aislada mediante el método de extracción con cloroformo y se diluyó a 10 mg/ml el amortiguador de reconstitución descrito previamente, y se añadieron concentraciones 3:1 (subunidad: F_1) en relación molar de las subunidades ϵ a una muestra y ζ a la otra muestra. Las enzimas reconstituidas fueron analizadas mediante una cromatografía de filtración en gel con la columna Superdex 200 en el sistema ÄKTA (Amersham) a un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones se concentraron, se analizaron mediante un SDS-PAGE y se midió actividad de ATPasa mediante el método de liberación de fosfato.

XI. Pruebas de oligomerización de la subunidad ζ

Se realizaron pruebas de oligomerización de la subunidad ζ (100 μ g) incubándola a diferentes valores de pH; 6.5, 7.0 y 8.0, durante 30 minutos en amortiguador de reconstitución (Tris 20 mM y sacarosa 250 mM), posteriormente se cargaron a una columna de filtración en gel Superdex 75 y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE de acuerdo a la referencia (55).

XII. Determinación de la estructura secundaria de las subunidades ζ y ϵ mediante dicroísmo circular

Las subunidades fueron diluidas a una concentración de 300 μ g/ml se analizaron en un espectropolarímetro marca Jasco modelo 7510, utilizando un amortiguador de fosfatos 20 mM a pH de 6.5 y de 8.0. Los trazos fueron colectados a 25°C en una celda de cuarzo de 0.5mm de espesor, a longitudes de onda que van de 260 nm a 200 nm, variando 0.5 nm por medición. Para la predicción de la estructura secundaria, se utilizó el programa CDNN (61), el cual se alimenta con los datos experimentales y proporciona en porcentaje la estructura secundaria predicha.

XIII. Síntesis de ATP

Se midió la síntesis de ATP mediante un sistema acoplado (31). Los sustratos son Mg^{2+} ADP 5 mM, Pi 20 mM, Glucosa 10 mM, $NADP^+$ 0.5 mM y el gradiente electroquímico de protones todo en amortiguador de Tris 20 mM. Al haber un gradiente electroquímico de protones gracias a que se añadió succinato 10 mM, previamente ajustado a pH 7.5 como sustrato de la cadena respiratoria, la ATP sintasa sintetiza ATP en presencia de Mg^{2+} ADP y Pi. El ATP sintetizado es utilizado por la HK (0.2 μ g/ml) para, a partir de glucosa, formar Glucosa 6 fosfato, el cual a su vez es tomado junto con $NADP^+$ por la G6PDH (6 U/ml) para formar 6-Fosfoglucono-lactona y NADPH como productos finales. Al medir la reacción como la aparición del NADPH con los sustratos y las enzimas acoplantes en exceso podemos inferir que la limitante es la reacción de síntesis de ATP por la ATP sintasa y así la velocidad del flujo hacia la aparición del NADPH, medida espectrofotométricamente a 340 nm, será igual a la velocidad de síntesis de ATP.

XIV. Anticuerpos policlonales anti-11 kDa

Se utilizó un conejo macho recién destetado al cual se le extrajo sangre para el suero pre-inmune y 15 días después se comenzaron los 4 ciclos de inyecciones de la proteína de 11 kDa recombinante que fueron: el primero con adyuvante completo (SIGMA), se mezcló 100 μ g de proteína de 11 kDa en 500 μ l de amortiguador PBS, ya mezclado, se agregan 500 μ l de adyuvante completo y se inyecta al conejo. Las siguientes inyecciones se hicieron con el mismo procedimiento pero con 100 μ g, 180 μ g y 150 μ g de proteína de 11 kDa por vez y con adyuvante incompleto. Las inyecciones se llevaron a cabo cada 3 semanas aproximadamente. Al final del ciclo se obtuvieron 20 ml de sangre del conejo, se separó el suero centrifugando la sangre a 3000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se hicieron alícuotas de 50 μ l, y finalmente se guardaron a -70°C. El conejo no se sacrificó.

XV. SDS-PAGE Schägger y von Jagow (55)

Esta técnica de SDS-PAGE (por su abreviatura en inglés, electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio), permite separar las proteínas con base en la carga que les confiere el SDS y de manera aproximada a su peso molecular. La resolución es mayor para proteínas de entre 50 y 5 kDa, pero menor arriba de 50 kDa.

Para preparar este tipo de geles se montan dos cristales separados entre sí con unos separadores de 1 mm de espesor procurando que, ya estando montados, no se presenten fugas al agregar alguna solución en el espacio que quedó entre ellos. Se prepara el gel separador y se vierte dentro de los cristales aproximadamente 5.3 ml e inmediatamente se agrega una capa de H₂O muy lentamente para que no se mezcle con la solución del gel, esto para asegurar una superficie horizontal del gel. El proceso de gelificado es de aproximadamente 40 minutos. Una vez polimerizado el separador, se remueve el agua y se coloca en la parte de arriba de entre los cristales un peine de 1mm de espesor con los carriles deseados. El gel concentrador se vierte entre los vidrios hasta que alcanza el borde de estos, procurando no dejar burbujas de aire.

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

-Acrilamida 30% (100 ml)

Acrilamida 30 gr.

bis acrilamida 0.8 gr.

-Amortiguador para el gel (100 ml)

Tris 36.34 gr.

HCl 8.28 ml

SDS 0.3 gr.

pH 8.25

-Amortiguador de ánodo (1 litro)

Tris/HCl 24.06 gr.

pH 8.4

-Amortiguador de cátodo (1 litro)

Tris HCl 12.11 gr.

SDS 1 gr.

Tricina 17.93 gr.

-Amortiguador para la muestra

H₂O 6.05 ml

Amortiguador de gel 1 ml

Glicerol 1.5 ml

SDS10% 1 ml

Azul de bromofenol 0.5% 0.5 ml

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

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

XVI. Inmunodetección por medio de la transferencia de la subunidad de 11 kDa a membranas de PVDF en presencia de amortiguador CAPS (39)

Después de realizar un SDS-PAGE se omite el paso de tinción y se procede a incubar al gel durante 30 minutos en el amortiguador de transferencia con agitación suave. Previamente se debió de haber cortado un trozo de membrana (PVDF) del tamaño aproximado del gel que se va a transferir, incubando este en metanol durante 5 minutos con agitación suave y posteriormente en el amortiguador CAPS 10mM pH 11.0, metanol 10% por 10 minutos.

En la rejilla de transferencia se coloca una esponja gruesa previamente empapada con el amortiguador de transferencia y encima un papel filtro del tamaño de la esponja, también mojado en el amortiguador. Sobre este papel se coloca el gel que se va a transferir y encima la membrana hacia donde se transferirán las proteínas que se encuentran en el gel, por la cara que se encuentra doblada hacia atrás, procurando que no se formen burbujas entre ellos con ayuda de un tubo de vidrio pequeño lleno del amortiguador de transferencia. Se pone otro papel filtro, otra esponja, ambos mojados y se cierra la rejilla. La rejilla se inserta en la cámara de transferencia, la cual se llena con el amortiguador de transferencia, se pone un agitador, se inserta una cámara con hielo y se corre durante 2 horas a 100mA. Todo el sistema se encuentra sobre un agitador magnético y dentro de un recipiente con hielo y agua, esto para mantener una temperatura de $\sim 4^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, usando guantes, se saca el gel que se desecha, y la membrana que se incuba en una solución leche baja en grasas PBST 5% para bloquear los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo en la membrana durante 2 horas. Después se agrega el anticuerpo anti-subunidad ζ , α ó β (estos últimos dos fueron hechos contra dichas subunidades pero de *E. coli*). Posteriormente se deja incubar durante toda la noche. Luego se lava con PBS-T 3 veces por 5 minutos y se agrega nuevamente leche al 5% con el anticuerpo secundario (anti-conejo para el anticuerpo contra la subunidad ζ y

anti-ratón contra las subunidades α y β) durante 2 horas. Después se lava una vez con PBS-T y dos veces con PBS cada una durante 5 minutos. Se elimina el exceso de PBS secando parcialmente la membrana en medio de una placa de acetato doblada por la mitad. Enseguida, sin dejar que se seque completamente la membrana, se agrega la mezcla de revelado por quimio-luminiscencia de Amersham-Biosciences (ECL Plus), y se incuba durante 5 minutos. La quimio-luminiscencia generada por la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, se revela en placas KODAK BIOMAX ML, exponiéndolas durante distintos tiempos que van desde 30 segundos hasta 10 minutos. Posteriormente, las placas se revelan gracias a un sistema KODAK de revelado. Una vez obtenidas las bandas específicas en la placa, se toma una foto digital o un barrido digital de la placa y se realiza la densitometría para conocer la densidad de cada banda, así como su peso molecular con la ayuda del programa "Alpha Digi Doc" de Alpha Inotech Corporation.

XVII. Acoplamiento de los anticuerpos policlonales anti- ζ

Se utilizaron 4 mg de suero anti- ζ por ml de esferas de agarosa. Se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, se lavaron con amortiguador de boratos 0.2 M, pH 9.0, después se agregó el entrecruzador dimetilpimelimidato hasta llegar a una concentración final de 30 mM y se agitó durante 30 minutos en agitación suave.

Para detener la reacción, se utilizó etanolamina 0.2 M pH 8.0. Finalmente se lavaron y se resuspendieron en PBS agregando azida de sodio y se empaca en una columna de 1ml.

XVIII. Desprendimiento de la subunidad de ζ de la Pdf1

500 μ g de Pdf1 se pasaron por la columna de 1ml con la resina acoplada al anticuerpo policlonal pre-equilibrada con el amortiguador en el que se encuentra la proteína (glicerol 10%, sacarosa 250 mM, tris 20 mM, 0.1 mM ATP y PAB 2.5 mM) a un flujo de aproximadamente 0.2 ml/min, se lavó con 5 ml este mismo amortiguador y se eluyó la proteína que se unió al anticuerpo con etanolamina pH 3.0. Se midió proteína de las diferentes fracciones y se analizaron mediante un SDS-PAGE. Los geles de las fracciones

se registran digitalmente y se obtiene la densitometría de las diferentes bandas mediante el programa Alpha digi Doc, comparando a la subunidad de 11 kDa con la subunidad γ para reportar esta relación y determinar si la intensidad de la banda disminuyó al pasarla por la cromatografía de afinidad.

XIX. Determinación de la actividad de ATPasa mediante el método espectrofotométrico

La determinación se llevó a cabo en un amortiguador que contenía Sacarosa 250 mM, Tris-acetato 50mM, acetato de magnesio 3 mM y acetato de potasio 10 mM pH 8.0. Los sustratos de la reacción son fosfoenolpiruvato 1 mM, Mg^{2+} ATP 3 mM y NADH 0.17 mM. El fosfoenolpiruvato (PEP), es el sustrato de la piruvato cinasa (PK) 4 U/ml, la cual produce piruvato en una reacción que libera la suficiente energía para producir ATP a partir de ADP y P_i , el piruvato es subsecuentemente utilizado por la lactato deshidrogenasa (LDH) 4 U/ml para producir lactato y oxidar al NADH convirtiéndolo en NAD^+ . Al medir la desaparición del NADH y agregando tanto a estos sustratos (PEP, NADH, ATP), como a las enzimas (PK y LDH), podemos inferir que el paso limitante de la reacción es la producción del ADP y el P_i a partir de ATP catalizado por la F_1 y así la velocidad de desaparición del NADH, medida espectrofotométricamente a 340nm, será igual que la velocidad hidrólisis de ATP mediado por la F_1 . Cabe mencionar que la actividad de ATPasa de la F_1 de *P. denitrificans* es muy baja ($2 \text{ nmol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1})$), entonces se el ensayo se realizó en presencia de un detergente que es un activador de otras ATPasas, el óxido de lauril-dimetil-amina (LDAO) (62, 63) para poder medir esta actividad con nuestra preparación.

XX. Análisis de membranas de otras α -proteobacterias en busca de la subunidad ζ

i) Aislamiento de cromatóforos de las α -proteobacterias

En colaboración con el Dr. Heliodoro Celis del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, se obtuvieron cromatóforos a partir de las especies *Rhodospirillum fulvum*,

Rhodopseudomonas palustris, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum capsulatus*, *Rhodospirillum marinarum*, *Rhodospirillum salinarum* y *Rhodobacter sphaeroides* utilizando la siguiente metodología reportada previamente (64):

Para preparar los cromatóforos, se tomaron 15 gr. de células y se diluyeron 1:10 en amortiguador A (glicil-glicina 200 mM pH 7.4). Las muestras se homogenizaron, se les agregó 5 mM de MgCl₂ y una pizca de DNAsa para posteriormente sonicar en baño de hielo en alícuotas de 15ml durante 5 minutos, 2 veces de 2.5 minutos cada una. Entre cada una se descansó un minuto, después se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos a 4°C en el rotor SS-34 (Sorvall), se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 40,000 rpm durante 4°C durante 1:20 horas en el rotor 75Ti y la pastilla se resuspendió en amortiguador B (glicil-glicina 200 mM, pH7.4, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM), se centrifugó nuevamente a 40,000 rpm durante 4°C durante 1:20 horas en el rotor 75Ti y la pastilla se resuspendió en amortiguador C (glicil-glicina 50 mM pH7.4) obteniendo aproximadamente 1 gr. de cromatóforos, los cuales se resuspenden en 2ml y se almacenan a -70°C.

Posteriormente, los cromatóforos se solubilizaron con digitonina en una relación de 2 mg de digitonina por mg de proteína de membranas, se llevó a cabo una 2D-PAGE y el gel desnaturizante se transfirió a membranas de PVDF para realizar una inmunotransferencia y probar el anticuerpo anti-11 kDa de *P. denitrificans* en cada una de estas membranas. Además también se probó un anticuerpo monoclonal anti- α de la F1 de *E. coli* con esto se ve si la subunidad de 11 kDa esta o no asociada a la enzima completa.

ii) Tinción por actividad *in gel*

Inmediatamente después de que corrió la primera dimensión nativa, el gel se incubó a 37°C con agitación constante durante aproximadamente 2 horas en un amortiguador que contiene: glicina-etanolamina 50 mM pH 8.0, acetato de plomo 0.15%, cloruro de

magnesio 5 mM, ATP 5 mM y LDAO 0.1% a 30°C en agitación constante. La actividad se detecta como un depósito blanco que es el precipitado del fosfato de plomo en el gel. Este gel ya teñido por actividad puede aun ser analizado mediante una segunda dimensión desnaturalizante.

XXI. Entrecruzamientos de la PdF₁

Se probaron tres entrecruzadores, el DTBP, el DSP y el EEDQ de una distancia de entrecruzamiento de 12 Å, 12 Å y 0 Å respectivamente en la F₁ de *P. denitrificans*. Se utilizaron condiciones de activación e inhibición ya conocidos; es decir con sulfito y con ATP, respectivamente. El medio de reacción contiene fosfatos 20 mM pH 7, se añadió el entrecruzador a las diferentes concentraciones que vienen en las figuras, el sulfito 30 mM y/o el ATP 1 mM y se arranca la reacción con 20 µg de PdF₁ incubando a temperatura ambiente y agitación suave. Después de 30 minutos se detiene la reacción con 5 mM de L-lisina y las muestras se analizan mediante un SDS-PAGE y posteriormente un Western blot revelando contra la subunidad de 11 kDa y la subunidad β.

XXII. Entrecruzamiento de las PSB

Utilizamos el entrecruzador DSP de distancia de 12Å el cual es reversible con agentes reductores tales como el DTT o el β-mercaptoetanol. Se incubaron PSB a una concentración de 10 mg/ml en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 8.0 y se agregó el entrecruzador DSP 1mM en diferentes condiciones (sulfito, ATP o ambos, succinato) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando L-Lisina 20 mM. Las PSB entrecruzadas se analizaron mediante 2D-PAGE o se procede a la purificación de PdF₁ mediante la técnica de extracción con cloroformo y su posterior cromatografía de afinidad por la resina Di-Etilaminohexil-sefarosa (DEAH).

XXIII. Geles de poliacrilamida con SDS no reductor y segunda dimensión reductora

Ambos geles se realizaron de acuerdo a la ref. (55) al 16%. Se realizó la primera dimensión de la misma forma que ya se mencionó en el apartado de electroforesis en

geles poliacrilamida en presencia de SDS, solo que al amortiguador de la muestra NO se le agregó ningún agente reductor (DTT ni β -Mercaptoetanol). Los geles de la primera dimensión fueron de 1 mm de espesor, y 10x10 cm de ancho y largo, y la electroforesis corrió a 120 V durante toda la noche. La muestra se cargó entre dos marcadores de peso molecular pre-teñidos para que al terminar la corrida, se pudiera cortar con facilidad el carril que corresponde a la muestra. El carril que se extrajo del gel es incubado en presencia del amortiguador del gel y en presencia de 5% de β -Mercaptoetanol a temperatura ambiente durante 1.5 horas, se lava con agua Milli-Q tres veces durante 5 minutos cada una y se coloca de forma horizontal en un segundo gel y se rellena con acrilamida al 4%. Se cargaron de un lado los estándares de peso molecular y del otro lado una muestra de PdF₁ para poder discernir los pesos de las diferentes subunidades. El gel toma dos caminos, uno se tiñó con colorante de Coomassie, y al no verse ningún punto, se tiñó por plata con un sistema comercial (Amersham) pero omitiendo el paso de agregar glutaraldehído para poder secuenciar mediante la técnica de espectrometría de masas en colaboración con el Doctor Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para el otro caso, se realizó una inmunotransferencia retando con el anticuerpo anti-11 kDa.

XXIV. Modelado molecular de la subunidad ϵ y de la subunidad de 11 kDa de *P. denitrificans*

Para la subunidad ϵ de *P. denitrificans* se tomó como molde a la estructura de la subunidad ϵ de *E. coli* (1AQT en el Protein Data Bank), para la subunidad de 11 kDa, se tomó como molde a la estructura de *Jannaschia sp.* CCS1 (2KZC en el Protein Data Bank <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2KZC>). Se obtuvo la secuencia primaria de las estructuras (1AQT o 2KZC) y se alineó con la secuencia de la subunidad ϵ o con la subunidad de 11 kDa de *P. denitrificans* con el programa Clustal X (en formato .pir). Para el modelado, utilizamos el programa Modeller v8.0 que se utiliza a

base de líneas de comandos. Utilizamos un archivo que es con el que se indicará al programa el modelo o modelos a realizar, se alimenta con: el nombre del alineamiento, el nombre de la estructura, el nombre de nuestra secuencia y cuántos modelos deseamos obtener. Los modelos resultantes se revisaron con el programa What_Check v5.0 y el mejor modelo se utilizó para el docking con ATP y para realizar la dinámica molecular. La imagen se realizó con el programa PYMOL (De Lano, California)

XXV. Dinámica molecular del modelo estructural de la subunidad ϵ de *P. denitrificans*

Se utilizará el mejor de los modelos de la subunidad ϵ de *P. denitrificans* generados a partir de la estructura cristalográfica de la misma subunidad pero de *E. coli* utilizando los programas VMD 1.8.0, que es el visualizador y el NAMD2, que es el que lleva a cabo la dinámica molecular. Se carga el modelo en formato .pdb al programa VMD para poder solvatar a la molécula en una caja de agua y obtener los archivos de dicha molécula solvatada. En el archivo que es utilizado para dar las indicaciones al programa se alimenta con el nombre del archivo solvatado, la temperatura a la que se desea hacer la dinámica, el tiempo que durará la dinámica, y finalmente las veces y la frecuencia con la que se desea que el programa tome una foto de la trayectoria de la dinámica. Al final, con los datos que nos arroja el programa, se puede calcular los RMSD por residuo, con lo cual podemos ver los residuos más móviles y así predecir las zonas más flexibles. Además también podemos ver las fotos de los pasos inicial y final de la trayectoria de la dinámica en forma de película.

XXVI. Remoción del extremo Carboxilo terminal de la subunidad ϵ de la Pdf₁

Las construcciones se llevaron a cabo en colaboración con el Doctor Alfredo Torres Larios del Instituto de Fisiología Celular. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la PCR:

NTEpsPden:

TAG TTC CAA TCC AAT GCT GCC GAC ACG ATG CAG TTC G

CTEpsPden Tail:

TTA TCC ACT TCC AAT G TTA ATG CGG GAA ATT CGC ATG GTT

CTEpsPden NoTail:

TTA TCC ACT TCC AAT G TTA ATC GAG CCC GAT ATG CGT GCC

La clonación es libre de ligación, de acuerdo a la referencia (65) utilizando el plásmido pMCSG7. El producto de la clonación fue introducido a células de *E. coli* cepa BL21, confiriendo resistencia a ampicilina. Las células transformadas con las diferentes construcciones se crecieron en medio 2XYT a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6UA a 600nm, después se agregó 1mM de IPTG y se incubó a 25°C durante toda la noche. Las células se cosecharon y se lisaron mediante sonicación, el lisado se pasó por una columna de afinidad a histidinas, níquel sefarosa, HisTrap FF crude (Amersham), las fracciones más puras, según un SDS-PAGE, se concentraron y se pasaron por una filtración en gel (Superdex 200), las fracciones más puras se concentraron y se guardaron a -70°C.

XXVII. Proteólisis limitada de la subunidad ζ

Con el propósito de determinar el fragmento de la subunidad ζ que inhibe la actividad de ATPasa en la PdF₁, se utilizó el acercamiento de la proteólisis limitada de la subunidad con las proteasas tripsina y quimotripsina. Se utilizaron diferentes relaciones de proteasa:subunidad ζ y diferentes tiempos de incubación. Todos los experimentos se realizaron a 25°C y deteniendo la reacción con 10 mM de PMSF (Sigma). Inmediatamente se agregó amortiguador de la muestra y se incubaron en hielo, para ser analizadas mediante un SDS-PAGE.

i. Tripsina

Para el caso de esta proteasa se tomaron 1.5 μ g de la subunidad ζ recombinante y se incubó en un amortiguador de proteólisis, K₂PO₄ 100 mM pH 4, EDTA 1 mM, se agregó

una relación de 1:8 proteasa: subunidad ζ , incubando a 25°C durante 4, 8, 12 y 20 minutos, el volumen final son 20 μ l, se detuvo la reacción con 10 mM de PMSF y se analizaron los fragmentos mediante SDS-PAGE. El tiempo que se eligió para proteolizar una cantidad mayor de subunidad de 11 kDa fue 8 minutos, después de ese tiempo, la reacción se detuvo y la muestra se inyectó a una Superdex 75 pre-equilibrada con el amortiguador de proteólisis, el producto purificado se analizó mediante WB retando contra el anticuerpo anti-11 kDa. Además se reconstituyó a PSB y se midió la actividad de ATPasa como se mencionó anteriormente.

i. Quimotripsina

Se tomaron 1.5 μ g de la subunidad ζ recombinante y se incubó en un amortiguador K₂PO₄ 100mM pH 4, EDTA 1mM y se agregó una relación 1:1 proteasa:subunidad ζ y se incubó durante 30 segundos, 1, 2.5, 5, 12 y 25 minutos a 25°C, el volumen final de las muestras fue de 20 μ l. La reacción se detuvo a los diferentes tiempos con PMSF 10 mM y se colocaron inmediatamente en hielo. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE. La condición de 12 minutos a 25°C fue utilizada para escalar la proteólisis y obtener una cantidad de proteína suficiente para hacer experimentos de reconstitución a PSB y así determinar si los fragmentos resultantes de la proteólisis inhibían o no la actividad de ATPasa de la enzima en *P. denitrificans*.

Posteriormente, para conocer su secuencia, las bandas de los geles fueron analizadas mediante espectrometría de masas por el Doctor Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina, UNAM.

XXVIII. Células de *P. denitrificans* cultivadas en condiciones de anaerobiosis

Se cultivaron células de *P. denitrificans* cepa PD1222 en medio Luria Bertani en presencia de 5 mM de nitrato de sodio (NaNO₃) previamente burbujeado con una mezcla de los gases hidrógeno: 5%, dióxido de carbono: 10% y nitrógeno: 85% durante un minuto a temperatura ambiente. El cultivo se mantuvo durante 24 horas a 30°C, se cosechó a

14,000 rpm en un rotor SS-34 a 4°C y las células completas fueron lisadas químicamente con un amortiguador en presencia de SDS, DTT, glicerol y Tris pH 8.0 a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente se analizaron mediante un SDS-PAGE, el gel fue transferido a una membrana de PVDF en amortiguador CAPS pH 11.0 y se llevó a cabo un WB con anticuerpos anti-11 kDa y anti-β. La densidad de las bandas fueron analizadas mediante el software Apha Digi doc.

XXIX. Estructura atómica de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*

En colaboración con el Doctor Kurt Wüthrich, galardonado con el premio Nobel de Química en el año de 2002, y con los miembros de su equipo, específicamente con el Dr. Pedro Serrano, se resolvió la estructura atómica de la subunidad ζ de *P. denitrificans* en su laboratorio en The Scripps Research Institute en La Jolla, California. El plásmido que sobre-expresa a la subunidad ζ de *P. denitrificans* que fue construido en nuestro laboratorio y se envió al laboratorio del Dr. Wüthrich. Ahí el Dr. Pedro Serrano, transformó células de *E. coli* cepa BL21, para sobre-expresar dicha subunidad para así poder resolver la estructura mediante resonancia magnética nuclear (NMR).

XXX. Purificación de PdF₁ con Q-sefarosa

En una estancia de 3 meses en el laboratorio del Doctor John E. Walker en el Medical Research Council de la ciudad de Cambridge en el Reino Unido, se escaló la purificación de la PdF₁ y de la PdF₁F₀ con el propósito de cristalizar a las moléculas completas y así encontrar la localización de la subunidad ζ, así como el mecanismo de inhibición por parte de esta subunidad. La estrategia que se usó fue la misma que en nuestro laboratorio, es decir las células se crecieron en medio Succinato (ver materiales y métodos) durante 18 horas a 30°C, se cosecharon, se obtuvieron vesículas invertidas y a partir de esta preparación, se purificó PdF₁ mediante el método de extracción con cloroformo (14) modificando el amortiguador A con los siguientes componentes:

-Glicerol 10%

- Sacarosa 50 mM
- Tris 20 mM
- EDTA 1 mM
- ATP 1 mM
- Benzamidina 5 mM
- PMSF 1 mM

Para separar los componentes de esta preparación, se utilizó la resina Q HP en columnas individuales de 1ml (GE Healthcare, Suecia) para atrapar a la PdF₁. Para eluirlo se utilizó un gradiente discontinuo de fosfato de potasio de 0-25 mM, a las fracciones resultantes se les midió actividad de ATPasa y las que presentaran dicha actividad se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que mostraron mayor pureza se concentraron en una membrana de poro de 100 kDa y se analizaron mediante una cromatografía de filtración molecular en una columna Superdex 200 a un flujo de 0.5 ml/min. A las fracciones obtenidas se les midió actividad de ATPasa y posteriormente se analizaron mediante un SDS-PAGE. Las fracciones con mayor pureza se concentraron en una membrana con poro de 100 kDa.

XXXI. Purificación de PdF₁F₀ con Q-sefarosa

Para la purificación de la PdF₁F₀, se obtuvieron PSBs y estas se solubilizaron con Dodecil Sulfato de Sodio (DDM) a una relación de 2 mg de DDM por mg de PSBs durante 1 hora a 4°C. Se ultracentrifugó a 65,000 rpm en un rotor 75Ti durante 30 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se unió a una columna de 10 ml con resina Q HP (GE Healthcare, Suecia) previamente equilibrada con el amortiguador que se utilizó para la PdF₁, agregando 1 mM DDM. Se eluyó con un gradiente continuo de fosfato de sodio 0-1M. Las fracciones con actividad se analizaron mediante SDS-PAGE, se desalaron mediante una membrana de 100 kDa y se unieron de nuevo a la misma columna. Este proceso removió el 50% de las bandas contaminantes observadas. Las fracciones de un

gradiente discontinuo de 0-500 mM que presentaron actividad fueron también analizadas mediante un SDS-PAGE, las que se mostraban más puras se concentraron en una membrana de 100 kDa y se analizaron mediante una columna de filtración en gel, la TOSOH G4000 a 0.5 ml/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Amplificación, clonación y sobre-expresión de la subunidad de ζ y de la subunidad ϵ

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar a la subunidad de 11 kDa, a la que en adelante denominaremos subunidad ζ (14) debido a que su movilidad electroforética es mayor que la de la subunidad ϵ , utilizando como molde al ADN genómico de la cepa PD1222 de *P. denitrificans*. Después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo una banda de 380 pb (Figura 4A), correspondiente al tamaño para el gen que codifica para dicha subunidad. El gen se clonó en el plásmido pT77, flanqueado por los sitios para las enzimas de restricción NdeI y HindIII en el extremo 3' y 5' respectivamente (Figura 4B) y se ligó mediante la enzima T4 ligasa al vector. Se transformaron células de la cepa DH5- α de *E. coli*, para seleccionar las clonas que tuvieran el plásmido con el inserto, se realizó la técnica de MiniPrep (Promega) para extraer al plásmido de las células; posteriormente éste se digirió con las enzimas mencionadas para liberar al inserto. Se corroboró en un gel de agarosa que el patrón de bandas resolviera las bandas correspondientes al plásmido pT7-7 y a la del gen de la subunidad ζ . Posteriormente con el plásmido que resultó positivo en el análisis del gel de agarosa, se transformaron células de *E. coli* cepa BL21 que tenían ya un plásmido que codifica para la proteína lizosima y al inducirlas, la expresan, ayudando así al proceso de lisis de la pared celular. Para el caso de la subunidad ϵ se realizó el mismo protocolo, solo que la banda esperada es de un tamaño de 447pb (Figura 4C), también flanqueado por los sitios de restricción para las enzimas NdeI (5') y HindIII (3') (Figura 4D).

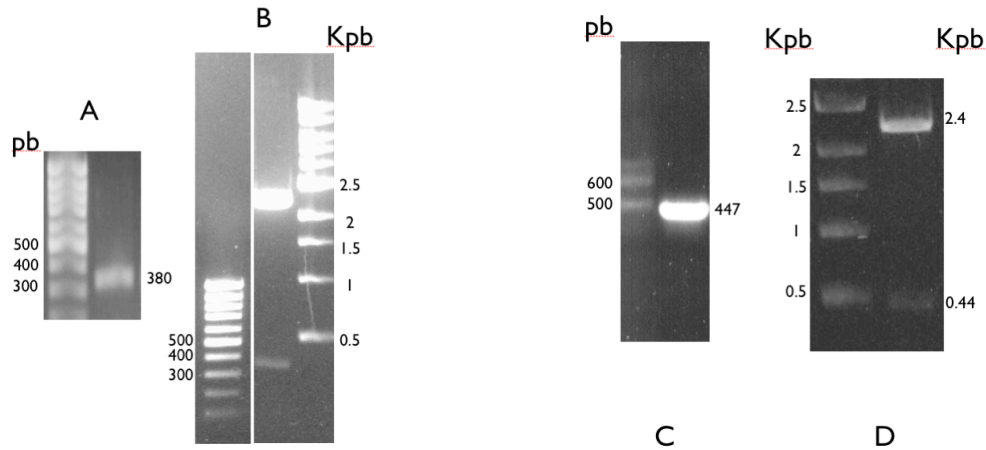


Figura 4. Amplificación y ligación de los genes de las subunidades ζ y ϵ en geles de agarosa al 1%. (A) Producto de amplificación del gen de la subunidad ζ , el cual pesa 380 pares de bases (pb) indicado del lado derecho, en el lado izquierdo se encuentran los estándares de tamaño molecular. (B) Producto de la digestión con las enzimas de restricción NdeI y HindIII del producto de ligación del gen de la subunidad ζ y el plásmido pT77, del lado izquierdo están los tamaños moleculares de intervalo de 100 pb y del lado derecho del intervalo de 1000 pb (1Kb). (C) Producto de amplificación del gen de la subunidad ϵ , de un tamaño de 447 pares de bases (pb) indicado del lado derecho, en el lado izquierdo se encuentran los estándares de tamaño molecular. (D) Producto de la digestión con las enzimas de restricción NdeI y HindIII del producto de ligación del gen de la subunidad ϵ y el plásmido pT77, del lado izquierdo están los tamaños moleculares del intervalo de 1Kb.

II. Purificación de las subunidades ζ Y ϵ

Se obtuvieron en promedio 8 mg de subunidad ζ recombinante por litro de cultivo. De la subunidad ϵ se obtuvieron 1.5 mg de la subunidad recombinante por litro de cultivo. Ambas subunidades se obtuvieron con un 95% de pureza (Figura 5) y fueron almacenadas a -20°C en el amortiguador de fosfato 20 mM pH 7, EDTA 1 mM, PMSF 0.07% para posteriormente utilizarla para experimentos de reconstitución, unión, dicroísmo circular o fluorescencia.

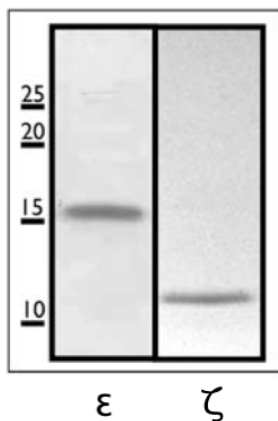


Figura 5. SDS-PAGE 16% de acrilamida que resuelve a las subunidades ζ (derecha) y ϵ (izquierda) recombinantes purificadas. Ambas subunidades fueron purificadas hasta alcanzar un 95% de pureza.

III. Reconstitución de las subunidades ζ y ϵ

Para determinar el papel de dichas proteínas en la actividad de la F_1F_0 -ATPasa se reconstituyeron en ambos sistemas, ya sea añadiendo a las subunidades por separado o previamente mezcladas, calculando una relación molar de 10 veces las subunidades ζ y ϵ por 1 de la F_1 en las PSB. Posteriormente a la reconstitución de la(s) subunidad(es) se midió la actividad de ATPasa mediante el método de liberación de fosfato. Pudimos observar que la actividad de ATPasa por las PSB se inhibe al agregar a la subunidad ζ , no así al agregar a la subunidad ϵ (Figura 6). Así calculamos una IC_{50} para el caso de la subunidad ζ tanto en las PSB como en la F_1 (Figura 7). La IC_{50} de la subunidad con respecto a las PSB es de $1.23 \mu\text{M}$ (Figura 7 A), para el caso de la F_1 aislada, la IC_{50} disminuye aproximadamente a $0.05 \mu\text{M}$ (Figura 7 B). Tanto las actividades de ATPasa, como los valores de IC_{50} se resumen como sigue: Velocidad máxima PSBs: $0.4 \mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1})$, PdF₁ $26 \mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1})$. IC_{50} PSB $0.44 \mu\text{M}$ y PdF₁ $0.05 \mu\text{M}$.

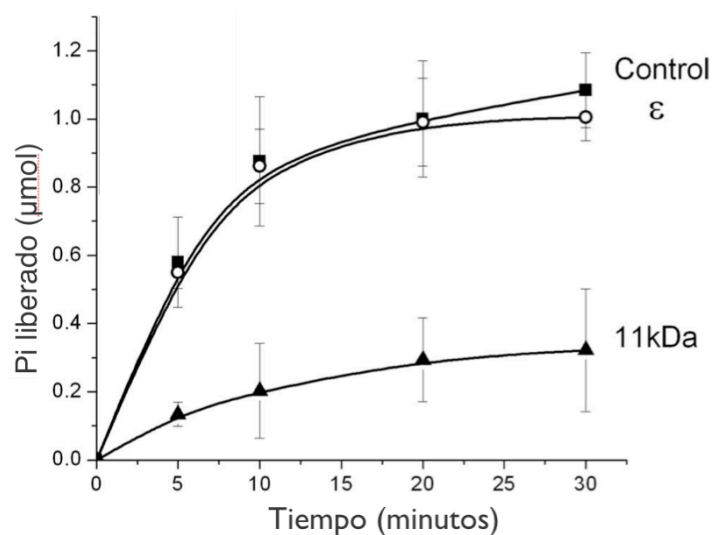


Figura 6. Efecto de las subunidades ζ y ϵ en la actividad de la F_1F_0 -ATPasa en $50 \mu\text{g}$ de PSB's de *P. denitrificans* expresada como μmoles de fosfato liberados (cuadros cerrados), $20 \mu\text{g}$ de la subunidad ζ (triángulos cerrados) o $40 \mu\text{g}$ de la subunidad ϵ (círculos abiertos). Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes. Si las subunidades ζ y ϵ son reconstituidas simultáneamente, la curva se sobrepone a la curva que tiene la reconstitución de la subunidad ζ sola.

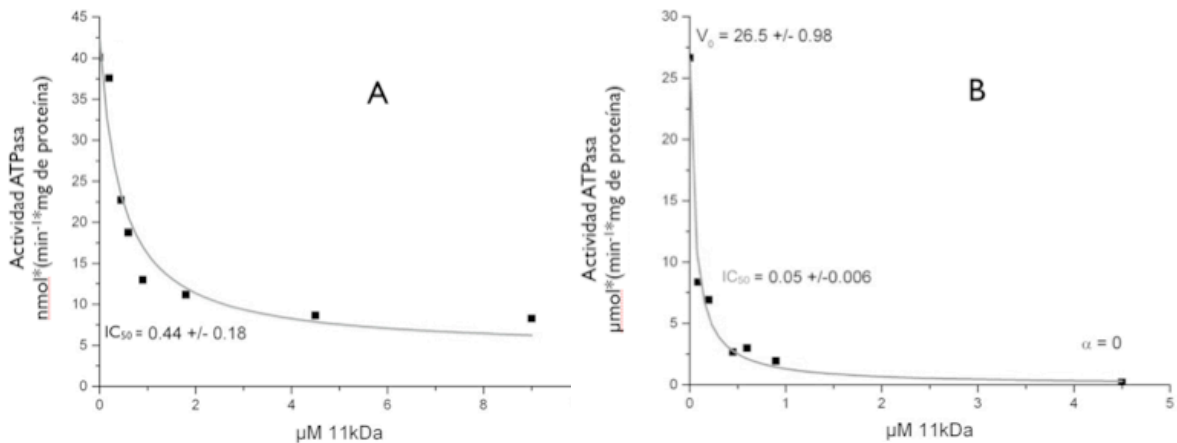


Figura 7. Titulación de la subunidad ζ en las PSB (A) y en la PdF₁. Las IC₅₀ se señalan como 0.44 μ M para el caso de las PSBs, y como 0.05 μ M en la PdF₁.

IV. Pruebas de unión entre la subunidad ζ y la subunidad ϵ recombinantes a la PdF₁

Un problema con el que nos hemos encontrado al purificar a la PdF₁ es que en algunas ocasiones, la fracción resultante muestra una estequiometría $\epsilon:F_1$ variable (Figura 8). Muchas veces, la cantidad de subunidad ϵ es directamente proporcional a la concentración de proteína a la que se inicia la purificación del subcomplejo, como apreciamos en la figura 8, en donde vemos que en el carril que se encuentra a la izquierda de las subunidades marcadas, se obtiene una cantidad menor de subunidad ϵ que en el carril derecho. El carril izquierdo fue purificado a partir de unas membranas a una concentración de 10 mg/ml, en cambio en carril derecho fue purificado a partir de unas membranas a una concentración de 40 mg/ml. Se ha descrito que la subunidad ϵ de la F₁ de *E. coli* es sensible a la dilución (66), entonces proponemos que al igual que sucede en *E. coli*, la subunidad ϵ de *P. denitrificans* se desprende de la F₁ al encontrarse en diluida.

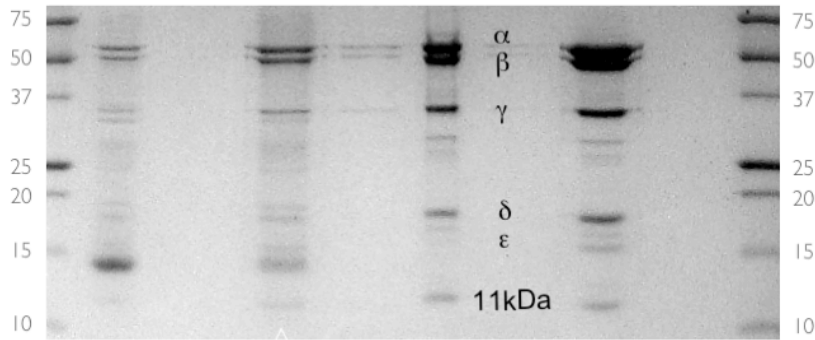


Figura 8. Purificación de la PdF₁. SDS-PAGE al 16% de acrilamida en el que se analizan los diferentes pasos de la purificación, en el primer carril se cargaron los estándares de tamaño molecular, el siguiente carril, es el extracto obtenido con cloroformo. En el siguiente carril se analiza la muestra que salió de la columna DEAE y entra a la Superdex 200. El carril siguiente es la PdF₁ purificada a partir de membranas a 10 mg/ml. El siguiente carril, es una PdF₁ purificada a una mayor concentración de PSB's (40 mg/ml). El último carril son los estándares de peso molecular.

En consecuencia, evaluamos el efecto funcional de las subunidades ϵ y ζ recombinantes utilizando una PdF₁ con una menor cantidad de subunidad ϵ , reconstituimos a ambas subunidades, ϵ y ζ y posteriormente analizamos la muestra mediante una filtración en gel (Figura 9) y se midió la actividad de las diferentes muestras.

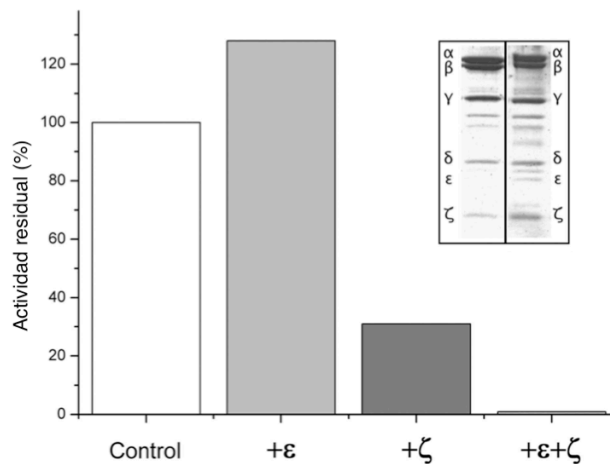


Figura 9. Reconstitución de las subunidades ζ y ϵ recombinantes a la PdF₁ purificada, filtración en gel y efecto en la actividad de ATPasa. La PdF₁ fue preincubada durante 30 minutos en amortiguador de reconstitución (Control y carril 1 del inserto), o con un exceso de subunidad ζ y/o subunidad ϵ . Después de la incubación se tomó una alícuota y se midió actividad de ATPasa. La gráfica es el resultado de un promedio de dos experimentos independientes. El 100% de actividad representa a $20.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1})$. Inset: Se pre-incubó a una PdF₁ con las subunidades ζ y ϵ (carril derecho), o con amortiguador de reconstitución (carril izquierdo) posteriormente se pasaron, por separado, por una filtración en gel y se cargaron al gel.

En la figura 9 observamos, en el inserto, un SDS-PAGE con las muestras antes (izquierda) y después de la reconstitución (derecha) con las subunidades ϵ y ζ , en este carril, vemos que las subunidades ϵ y ζ se enriquecieron en comparación con el carril de la izquierda. Las actividades las observamos en la gráfica, donde vemos que la muestra con la reconstitución de la subunidad ϵ en la PdF₁ tiene una mayor actividad que la muestra control, sin embargo la reconstitución con la subunidad ζ inhibe cerca de un 80% la actividad de la PdF₁-ATPasa, sin embargo al reconstituir a las dos subunidades simultáneamente (ϵ y ζ) la actividad de la PdF₁-ATPasa se inhibe prácticamente 100%. Este dato sugiere que la subunidad ϵ debe estar presente para que la PdF₁-ATPasa funcione correctamente, tanto para su actividad como ATPasa, como para su inhibición, mediada por la subunidad ζ .

V. Anticuerpos policlonales anti subunidad ζ

Para probar el título de los anticuerpos policlonales sintetizados por el conejo, se corrieron SDS-PAGE con diferentes cantidades de la subunidad ζ , de F₁ aislada y de PSBs en cada carril, los cuales fueron transferidos a membranas de PVDF y posteriormente se realizó Western blot agregando el suero del conejo en el cual se sintetizaron los anticuerpos contra la subunidad ζ (Figura 10). Sobresale que los anticuerpos policlonales logran detectar hasta 1 ng de la subunidad ζ recombinante, 10 ng en la F₁ y 1 μ g en las PSBs.

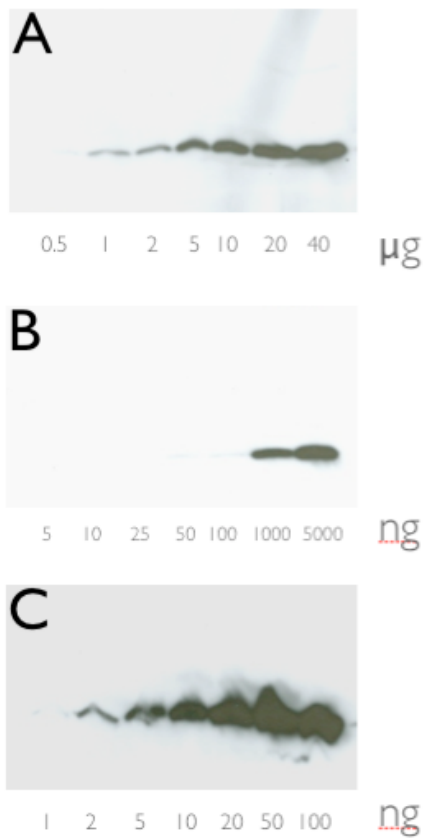


Figura 10. Curvas de titulación del anticuerpo anti- ζ Western blot de membranas de PVDF a las que se le transfirieron SDS-PAGE al 16% de acrilamida de acuerdo al método de von Jagow. se incubaron con el anticuerpo anti ζ y las muestras son de diferentes cantidades de partículas sub-bacterianas (A), PdF₁ (B) y subunidad ζ recombinante (C).

VI. Desprendimiento de la subunidad ζ de la PdF₁

Utilizando el anticuerpo Anti- ζ acoplado a proteína G, a su vez acoplada a una resina, se desprendió a la subunidad ζ por cromatografía de inmuno-afinidad (Figura 11) y posteriormente se analizaron las muestras mediante un SDS-PAGE.

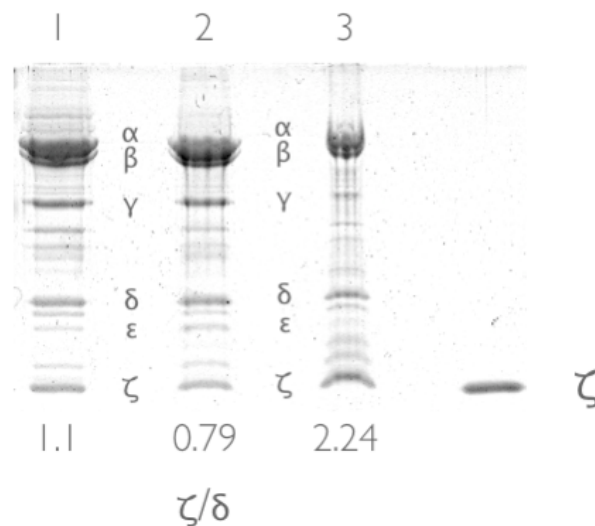


Figura 11. Desprendimiento de la subunidad ζ mediante una columna con una resina acoplada al anticuerpo anti subunidad ζ . 1.- Material que entró a la columna; 2.- Muestra que no se unió a la columna; 3.- Muestra que se unió a la columna y se eluyó a pH 3.0; 4.- Subunidad ζ recombinante. La relación entre la subunidad de ζ y la subunidad γ fue realizada mediante densitometría de las bandas. Del lado derecho de cada carril se encuentran las diferentes subunidades de la PdF₁ y en la parte inferior de cada carril está la determinación del cociente entre las subunidades ζ y γ .

En la figura 11 tenemos el SDS-PAGE de las muestras control (1) con una relación ζ/δ de 1.1, la muestra que se pasó por la columna con resina acoplada al anticuerpo anti- ζ (2) con una relación ζ/δ de 0.79; es decir 10% menos con respecto al control. Finalmente la muestra que fue despegada de la resina (3) con una relación ζ/δ de 2.24. Se midió actividad de ATPasa para cada una de las muestras (Figura 12).

En los anteriores experimentos, la actividad de ATPasa se medía con el método de liberación de fosfato, ya que la actividad de ATPasa de *P. denitrificans* se debe activar con el oxianión sulfito 60mM para lograr registrarla, pero el sulfito a altas concentraciones (mayores a 10mM), inhibe a las enzimas del sistema acoplado. Por lo tanto sustituimos al sulfito con otro activador, el detergente LDAO a una concentración de 0.15% para lograr activar a la F₁-ATPasa.

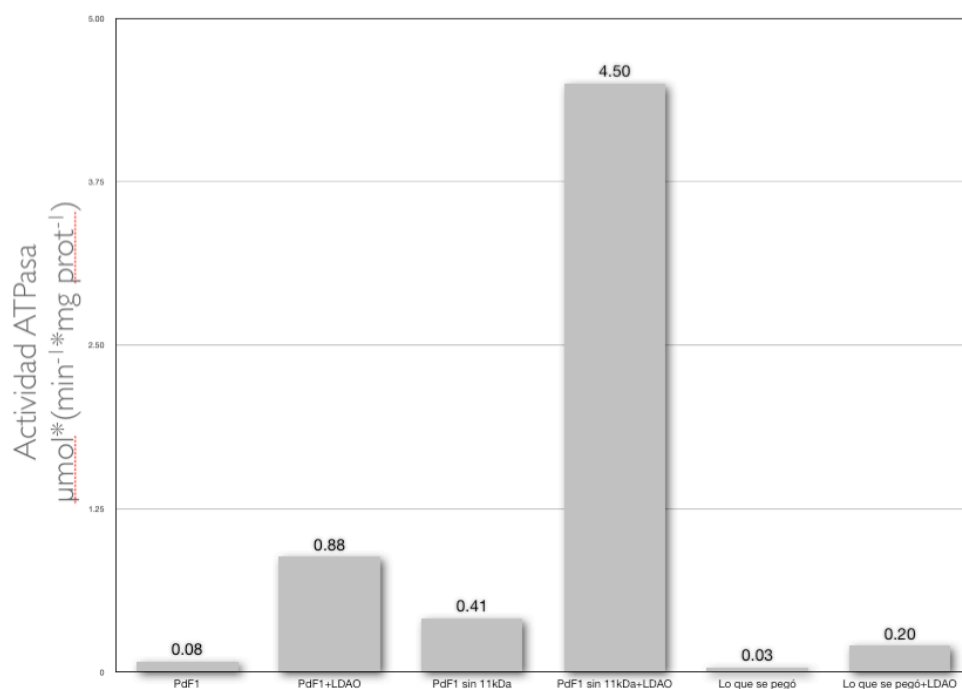


Figura 12. Activación de las muestras a las cuales se les desprendió parcialmente a la subunidad ζ . La PdF₁ que no pasó por la columna acoplada al anticuerpo anti- ζ se le incubó 30 minutos en amortiguador de reconstitución (PdF₁), o con LDAO (PdF₁+LDAO), o PdF₁ que se pasó por la columna acoplada al anticuerpo anti- ζ (PdF₁ sin 11 kDa), o PdF₁ que pasó por la columna acoplada al anticuerpo y LDAO (PdF₁ sin 11 kDa+LDAO), o lo que se unió a la columna y fue eluido con pH 3.0 (Lo que se unió), o esta misma muestra pero añadiendo LDAO (Lo que se unió +LDAO). Posteriormente se midió la actividad de ATPasa mediante el método acoplado (ver materiales y métodos), expresada en $\mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1})$. Sobre cada barra se encuentra su actividad específica.

La PdF₁-ATPasa es activada con 0.15% de LDAO (Figura 12 PdF₁+LDAO) cerca de diez veces, al remover parcialmente a la subunidad ζ , como lo vemos en la figura 12, se activa 5 veces con respecto al control, con o sin LDAO. La actividad de la muestra con la subunidad ζ parcialmente desprendida, sin LDAO también se ve activada 10 veces al agregar LDAO. Finalmente las muestras que se unieron a la columna y posteriormente se eluyeron a pH de 3.0, mostraron muy poca actividad debido, posiblemente a una desnaturalización de la PdF₁ al estar expuesta a pH's bajos.

VII. Identificación de la subunidad ζ en otras α -proteobacterias.

Los cromatóforos preparados a partir de las especies *R. fulvum*, *R. palustris*, *R. rubrum*, *R. capsulatus*, *R. marinarum*, *R. salinarum* y *R. sphaeroides*, se solubilizaron con digitonina en una relación de 2 mg de detergente por mg de proteína de membranas. Se llevó a cabo una 2D-PAGE y el gel desnaturalizante se tiñó con azul de Coomassie o se analizó mediante Western blot, utilizando el anticuerpo anti- ζ y un anticuerpo monoclonal anti subunidad α , esto con el propósito de observar que la subunidad fuera parte de la ATP sintasa. La única especie que dió positivo para el anticuerpo anti ζ en el análisis de sus cromatóforos fue *R. sphaeroides* (Figura 13). Las probables razones por las cuales no se detectó a la subunidad ζ con nuestro anticuerpo en los cromatóforos de las demás especies son: 1) la subunidad ζ está presente pero la secuencia de los epítopes de los anticuerpos policlonales que produjimos probablemente sea diferente; 2) la subunidad ζ si se encuentra en la bacteria pero no está adosada a la ATP sintasa; y 3) al momento de preparar los cromatóforos, la subunidad ζ se haya desprendido hacia el sobrenadante y se haya perdido en los lavados, evitando así su detección. Aunque la única especie en la

que observamos una proteína del peso de la subunidad ζ , fue *R. sphaeroides*, mostrando que esta bacteria posee una subunidad del mismo peso que la subunidad ζ de *P. denitrificans* y que además se encuentra unida a su ATP sintasa. Dada la presencia del gen de la subunidad ζ en todas las α -proteobacterias, es probable que esta subunidad se localice unida a la ATP sintasa de estas bacterias ejerciendo un efecto inhibitorio.

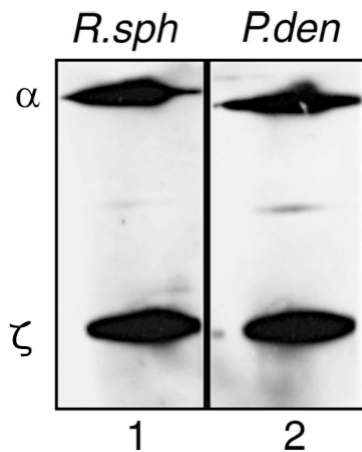


Figura 13. La subunidad ζ se encuentra unida a la ATP sintasa en cromatóforos de *R. sphaeroides*. Western blot de muestras de (1) cromatóforos de *R. sphaeroides* y (2) membranas de *P. denitrificans*. Después de correr una electroforesis en doble dimensión nativa-desnaturalizante (2D-PAGE) (ver materiales y métodos), la membrana de PVDF fue incubada con los anticuerpos anti subunidad ζ y α . y revelados por WB y quimioluminiscencia.

El anticuerpo anti- ζ de *P. denitrificans* reconoce a esta misma subunidad en *R. sphaeroides*, por lo tanto se reconstituyó a la subunidad ζ de *P. denitrificans* en cromatóforos de *R. sphaeroides* y se observó una inhibición del 30%. En una alineación de estructuras primarias de las subunidades ζ de *P. denitrificans* y *R. sphaeroides* observamos que son idénticas un 65%, las diferencias entre estas dos especies son las responsables de que la subunidad ζ de *P. denitrificans* no inhiba la actividad de F₁-ATPasa de *R. sphaeroides*, ya sea por que no se una a la enzima o por que la estructura terciaria entre las subunidades no permitan la inhibición total inter-especie.

VIII. Entrecruzamientos

Para analizar los productos de entrecruzamiento de la subunidad ζ con subunidades cercanas con EEDQ o DSP (de distancia de 0 y 12Å respectivamente) en membranas o en la F₁ en presencia/ausencia de sulfito, ATP o succinato, utilizamos el acercamiento de geles de poliacrilamida en segunda dimensión y posteriormente se transfirieron a

membranas de PVDF y se retaron contra las subunidades β y ζ (Figura 14). En el panel A, tenemos el Western blot contra la subunidad ζ , el color negro de la imagen se sustituyó por azul. En el panel B, el Western blot contra la subunidad β , el color negro original de las placas de revelado fue sustituido por color rojo. Las sustituciones de color fueron realizadas para poder obtener la figura del panel C, en la que se tiene una sobreposición de las figuras de los paneles A y B para poder comparar los pesos moleculares de las bandas. Son cuatro condiciones, la control, agregando ATP, agregando sulfito, o ambos. Para cada condición se utilizaron tres concentraciones 1 μ M, 50 μ M y 1 mM, en la condición control y en la que se agrega ATP en 50 μ M y 1 mM observamos que la banda azul de 11 kDa (subunidad ζ) desaparece, pero aparece en un peso aproximado de 65-70 kDa y al hacer la sobre posición se ve que la banda roja (subunidad β) en las mismas condiciones incrementa su peso aproximadamente 10-15 kDa. Esto no se repite al agregar sulfito ni cuando se agrega a la misma reacción sulfito y ATP, estos resultados indican que la subunidad ζ se mueve de su sitio inhibitorio en las condiciones que se presentan al agregar sulfito, es decir, condiciones de activación de la actividad de ATPasa. En este caso, en el que no se aprecia producto de entrecruzamiento de la subunidad ζ , ni se observa que se remueva de la F_1 (no mostrado), se cree que se esta moviendo hacia otra(s) subunidad(es), pero la distancia de los entrecruzadores no es la adecuada para mantener dicha unión, así que se decidió probar con PSB, y utilizar solamente el DSP, el cual es de distancia de 12Å y además es reversible con agentes reductores, tales como el DTT y el β -mercaptoetanol. Gracias a la reversibilidad del reactivo, se realizó un SDS-PAGE en donde se analizan muestras entrecruzadas con DSP, en presencia/ausencia de sulfito, ATP, succinato incubadas o no con los agentes reductores. Como podemos observar en la figura 15 se presentan bandas de entrecruzamiento de 23 y 36 kDa, las cuales son reversibles agregando 25 mM DTT y 15% β -mercaptoetanol.

Para resolver la identidad de estos entrecruzamientos se entrecruzó con DSP a las PSB, después se extrajo con cloroformo a la PdF₁ para purificarla mediante una resina DEAH. A esta muestra se le realizó un 2D-PAGE, una primera dimensión no-reductora y el carril de la muestra a analizar se cortó y se incubó en DTT y β-mercaptoetanol y se analizó en SDS-PAGE de segunda dimensión, tiñendo con plata.

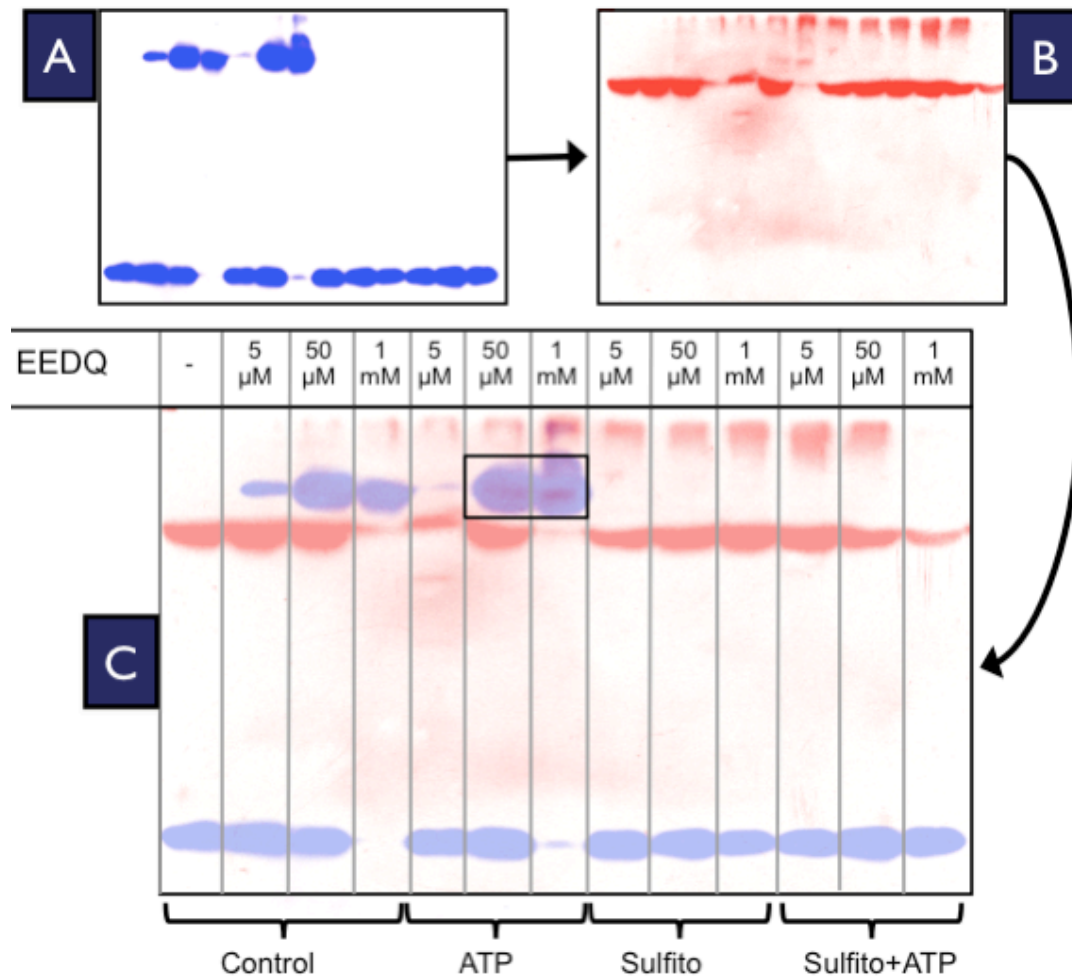
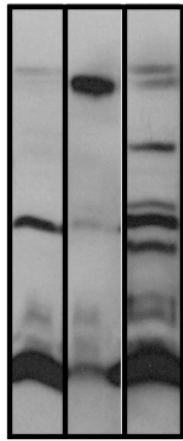


Figura 14. Entrecruzamientos con la subunidad ζ en la PdF₁. Western blot de PdF₁ entrecruzada con EEDQ y detectado con las subunidades ζ (A) ó β (B). Para cambiar de anticuerpo, la membrana fue sometida al método de remoción de anticuerpos (ver materiales y métodos) para limpiarla del primer anticuerpo. El color original fue reemplazado digitalmente por color azul o rojo, (A) ó (B) respectivamente, para poder superponerlas (C). Las concentraciones de EEDQ que se utilizaron son 0, 5, 50 μM y 1 mM para cada caso. Control, ATP (5 mM de ATP), sulfito (30 mM de sulfito) y sulfito+ATP (30 mM y 5 mM de sulfito y ATP respectivamente). El cuadro negro muestra al entrecruzamiento de las subunidades ζ y β.



- + + DSP
 - - + Sulfito

Figura 15. Entrecruzamientos con la subunidad ζ en PSB. Las PSB fueron incubadas en amortiguador de entrecruzamiento durante 30 minutos (ver materiales y métodos) ó en presencia del entrecruzador DSP 1mM y/o de sulfito 30mM y posteriormente se analizaron mediante un SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana de PVDF y se realizó el Western blot en presencia del anticuerpo anti- ζ .

En la figura 16, podemos ver en diagonal a la Pdf₁, y como producto de la reducción con DTT y β -Mercaptoetanol, unos puntos que coinciden en peso molecular, utilizando como referencia únicamente el peso molecular de los productos, los puntos marcados representarían un entrecruzamiento de la subunidad ζ con la subunidad ϵ , pero de bajo rendimiento de entrecruzamiento.

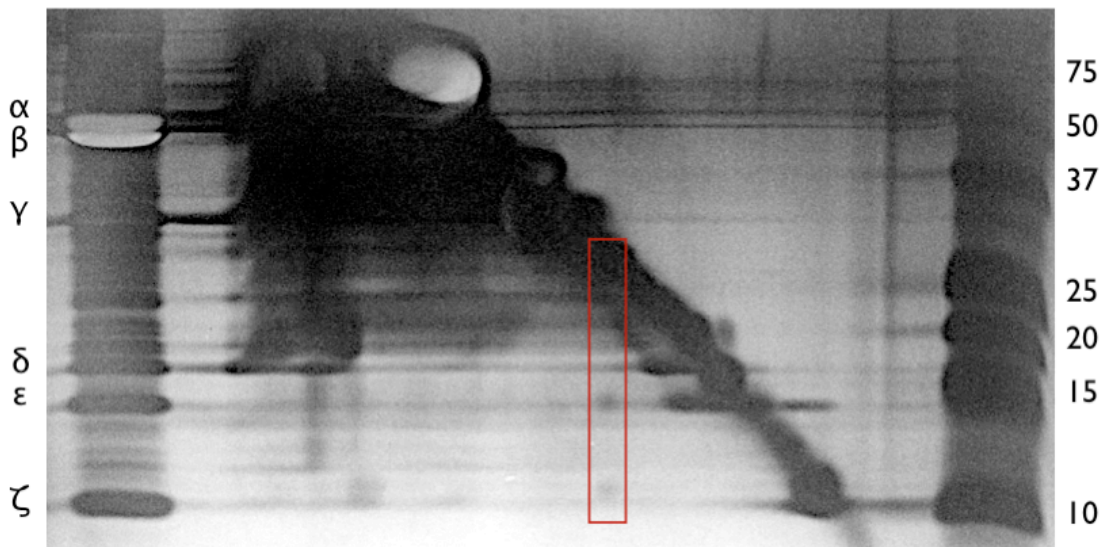


Figura 16. Entrecruzamiento entre las subunidades ζ y ϵ en las PSB. PSB fueron entrecruzadas con DSP durante 1 hora a 25°C, posteriormente se extrajo la Pdf₁ con cloroformo. La fracción hidrosoluble se pasó por una DEAE y finalmente se analizó mediante un SDS-PAGE en condiciones no-reductoras (sin DTT ni β -mercaptoetanol). El carril que se utilizó para analizar la muestra se corta y se incuba en presencia de DTT y β -mercaptoetanol durante 1 hora, se coloca de forma horizontal en un SDS-PAGE y se analiza. El rectángulo rojo señala los productos que se entrecruzaron en la primera dimensión y se redujeron en la segunda dimensión, subunidades ζ y ϵ . El gel fue teñido con plata.

Es decir que en condiciones de activación de la PdF₁, la subunidad ζ , se entrecruza con baja eficiencia con la subunidad ϵ .

IX. Oligomerización de la subunidad ζ de *P. denitrificans*

Uno de los acercamientos que utilizamos para determinar la estructura terciaria de la subunidad ζ fue analizarla mediante una filtración molecular en una columna Superdex 200 en el HPLC. Las pruebas de oligomerización se llevaron a cabo a tres diferentes pH 6.0, 7.5 y 8.0 (Figura17), ya que hemos observado que a pH de 8.0, la subunidad presenta su mayor capacidad inhibitoria.

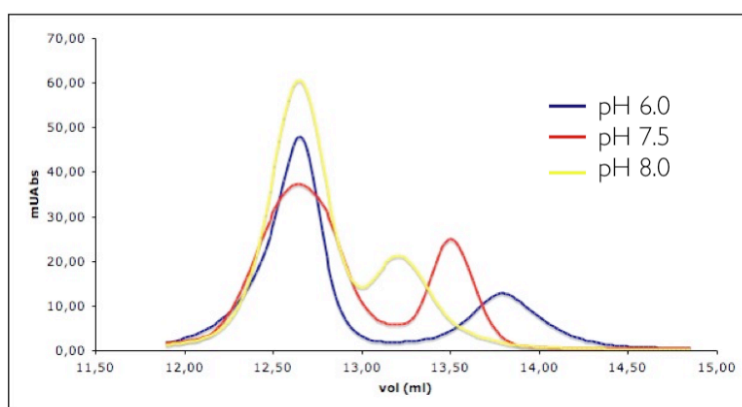


Figura 17. Posible oligomerización de la subunidad ζ dependiente del pH al que se encuentre. Absorbancia a 280nm expresada en mili Unidades de absorbancia (mUA) de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel de la reconstitución de las subunidades de ζ y ϵ . Gráfica de las fracciones colectadas a pH de 6. (azul), cromatograma de las fracciones colectadas a pH de 7.5 (rojo) y, gráfica de las fracciones colectada a pH de 8 (amarillo).

Como observamos en la figura 17, hay un pico que se encuentra en todos los diferentes pHs, correspondiente a un confórmero con un radio de giro mayor, que se encuentra a un volumen de retención de aproximadamente 12.63 ml, este confórmero no es dependiente del pH al que se encuentre la proteína, sin embargo hay un confórmero que cambia, si la proteína se encuentra a pH 8 el volumen de retención es de 13.14 ml; si el pH es 7.5, el volumen de retención es de 13.51 ml; y si la proteína se encuentra a pH 6.0, el volumen cambia a 13.82 ml. Las fracciones, provenientes de esta filtración en gel, fueron analizadas mediante un SDS-PAGE y ambos picos en todos los pHs resultaron ser

subunidad ζ . Entonces proponemos que cuando la subunidad ζ se encuentra en el conformero de mayor peso molecular, que puede ser debido a una oligomerización o a un estado más desplegado en comparación con los conformeros resultantes a otros pHs, resulta un mejor inhibidor.

X. Determinación de la estructura secundaria de las subunidades ζ y ϵ mediante dicroísmo circular

El siguiente acercamiento que utilizamos, fue el de resolver la estructura secundaria de la subunidad ζ a pH 6.0 y 8.0 para ver si la estructura secundaria cambia y así lograr identificar si las diferencias que observamos en la filtración en gel son ocasionadas por cambios en la estructura secundaria. Como observamos en la figura 18, la gráfica del dicroísmo circular a pH de 6.0 se superpone perfectamente con la gráfica a pH 8.0, así que la diferencia observada en la filtración el gel no es ocasionada por cambios en la estructura secundaria de la proteína.

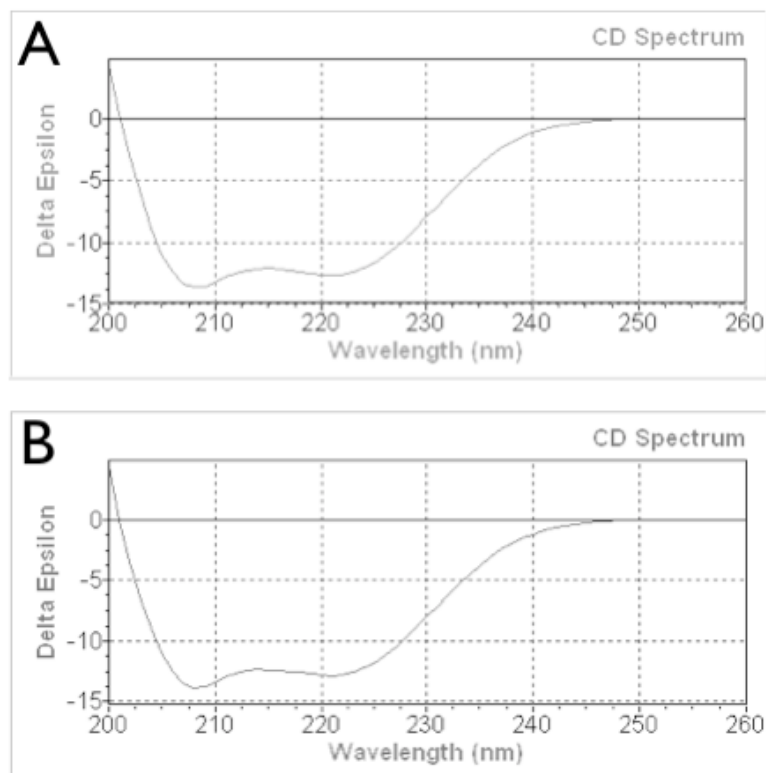


Figura 18. Dicroísmo Circular de la subunidad ζ a pH 6 (A) y pH 8 (B). La concentración de proteína fue de 0.3 mg/ml y el experimento se llevó a cabo a 25°C. Delta Epsilon significa elipticidad molar obtenida por el programa CDNN. La predicción que nos arroja es: un 98.2% de alfa hélice y un 1.5% de secuencia no estructurada en ambos casos.

La subunidad ε fue analizada mediante dicroísmo circular y se obtuvo que su estructura secundaria es: Hélice 33.4%, Beta plegada: 16.8% y secuencia no estructurada: 33.8% (Figura 19).

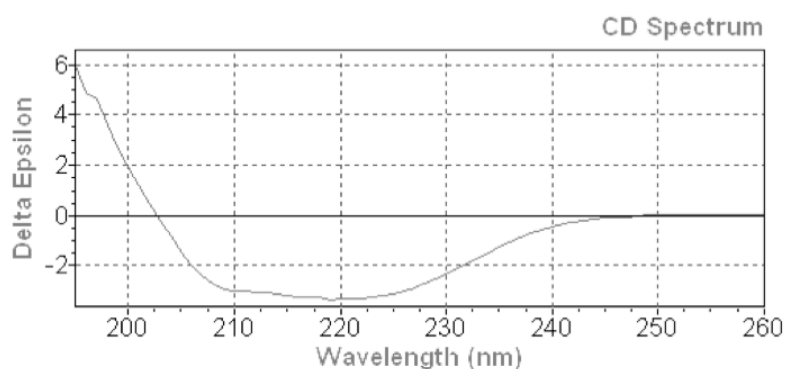


Figura 19. Dicroísmo circular de la subunidad ε recombinante de *P. denitrificans*. Se llevó a cabo a 25°C a una concentración de 0.3 mg/ml de proteína. La predicción de la estructura se llevó a cabo con el software CDNN y el cual indica que la proteína tiene un 33.4% de α -hélice, un 8.2% antiparalela, un 8.6% paralela, 16.8% de vuelta beta y un 33.8% de estructura al azar.

XI. Modelado estructural de la subunidad ε de *P. denitrificans*

Como vimos en la figura 6, la subunidad ε no inhibe la actividad de la PdF₁-ATPasa, uno de los acercamientos que utilizamos para saber el posible motivo de la no-inhibición de dicha subunidad fue llevando a cabo alineaciones de secuencias de subunidades ε de muchas bacterias, hemos observado que la estructura primaria de la subunidad ε de *P. denitrificans* posee 9 aminoácidos extra en el carboxilo terminal, por lo tanto, resultaba posible que este fragmento extra fuera el responsable de la no-inhibición de la PdF₁-ATPasa mediada por la subunidad ε . Entonces realizamos un modelo estructural de dicha subunidad de *P. denitrificans* utilizando como molde a la subunidad ε de *E. coli* (Figura 20A).

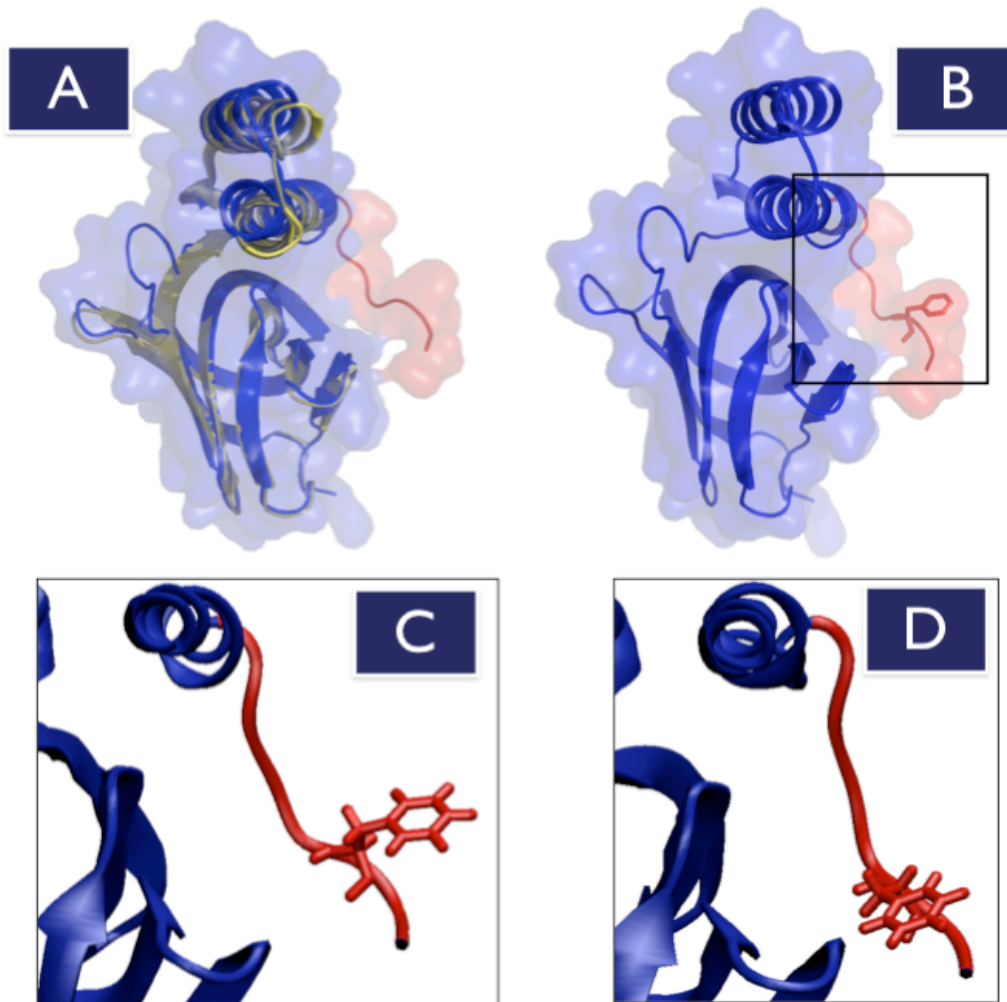


Figura 20. Dinámica molecular de la subunidad ϵ de *P. denitrificans*. A partir de un modelo estructural de la subunidad ϵ de *P. denitrificans* (A en azul) y tomando como molde a la subunidad ϵ de *E. coli* (A en amarillo), se llevó a cabo una dinámica molecular, partiendo del estado inicial (A), en rojo se encuentra los residuos de aminoácidos que esta subunidad posee. (B) Modelo de la subunidad ϵ de *P. denitrificans*. El cuadro negro encierra la parte más móvil de la proteína. (C) Acercamiento del cuadro negro representado en B, antes de la dinámica molecular. (D) Acercamiento del cuadro negro representado en B, después de la dinámica molecular.

En el modelo estructural de la subunidad ϵ en la figura 20A, tenemos en amarillo a la subunidad ϵ de *E. coli*, y en azul y rojo a la ϵ de *P. denitrificans*. El fragmento adicional se muestra en rojo. En la figura 20B tenemos solo el modelo estructural, de la misma manera en rojo, el fragmento extra de 9 aminoácidos que no se ha encontrado en otra especie. Un acercamiento de esta estructura se muestra en la figura 20C, donde se marca la fenilalanina 146 la cual, en la dinámica molecular, se acerca notablemente hacia

la parte globular de la subunidad (Figura 20D), este dato refuerza la teoría de que el fragmento extra es el responsable de la no inhibición, ya que en las subunidades ϵ que si inhiben, el modelo que se ha propuesto es que la parte carboxilo terminal se extiende para formar una 'trenza' con la subunidad γ y así, inhibir la actividad de la F_1 -ATPasa.

XII. Purificación de la subunidad ϵ sin el fragmento extra

Con el fin de resolver si el fragmento de 9 aminoácidos extra de la subunidad ϵ de *P. denitrificans* es el responsable de que la subunidad ϵ de la F_1 -ATPasa en esta especie no inhiba, se hicieron las construcciones para suprimir dichos fragmentos añadiendo una bandera de 9 histidinas para facilitar la purificación. Las construcciones fueron llevadas a cabo en colaboración con el Dr. Alfredo Torres Larios del Instituto de Fisiología Celular. El plásmido que se utilizó fue el pMCSG7, con una clonación libre de ligación. Las subunidades purificadas y ya libres de bandera de histidinas se muestran en el SDS-PAGE de la figura 21 donde se observa claramente la diferencia de peso de aproximadamente 1 kDa entre las dos.

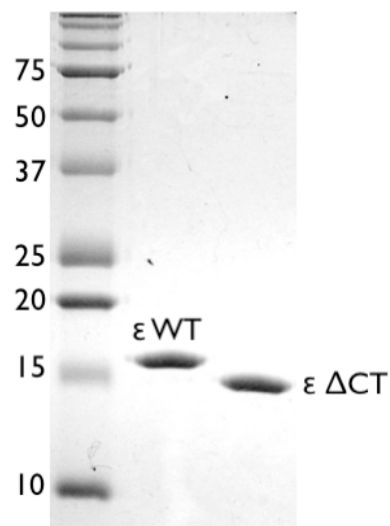


Figura 21. SDS-PAGE al 16% de acrilamida según (55) de la subunidad ϵ y $\epsilon\Delta CT$ recombinantes. Se amplificaron, clonaron y sobre-expresaron los genes de la subunidad ϵ , tanto WT, como ΔCT , es decir sin los últimos 9 residuos de aminoácidos, ambos con una bandera de 6 histidinas del extremo Amino terminal para facilitar su purificación. Del lado izquierdo se encuentran los estándares de peso molecular y en los siguientes carriles, sucesivamente la ϵ WT y la $\epsilon \Delta CT$.

Estas subunidades se utilizarán en posteriores proyectos para resolver si el fragmento extra del carboxilo terminal de esta subunidad está ocasionando la pérdida de movilidad de este dominio y así evitando que inhiba la actividad de la F₁-ATPasa.

XIII. Purificación de PdF₁ con Q-sefarosa

El gel de la purificación se muestra en la figura 22, donde observamos que la pureza es muy cercana al 100%. Se obtuvieron 26 mg de PdF₁ de 200 gr. de células con una actividad específica de 3 $\mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1})$.

La muestra se diluyó a 10 mg/ml y se dejaron incubando experimentos de cristalización con los siguientes sistemas:

- Hampton Grid Screen Salt
- JBScreen PEG/Salt HSTC
- Hampton MembFac
- Topaz Optimix 2 and 3
- Hampton Crystal Screening
- F₁ Condiciones de *Bacillus TA* (PEG 4K and 1.5K)
- F₁ condiciones de *Sacharomices cereviceae* (PEG 4K)
- F₁(tallo periférico) Bovino (Peg 8K) (67)

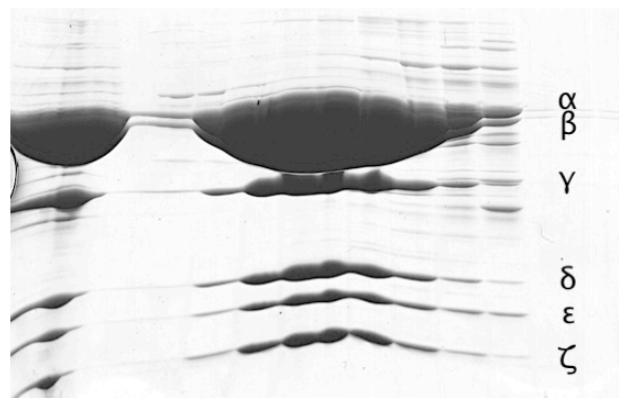


Figura 22. SDS-PAGE de las fracciones de la filtración en gel en la Superdex 200 resultantes de escalar la purificación de la PdF₁ en el laboratorio del Dr. John E. Walker.; la pureza de la muestra es cercana al 100%.

XIV. Purificación de PdF₁F₀ con Q-sefarosa

Las fracciones de la columna de filtración molecular se observan en la figura 23. La pureza fue cercana al 98%

Se obtuvieron 15 mg de 200 gr. de células con una actividad de 3.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg de proteína})^{-1}$.

La enzima se diluyó a 10 mg/ml y se inició el experimento de cristalización en las siguientes condiciones:

-TOPAZ Optimix 1, 2, 3 and 5 (membranes)

-Hampton MembFac

-Memb Sys

-Memb Start

-Hampton Grid Screen Salt

-Molecular dynamics MembGold

-Hampton Crystal Screen

-Hampton PEG/Ion

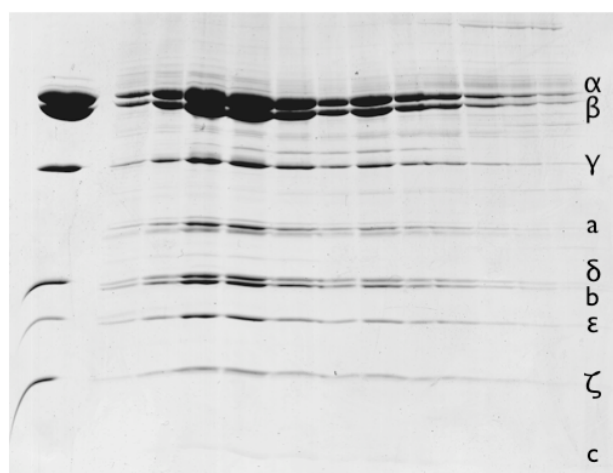


Figura 23. SDS-PAGE de las fracciones de la filtración en gel en la TOSOH G4000 resultantes de escalar la purificación de la PdF₁F₀ en el laboratorio del Dr. John E. Walker. La pureza de la muestra es cercana al 90%.

XV. Proteólisis limitada de la subunidad ζ

Se utilizó este acercamiento para resolver la secuencia que le confiere la capacidad inhibitoria a la subunidad ζ . Utilizamos a la proteasa tripsina con una relación 1:20 tripsina:subunidad ζ y a diferentes tiempos, cargando 4 μg de proteína por carril. El único fragmento que se produce es uno de un peso de 9 kDa aproximadamente y es resistente aún al tiempo de 20 minutos. Para obtener más del fragmento, se utilizaron 150 μg de la subunidad ζ y 25 μg de tripsina. Incubamos 8 minutos a 25°C. Se detuvo la reacción con 10 mM de PMSF y se inyectó a una columna con resina Superdex 75. Las fracciones fueron analizadas mediante un SDS-PAGE (Figura 24) las fracciones correspondientes al pico marcado con la flecha roja se juntaron y se guardaron a -20 °C. Posteriormente las fracciones se reconstituyeron a PSBs y no se observa una disminución en la actividad de ATPasa aún agregando 40 μg de dicho péptido a 50 μg de membranas, caso contrario es el de la subunidad ζ completa, la cual al agregar 3 μg a 50 μg de las membranas, prácticamente la actividad está totalmente inhibida.

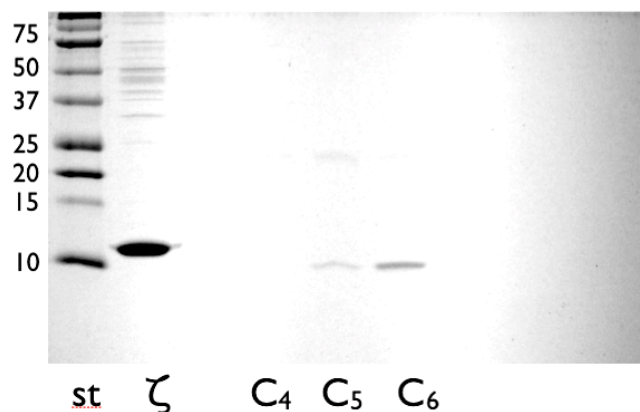


Figura 24. SDS-PAGE de las fracciones resultantes de la filtración en gel de la subunidad ζ tratada con la proteasa tripsina. En el primer carril se cargaron los estándares de peso molecular luego una muestra de la subunidad ζ sin tratarse con la tripsina. El carril marcado con C6 fue la fracción que contenía al fragmento más puro.

La secuencia de dicho fragmento fue identificada por espectrometría de masas, en colaboración con el Doctor Guillermo Mendoza. Dicha técnica nos indicó que la proteína se corta tanto por el extremo amino, como por el carboxilo terminal, del lado amino se

cortan 14 residuos de aminoácidos y del lado carboxilo, se cortan 25 residuos de aminoácidos. Al realizar el mismo tipo de experimentos con quimotripsina en lugar de tripsina se obtuvieron los mismos resultados, es decir, se proteolizaron tanto ambos extremos N- y C-terminales de la subunidad ζ , obteniéndose un fragmento de tamaño muy similar al obtenido con tripsina, y este fragmento residual tampoco es inhibitorio para las actividades de F_1 -ATPasa soluble y de PdF_1F_0 -ATPasa de las PSB. En resumen, estos experimentos muestran que los extremos N- y/o C-Terminales de la subunidad ζ contienen al dominio inhibitorio de esta subunidad.

XVI. Células de *P. denitrificans* cultivadas en condiciones de anaerobiosis

Para definir si la expresión de la subunidad ζ se modifica en condiciones de crecimiento aerobio o anaerobio, después de haber crecido a células de *P. denitrificans*, cepa PD 1222 en condiciones de anaerobiosis, se cosecharon y se rompieron con el amortiguador de la muestra para los geles de poliacrilamida. Se llevaron a cabo tanto el WB (Figura 25) como la densitometría de las bandas correspondientes a las subunidades β y ζ ; al calcular el cociente β/ζ de las células incubadas en normoxia (Figura 25 A), nos da como resultado 0.99, pero al hacer este mismo análisis en el WB de las células cultivadas en condiciones de anaerobiosis (figura 25 B), obtenemos como resultado en promedio 2.22; es decir que hay 2.22 veces más subunidad β que subunidad ζ . La subunidad ζ se está sub-expresando en condiciones de anaerobiosis, y se ha observado que en estas condiciones, la concentración de ATP es menor que en condiciones de normoxia (68). Así que una posible hipótesis es que en condiciones de anaerobiosis el gradiente electroquímico de protones es menor que en condiciones de normoxia, por lo tanto la célula necesita re-establecer un gradiente normal para poder mantener sus funciones básicas, para lo cual podría emplear al complejo F_1F_0 como ATPasa y bomba de protones y restablecer el gradiente electroquímico de protones a expensas del ATP y así

poder emplear a los transportadores secundarios que utilizan protones para retransportar metabolitos a través de la membrana plasmática de la célula.

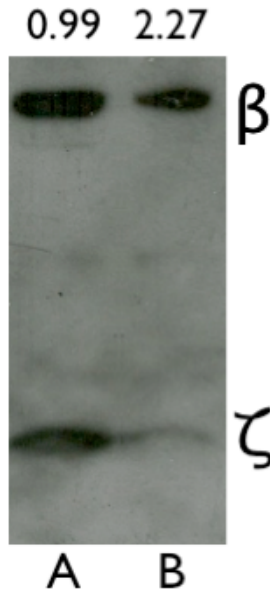


Figura 25. Western Blot de un lisado de células cultivadas en dos diferentes condiciones. (A) En condiciones de aerobiosis y (B) en condiciones de anaerobiosis. La membrana fue incubada con dos diferentes anticuerpos, el anti- ζ y el anti- β

XVII. Estructura atómica de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*

La estructura atómica de la subunidad ζ se resolvió en colaboración con el laboratorio del Dr. Wüthrich, del Scripps Research Institute, California, USA, gracias al trabajo del Dr. Pedro Serrano. La estructura promedio de los diferentes conformeros se encuentra en la figura 26. En rojo se marcan los sitios de corte de la tripsina, tanto en el amino, como en el carboxilo terminal. Una de estas partes marcadas en rojo (o ambas) son las responsables de la inhibición de la actividad de ATPasa mediada por esta subunidad ζ . El extremo amino terminal, es extremadamente móvil como se puede ver en la figura 27.

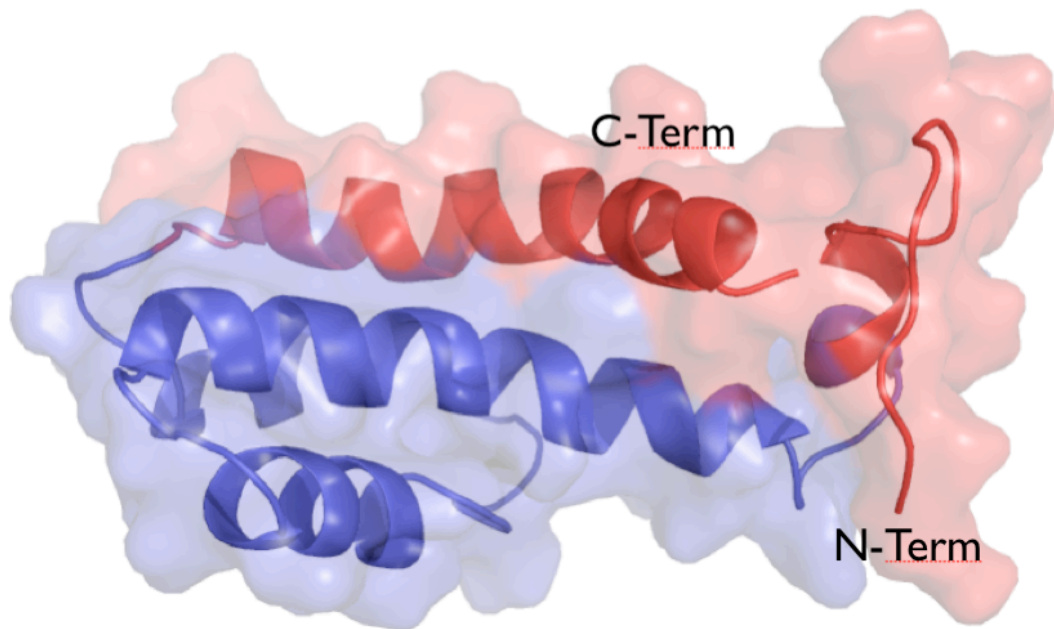


Figura 26. Estructura atómica de la subunidad ζ de *P. denitrificans*, resuelto por resonancia magnética nuclear (RMN) en el laboratorio del Dr. Kurt Wüthrich en colaboración con nuestro laboratorio. En rojo se encuentran marcados los fragmentos que fueron proteolizados por la tripsina, se marcan el N-Term (amino terminal) y el C-Term (carboxilo terminal).

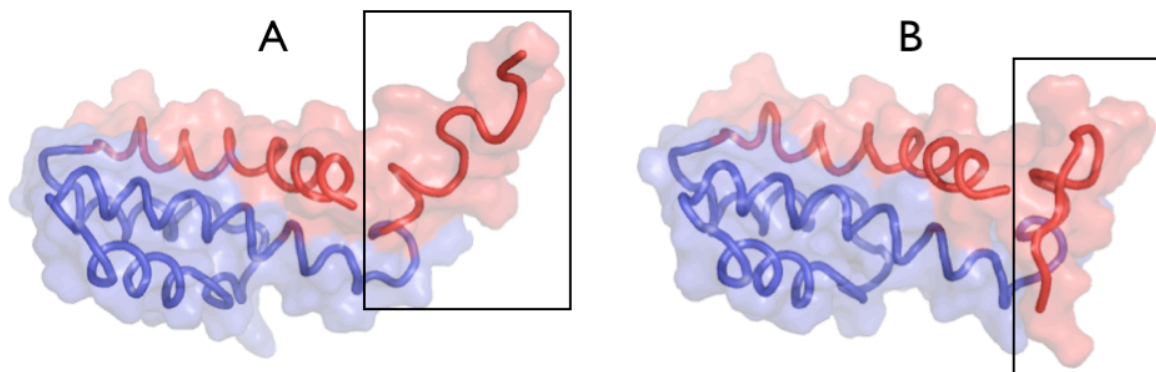


Figura 27. Movimientos del extremo amino terminal de la subunidad ζ en solución. Se tomaron los conformeros más diferentes entre sí de la estructura atómica resuelta por el Dr. Pedro Serrano. (A) Confórmero con el dominio amino terminal 'desplegado'. (B) Confórmero con el dominio amino terminal 'comprimido'. En rojo se muestran los fragmentos proteolizados por la tripsina.

Por lo tanto, las explicaciones alternativas de los efectos de las proteólisis limitadas en la actividad de ATPasa son las siguientes: 1.- El fragmento amino terminal es el fragmento inhibitorio y por eso tiene una gran movilidad, 2.- Que el fragmento carboxilo terminal sea

el fragmento inhibitorio y esta sea cubierta por la parte amino terminal y así se pierda su capacidad inhibitoria, y 3.- Que ambos fragmentos sean los encargados de la inhibición de la actividad de ATPasa de la PdF₁ mediada por la subunidad ζ.

CONCLUSIONES

- ▶ La subunidad de 11 kDa, ahora denominada subunidad ζ por nuestro grupo, posee la capacidad de inhibir la actividad de ATPasa de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*, además de encontrarse adosada a la enzima. Esto abre una nueva línea de mecanismos de control del nanomotor F_1F_0 -ATP sintasa bacteriano, con una proteína inhibidora de α -proteobacterias diferente a la proteína inhibidora mitocondrial (IF_1) y a la subunidad ϵ de la enzima bacteriana.
- ▶ La subunidad ϵ de la PdF_1 no inhibe su actividad de ATPasa, pero es necesaria para el correcto funcionamiento de la PdF_1 .
- ▶ La subunidad ζ interacciona con las subunidades α y β en estado basal y en presencia de ATP, pero en condiciones activadas en presencia de sulfito, la subunidad ζ se reacomoda de tal manera que se separa de las subunidades α/β y se acerca a otras subunidades de la enzima pero entrecruzando con baja eficiencia con ϵ , probablemente la baja eficiencia sea ocasionada por la eficiencia del entrecruzador.
- ▶ La subunidad ζ se sub-expresa en condiciones de anaerobiosis. Es probable que en condiciones de anaerobiosis, el gradiente es menor, así que la célula emplea a la ATP sintasa como generadora del gradiente a expensas del ATP y por eso, la subunidad ζ se encuentra disminuida.
- ▶ La estructura atómica de la subunidad ζ nos indica que la parte amino terminal es muy móvil, probablemente esta sea el dominio inhibitorio. Alternativamente, su movilidad cubre/descubre al dominio inhibitorio que se localizaría en el dominio C-terminal.
- ▶ La estructura terciaria de la subunidad ζ muestra una diferencia radical respecto a la estructura de los otros inhibidores de las F-ATPasas en bacterias (ϵ) o la proteína inhibidora mitocondrial (IF_1). Esto confirma que la subunidad zeta presente en la ATP sintasa de α -proteobacterias representa un mecanismo novedoso de inhibición del nanomotor F_1F_0 -ATPasa bacteriano que estamos en vías de resolver.

- ▶ La F₁F₀-ATP sintasa de *Rhodobacter sphaeroides* posee, al igual que en *P. denitrificans* a la subunidad ζ.
- ▶ La actividad de F₁-ATPasa de los cromatóforos de *R. sphaeroides* es inhibida por la subunidad ζ de *P. denitrificans*.

PERSPECTIVAS

- ▶ Construir una cepa de *P. denitrificans* carente del gen de la subunidad ζ.
- ▶ Resolver la estructura atómica del sub-complejo PdF₁ y del complejo PdF₁F₀.
- ▶ Resolver el mecanismo de inhibición de la PdF₁ mediado por la subunidad ζ.
- ▶ Determinar el fragmento mínimo inhibitorio de la subunidad ζ.
- ▶ Determinar si la subunidad ζ se encuentra en todas las especies de la clase α-proteobacteria.

LITERATURA CITADA

1. Beijerinck, M. W., and Minkman, D. C. J. (1910) Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* **25**, 30-63
2. Ohkubo, S., Iwasaki, H., Hori, H., and Osawa, S. (1986) Evolutionary relationship of denitrifying bacteria as deduced from 5S rRNA sequences. *J Biochem* **100**, 1261-1267
3. Katayama, Y., Hiraishi, A., and Kuraishi, H. (1995) *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology* **141 (Pt 6)**, 1469-1477
4. Uemoto, H., and Saiki, H. (1996) Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4224-4228
5. Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O. M., and van Spanning, R. J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1046-1078
6. Margulis, L. (1970) *Origin of Eucaryotic Cells*, University Press, New Haven
7. John, P., and Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* **254**, 495-498
8. Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481
9. Yagi, T. (1986) Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Arch Biochem Biophys* **250**, 302-311
10. Pennoyer, J. D., Ohnishi, T., and Trumppower, B. L. (1988) Purification and properties of succinate-ubiquinone oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* **935**, 195-207
11. Berry, E. A., and Trumppower, B. L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes. *J Biol Chem* **260**, 2458-2467
12. Ludwig, B., and Schatz, G. (1980) A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa3) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 196-200
13. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669
14. Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., and Garcia-Trejo, J. J. (2010) A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1FO ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB J* **24**, 599-608
15. Perez, J. A., and Ferguson, S. J. (1990) Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP synthesis at the active site(s) of F0F1-ATPase. *Biochemistry* **29**, 10503-10518
16. Perez, J. A., and Ferguson, S. J. (1990) Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 2. Evidence for a kinetic and thermodynamic modulation of F0F1-ATPase by the activity of the respiratory chain. *Biochemistry* **29**, 10518-10526
17. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2003) Proton-translocating ATP-synthase of *Paracoccus denitrificans*: ATP-hydrolytic activity. *Biochemistry (Mosc)* **68**, 1101-1108

18. Pacheco-Moises, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) Sulfite inhibits the F₁F₀-ATP synthase and activates the F₁F₀-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 269-278
19. Du, Z. Y., and Boyer, P. D. (1990) On the mechanism of sulfite activation of chloroplast thylakoid ATPase and the relation of ADP tightly bound at a catalytic site to the binding change mechanism. *Biochemistry* **29**, 402-407
20. Mueller, D. M., Indyk, V., and McGill, L. (1994) ATPase kinetics for wild-type *Saccharomyces cerevisiae* F₁-ATPase and F₁-ATPase with the beta-subunit Thr197-->Ser mutation. *Eur J Biochem* **222**, 991-999
21. Bakels, R. H., Van Walraven, H. S., Van Wielink, J. E., Van Der Zwet-De Graaff, I., Krenn, B. E., Krab, K., Berden, J. A., and Kraayenhof, R. (1994) The effect of sulfite on the ATP hydrolysis and synthesis activity of membrane-bound H(+)-ATP synthase from various species. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 487-492
22. Moyle, J., and Mitchell, P. (1975) Active/inactive state transitions of mitochondrial ATPase molecules influenced by Mg²⁺, anions and aurovertin. *FEBS Lett* **56**, 55-61
23. He, F., Samra, H. S., Johnson, E. A., Degner, N. R., McCarty, R. E., and Richter, M. L. (2008) C-Terminal mutations in the chloroplast ATP synthase gamma subunit impair ATP synthesis and stimulate ATP hydrolysis. *Biochemistry* **47**, 836-844
24. Pacheco-Moises, F., Garcia, J. J., Rodriguez-Zavala, J. S., and Moreno-Sanchez, R. (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATPase. *Eur J Biochem* **267**, 993-1000
25. de la Rosa-Morales, F. (2005) Composición de subunidades y Mecanismo de Regulación de la F₁F₀ ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*. In *Bioquímica Vol. Maestría* p. 76, Universidad Nacional Autónoma de México, México
26. Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963) A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem* **238**, 3762-3769
27. Garcia, 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
28. Souid, A. K., and Penefsky, H. S. (1994) Mechanism of ATP synthesis by mitochondrial ATP synthase from beef heart. *J Bioenerg Biomembr* **26**, 627-630
29. Garcia, J. J., Gomez-Puyou, A., Maldonado, E., and Tuena De Gomez-Puyou, M. (1997) Acceleration of unisite catalysis of mitochondrial F₁-adenosinetriphosphatase by ATP, ADP and pyrophosphate -- hydrolysis and release of the previously bound [γ -³²P]ATP. *Eur J Biochem* **249**, 622-629
30. Garcia, J. J., and Capaldi, R. A. (1998) Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J Biol Chem* **273**, 15940-15945
31. Garcia, J. J. (2000) *The F₀F₁-ATP synthase: binding energy, coupling and rotational catalysis* Vol. 1, Transworld Research Network, Trivandrum
32. Noji, H., and Yoshida, M. (2001) The rotary machine in the cell, ATP synthase. *J Biol Chem* **276**, 1665-1668
33. Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K., Jr., and Yoshida, M. (1998) Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F₁-ATPase. *J Biol Chem* **273**, 19375-19377
34. Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., and Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* **286**, 1722-1724
35. Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Yoshida, M., and Capaldi, R. A. (2001) Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₁F₀ ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 898-902

36. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**, 717-749
37. Penefsky, H. S., Pullman, M. E., Datta, A., and Racker, E. (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* **235**, 3330-3336
38. Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J., Aggeler, R., Wilce, M. C., Yoshida, M., and Capaldi, R. A. (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6560-6564
39. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 433-443
40. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., and Vignais, P. V. (1980) Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14C)isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* **19**, 2919-2925
41. Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* **10**, 744-750
42. Cabezon, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem* **275**, 25460-25464
43. Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M. R., Abramov, A. Y., Tinker, A., and Duchen, M. R. (2008) Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab* **8**, 13-25
44. Beltran, C., Tuena de Gomez-Puyou, M., Darszon, A., and Gomez-Puyou, A. (1986) Simultaneous synthesis and hydrolysis of ATP regulated by the inhibitor protein in submitochondrial particles. *Eur J Biochem* **160**, 163-168
45. Schwerzmann, K., and Pedersen, P. L. (1981) Proton--adenosinetriphosphatase complex of rat liver mitochondria: effect of energy state on its interaction with the adenosinetriphosphatase inhibitory peptide. *Biochemistry* **20**, 6305-6311
46. Power, J., Cross, R. L., and Harris, D. A. (1983) Interaction of F1-ATPase, from ox heart mitochondria with its naturally occurring inhibitor protein. Studies using radioiodinated inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* **724**, 128-141
47. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2007) How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15671-15676
48. Cabezon, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., and Walker, J. E. (2000) Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *J Biol Chem* **275**, 28353-28355
49. Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A., and Papa, S. (2004) Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 447-457
50. Wilkens, S., and Capaldi, R. A. (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F1 and F0 parts of the Escherichia coli ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* **1365**, 93-97
51. Rodgers, A. J., and Wilce, M. C. (2000) Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nat Struct Biol* **7**, 1051-1054
52. Feniouk, B. A., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., and Suzuki, T. (2010) Conformational transitions of subunit epsilon in ATP synthase from thermophilic Bacillus PS3. *Biophys J* **98**, 434-442

53. Cingolani, G., and Duncan, T. M. (2011) Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 701-707
54. Dautant, A., Velours, J., and Giraud, M. F. (2010) Crystal structure of the Mg-ADP-inhibited state of the yeast F₁c₁₀-ATP synthase. *J Biol Chem* **285**, 29502-29510
55. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379
56. Burnell, J. N., John, P., and Whatley, F. R. (1975) The reversibility of active sulphate transport in membrane vesicles of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J* **150**, 527-536
57. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275
58. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356
59. Muntyan, M. S., Mesyanzhinova, I. V., Milgrom, Y. M., and Skulachev, V. P. (1990) The F₁-type ATPase in anaerobic *Lactobacillus casei*. *Biochim Biophys Acta* **1016**, 371-377
60. Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1977) A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 82-86
61. Bohm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* **5**, 191-195
62. Lotscher, H. R., deJong, C., and Capaldi, R. A. (1984) Interconversion of high and low adenosinetriphosphatase activity forms of *Escherichia coli* F₁ by the detergent lauryldimethylamine oxide. *Biochemistry* **23**, 4140-4143
63. Vazquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. (1986) Mitochondrial H⁺-ATPase activation by an amine oxide detergent. *J Biol Chem* **261**, 7807-7810
64. Sosa, A., and Celis, H. (1995) H⁺/PP_i stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Biochem Biophys* **316**, 421-427
65. Stols, L., Gu, M., Dieckman, L., Raffin, R., Collart, F. R., and Donnelly, M. I. (2002) A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif* **25**, 8-15
66. 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
67. Rees, D. M., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2009) The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21597-21601
68. Strohm, T. O., Griffin, B., Zumft, W. G., and Schink, B. (2007) Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1420-1424

A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F_1F_O ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria

Edgar Morales-Ríos,* Fernanda de la Rosa-Morales,[§] Guillermo Mendoza-Hernández,[†] José S. Rodríguez-Zavala,[§] Heliodoro Celis,[‡] Mariel Zarco-Zavala,* and José J. García-Trejo*^{*,1}

*Biology Department, Chemistry Faculty, [†]Biochemistry Department, Medicine Faculty, and [‡]Cell Physiology Institute, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico; and [§]Biochemistry Department, National Institute of Cardiology, Mexico City, Mexico

ABSTRACT The F_1F_O and F_1 -ATPase complexes of *Paracoccus denitrificans* were isolated for the first time by ion exchange, gel filtration, and density gradient centrifugation into functional native preparations. The liposome-reconstituted holoenzyme preserves its tight coupling between F_1 and F_O sectors, as evidenced by its high sensitivity to the F_O inhibitors venturicidin and dicyclohexylcarbodiimide. Comparison and N-terminal sequencing of the band profile in SDS-PAGE of the F_1 and F_1F_O preparations showed a novel 11-kDa protein in addition to the 5 canonical α , β , γ , δ , and ϵ subunits present in all known F_1 -ATPase complexes. BN-PAGE followed by 2D-SDS-PAGE confirmed the presence of this 11-kDa protein bound to the native F_1F_O -ATP synthase of *P. denitrificans*, as it was observed after being isolated. The recombinant 11 kDa and ϵ subunits of *P. denitrificans* were cloned, overexpressed, isolated, and reconstituted in particulate F_1F_O and soluble F_1 -ATPase complexes. The 11-kDa protein, but not the ϵ subunit, inhibited the F_1F_O and F_1 -ATPase activities of *P. denitrificans*. The 11-kDa protein was also found in *Rhodobacter sphaeroides* associated to its native F_1F_O -ATPase. Taken together, the data unveil a novel inhibitory mechanism exerted by this 11-kDa protein on the F_1F_O -ATPase nanomotor of *P. denitrificans* and closely related α -proteobacteria.—Morales-Ríos, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G., Rodríguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., García-Trejo, J. J. A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F_1F_O ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria. *FASEB J.* 24, 000–000 (2010). www.fasebj.org

Key Words: inhibitor • F_1F_O ATPase • nanomotor • rhodobacteraceae

BECAUSE OF ITS EVOLUTIVE RELATEDNESS to the mitochondrial protoendosymbiont, *Paracoccus denitrificans* preserves an aerobic “mitochondrial-like” respiratory chain (1, 2); however, the respiratory complexes of this bacterium are simpler than those of mitochondria and

therefore more suitable for structural studies. This has been instrumental in, for instance, the isolation of cytochrome *c* oxidase or complex IV of this bacterium and the resolution of the first crystal structure obtained for this complex (3). Respiratory complexes I (4), II (5), and III (6) from *P. denitrificans* have also been isolated, functionally characterized, and to some extent structurally defined. However, the structural and functional characteristics of the fifth and key element of the oxidative phosphorylation system, the F_1F_O -ATP synthase from *P. denitrificans*, have not been determined. This is because it has not been possible to isolate stable and native F_1 or F_1F_O complexes from this bacterium.

In the direction of ATP synthesis, the F_1F_O complex of *P. denitrificans* is well known kinetically as a very fast F_1F_O -ATP synthase in inside-out vesicles, whereas in the direction of ATP hydrolysis, the complex exhibits exceptionally low rates and a markedly latent ATPase activity (7, 8). In comparison to its homologous enzymes from *Escherichia coli* and bovine heart mitochondria that show roughly equal forward and reverse rates in inside-out vesicles, this enzyme of *P. denitrificans* is ~100-fold faster as ATP synthase than as ATPase (7–9). Therefore, the F_1F_O complex of *P. denitrificans* is the most efficiently controlled and essentially unidirectional ATP synthase that is known. In this context, the lack of structural information on the ATP synthase of *P. denitrificans* raises questions on the composition and mechanism of action of its subunits that accounts for the tight control of ATP synthesis over hydrolysis. In most bacteria, the ϵ subunit inhibits the ATPase activity at the central stalk of the enzyme (10–12); this subunit also hampers the forward ATP synthase turnover in bacterial F_1F_O (13, 14); in mitochondria, the inhibitor protein (IF₁) blocks γ rotation (15) and the closed/open transition of one of the three catalytic β subunits

¹ Correspondence: Facultad de Química, Depto. Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Edificio “F,” Laboratorio 117, México, D. F., 04510, México. E-mail: jjgatre@unam.mx
doi: 10.1096/fj.09-137356

(for review, see ref. 11), while in chloroplast CF₁F₀, a disulfide bridge blocks rotation of the enzyme under dark or oxidized conditions (16). The latter mechanism can be ruled out in *P. denitrificans* because no F₁F₀-ATPase activation is observed with disulfide reductants such as dithiothreitol (17). Instead, the presence of one or more intrinsic inhibitor proteins in the ATP synthase of *P. denitrificans* has been inferred from its activation as ATPase with limited trypsinolysis in a crude extract of an F₁-ATPase of very low activity (18), as well as in the native F₁F₀-ATPase of inverted membrane vesicles (17).

After detachment from membrane vesicles, the soluble F₁-ATPase from *P. denitrificans* becomes functionally and structurally unstable (ref. 18 and unpublished results), thus hindering its isolation. In this work, these barriers were surpassed by tracking sulfite-activated ATPase activity (9, 17) and by stabilizing the isolated F₁ and F₁F₀ complexes of *P. denitrificans* in the presence of glycerol. The F₁F₀ and F₁-ATPase complexes of *P. denitrificans* were isolated from coupled subbacterial particles (SBPs) (8) into homogeneous preparations that exhibited optimal stability and high ATPase activity. The isolated holoenzyme preserved F₁F₀ coupling, as evidenced by enhanced sensitivity to venturicidin and DCCD on reconstitution into proteoliposomes. BN-PAGE followed by 2D-SDS-PAGE showed the same subunit composition of the F₁F₀-ATP synthase of *P. denitrificans* as compared to that resolved by SDS-PAGE after its isolation. The highly purified F₁ and F₁F₀ preparations showed a novel 11-kDa protein in addition to the 5 canonical subunits present in all known F₁-ATPase particles, namely α , β , γ , δ , and ϵ . This novel 11-kDa subunit is a powerful inhibitor of ATP hydrolysis carried out by the F₁F₀ and F₁-ATPase complexes of *P. denitrificans*. This protein was also found in closely related α -proteobacteria.

MATERIALS AND METHODS

Strains and preparation of vesicles

P. denitrificans cells, strain 1222 (Ri^r, Sp^r, enhanced conjugation frequencies, m⁻) (19), provided by Juan Carlos Estrada-Mora [Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico], were grown aerobically at 37°C for 24 h in the presence of 25 μ g/ml of rifampicin. The cells were harvested at 11,400 *g* for 10 min and washed once with 10 mM NaCl and 10 mM Tris/HCl (pH 7.5). Inside-out vesicles were prepared as before (17). SBPs were prepared by sonication of inside-out vesicles diluted at 10 mg protein/ml in 10% glycerol, 0.25 M sucrose, 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM *p*-aminobenzamidine (PAB), 5 mM MgCl₂, and 5 mM ATP. The sonicated sample was centrifuged for 1 h at 27,000 *g* at 4°C, the supernatant was centrifuged for 1.5 h at 186,000 *g* at 4°C, and the pellet was resuspended in 10% glycerol, 0.25 M sucrose, 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), and 5 mM PAB to a final protein concentration of ~30 mg/ml.

ATPase activity

The enzymatic activity of ATP hydrolysis was determined by the amount of released inorganic phosphate (P_i), as described by Fiske and Subbarow (20). The ATPase activity was assayed in 0.25 M sucrose, 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 60 mM sodium sulfite, 5 mM MgCl₂, and 5 mM ATP. The reaction was started by adding 100 μ g of SBPs to 100 μ l of the reaction mixture and arrested at the times shown by adding trichloroacetic acid (15% final concentration). Phosphoric acid (pH 7.2) was used as P_i standard, and the amount of P_i released from each reaction was calculated by interpolation with the P_i standard curve.

ATP-synthase assays

The steady-state rates of ATP synthesis activity were determined with a coupled hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) assay by the rate of NADPH appearance at 340 nm, as described by Cortes-Hernandez *et al.* (21). The standard reaction mixture contained 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 250 mM sucrose, 1 mM ADP, 5 mM MgCl₂, 20 mM P_i (pH 7.2), 100 μ M AP5A, 0.5 mM NADP⁺, 10 mM glucose, 6 U/ml G6PDH, and 0.2 mg/ml hexokinase. The reaction medium was preincubated for 10 min at 37°C; SBPs were added at this time and preincubated for an extra 5 min, followed by the addition of 10 mM succinate to start the reaction. In all experiments, the venturicidin-insensitive activity was subtracted from the activity in the absence of the inhibitor. On average, venturicidin inhibited the overall activity by >90%.

Cloning of the 11-kDa and ϵ subunits of the F₁-ATPase of *P. denitrificans*

The coding sequence of the *P. denitrificans* 11-kDa protein, GenBank accession no. YP_916642.1, was amplified by PCR with the synthetic oligonucleotides PdzNTerm (5'-TATATTCATATGACCACATTTGACGACCGC) and PdzCTerm (5'-TATACTAAGCTTTCAGATCTCGCTGATGATCTG), using as a template the chromosomal DNA of *P. denitrificans*. The sequence of the resulting DNA was verified by direct sequencing and subsequently cloned into the *Nde*I/*Hind*III site of the expression vector pT77. The resulting plasmid (pIPPD1) was used to transform *E. coli* BL21 strain for expression. After downloading the ϵ DNA gene sequence from the same source of genomic DNA data from *P. denitrificans* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=119376152>), the ϵ gene was PCR amplified as a 477-bp fragment using the oligonucleotides PdeNTerm (5'-TACTAACATATGGCCGACACGATG) and PdeCTerm (5'-ATAATAAGCTTCTAATGCGGGAAATTC). The same restriction sites used for the 11-kDa gene (*Nde*I in N1 and *Hind*III in C1) were employed to clone the ϵ amplicon of 477 bp into the pT77 plasmid to construct the so-called pEPPD1 expression vector. The latter was used to transform BL21 competent cells for overexpression and purification as follows.

Protein overexpression and purification

E. coli BL21 strains transformed with the constructed plasmids were grown at 37°C until the absorbance at 660 nm reached 0.6. At this time, 0.4 mM IPTG was added for overnight induction; afterward, the cells were harvested and disrupted by sonication. The 11-kDa protein was in the soluble fraction, which was precipitated by adding slowly the dry powder of ammonium sulfate to 50% saturation in order to spin down larger proteins, and the supernatant was subsequently supplemented with ammonium sulfate powder as before to reach

80% saturation. The pellet that contained the 11-kDa protein was desalted and concentrated in Amicon membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) and subsequently loaded into a 10-ml DEAE-Sepharose column and eluted with a 0–1 M KCl gradient. Fractions with the protein were concentrated and injected onto a Superdex 200 column in an Äkta purifier system (GE Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). The fractions containing the pure protein as judged by SDS-PAGE were pooled and stored at -20°C . The ϵ subunit was purified with the same chromatographic procedure, but it was precipitated by adding solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to obtain 30% saturation. The mitochondrial $\text{F}_1\text{-ATPase}$ from bovine heart mitochondria containing its endogenous inhibitor protein (F_1I complex) and the $\text{F}_1\text{-ATPase}$ from *E. coli* were purified as described before (15, 22).

Glycerol gradient centrifugation

The $\text{PdF}_1\text{F}_\text{O}$ and $\text{PdF}_1\text{-ATPase}$ complexes were purified by subjecting the $\text{PdF}_1\text{F}_\text{O}$ - or PdF_1 -enriched soluble extracts obtained from SBPs to glycerol gradient centrifugation as described before for obtaining bovine monomeric and dimeric $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$ complexes (23), except for the composition of the buffer, which was 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 10 mM succinate, 35 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol, 2 mM ATP, and the indicated concentrations of glycerol (15–40%). Fractions containing the purified $\text{PdF}_1\text{F}_\text{O}$ or $\text{Pd F}_1\text{-ATPase}$ complexes, as revealed by SDS-PAGE, were pooled and concentrated for further analyses or frozen at -80°C .

Other methods

Protein concentration was determined by the method of Lowry (24), with modifications, including TCA precipitation (25). SDS-PAGE electrophoresis was carried out according to Schägger and von Jagow (26) or Laemmli (27), as indicated. BN-PAGE and 2D-SDS/BN-PAGE were carried out according to Schägger (28) and Schägger and von Jagow (29), respectively. Densitometry analyses were carried out as described previously (15) with the Alpha DigiDoc software (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$ and $\text{F}_1\text{-ATPase}$ complexes from *P. denitrificans* sub-bacterial particles

Inside-out membrane vesicles from *P. denitrificans* were prepared by osmotic shock and sonication, as described previously (9), and subjected to additional sonication and washing steps (see Materials and Methods) to obtain the so-called SBPs. This treatment increased the rate of ATP synthesis 1.5- to 2.0-fold, to 0.6–1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ in SBPs, *i.e.*, values in the range of the highest reported for this enzyme (7). Purification of the whole $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$ complex from *P. denitrificans* was achieved by solubilization of SBPs with lauryl maltoside, which among other detergents tested, such as Triton X-100 or sodium cholate, yielded a pure preparation with higher specific activity. After solubilization and ultracentrifugation to remove insoluble material, the extracted proteins from SBPs were subjected to anion exchange (DEAE-Sepharose) and gel filtration (Sephacryl S-300) chromatography, followed by glycerol density gradient

centrifugation. The final enzyme preparation obtained had a 6-fold-higher ATPase activity than that of SBPs (from an average of 0.5 to 3.0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ in the presence of 60 mM sulfite), and its purity was $>95\%$, as estimated from band densitometry after Coomassie staining of SDS-PAGE (Fig. 1A, lane 2). The purified enzyme contained 9 different proteins, which, after N-terminal Edman sequence, included the 8 core proteins present in the eubacterial $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$ complex (α , β , γ , δ , ϵ , *a*, *b*, *c*) (see Fig. 3). An additional band of apparent size of 11 kDa that migrated faster than the ϵ subunit in SDS-PAGE was consistently observed in all $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$

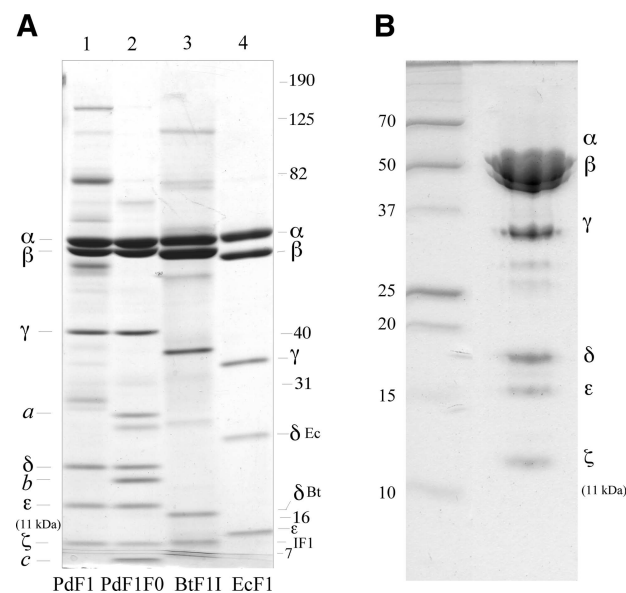


Figure 1. Coomassie-stained SDS-PAGE of purified F_1 and $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$ complexes from *P. denitrificans*, *B. taurus*, and *E. coli*. A) Protein (45 μg) from each preparation was loaded as follows in an SDS-PAGE (10–22% acrylamide gradient), according to Laemmli (27). Lane 1, $\text{F}_1\text{-ATPase}$ from *P. denitrificans* (PdF_1); lane 2, $\text{F}_1\text{F}_\text{O}$ complex isolated from *P. denitrificans* ($\text{PdF}_1\text{F}_\text{O}$); lane 3, isolated mitochondrial $\text{F}_1\text{-ATPase}$ containing the endogenous IF_1 (BtF_1I); lane 4, $\text{F}_1\text{-ATPase}$ purified from *E. coli* (EcF_1). Subunit identities and size standards are indicated on both sides. Gel shows a small discontinuity at the bottom of the acrylamide gradient (seen as a double band crossing all lanes at the bottom) that allowed resolution of subunit *c* of F_O as a compact band (lane 3 bottom); this also condensed the ϵ subunit of $\text{BtF}_1\text{-I}$ complex at the interface of the gradient discontinuity just below the IF_1 band. Subunits γ , ϵ , and δ were delayed in migration and therefore were larger in size than expected (see Fig. 3); however, this was corrected for the three subunits in gels carried out in the Schägger and Von Jagow (26) procedure (see Fig. 2). B) The $\text{F}_1\text{-ATPase}$ from *P. denitrificans* was extracted from 1 ml of SBPs at 84 mg protein/ml with chloroform and purified by affinity (DEAE-Sepharose) and gel filtration (Superdex 200) chromatography, as described in Materials and Methods and in the text. Final recovery was 1.5 mg of purified $\text{F}_1\text{-ATPase}$, from which 20 μg was loaded in the lane shown. Final specific activity of this preparation was 21 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. Other similar preparations reached 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. Subunit ϵ appeared with different intensities in different preparations, showing variable degrees of detachment of this subunit.

preparations (See Fig. 1A, lane 2 for a representative preparation). Edman degradation combined with gene sequencing allowed us to obtain the entire sequence of the 11-kDa protein, as well as that of the ϵ subunit (see below).

Isolated F_1F_O complex from *P. denitrificans* is a well-coupled nanomotor

Reconstitution of the purified F_1F_O complex of *P. denitrificans* into proteoliposomes increased the DCCD and venturicidin inhibition of the ATPase activity from 65 to 90%; at the concentrations used (25–100 μM), the inhibitors act specifically on the F_O proton channel. These results confirm the structural and functional integrity of the native ATP synthase of *P. denitrificans*. The yield in terms of total protein recovered from the lauryl maltoside SBP extract was 0.3%; however, it increased to 1.3% when estimated as total activity. This yield seems too low regarding the high enzyme content of SBPs (see text below and Fig. 2A); however, this resulted from pooling exclusively the Pd F_1F_O -enriched fractions, as judged from SDS-PAGE. Thus, although the enzyme yield dropped in the DEAE, sephacryl, and glycerol gradient fractions to ~10, 2–3, and 0.5–1.5%, respectively (see Table 1), we gained a high purity (Fig. 1, lane 2) and a 4-fold increase in specific activity in the final Pd F_1F_O preparation (Table 1; last column). The higher yield of total activity recovered as compared to protein indicates that some activation of the enzyme took place; this could be due to partial dissociation of one or more inhibitory subunits during the purification process. Enzyme activation was more evident after purification of the soluble Pd F_1 -ATPase (see below).

Figure 3 shows the N-terminal sequences that identified each of the F_1F_O subunits, except for subunits c and a of F_O . The latter was identified by labeling of the essential ϵ -carboxyl residue with NCD-4 (Fig. 2D), a fluorescent DCCD analog (see ref. 30), and by comigration of the a subunit with that of *E. coli*, respectively (not shown). N-terminal sequence and mass spectrometry analyses of subunit a were hindered because the N-terminal side of subunit a was blocked, and it tends to give a low yield of tryptic digest for mass spectrometric analyses, probably because of its high hydrophobicity; the latter is also true for subunit c (31). The subunit composition of the Pd F_1F_O complex was confirmed by two-dimensional gel electrophoresis. The lauryl maltoside extract of SBPs was first subjected to BN-PAGE and subsequently to 2D-SDS-PAGE to resolve the individual subunits of this complex. As shown before (32), the native Pd F_1F_O complex migrated as a single monomeric entity both in lauryl- β -D-maltoside (Fig. 2A, B) and digitonin extracts (not shown). The subunit composition resolved with this method (α , β , γ , a , δ , b , ϵ , and 11 kDa in decreasing size order) was identical to that obtained after isolation of the Pd F_1F_O complex by chromatography and density gradient centrifugation (Fig. 1A). Subunit c was also resolved in digitonin extracts subjected to BN and 2D gels as a faint band

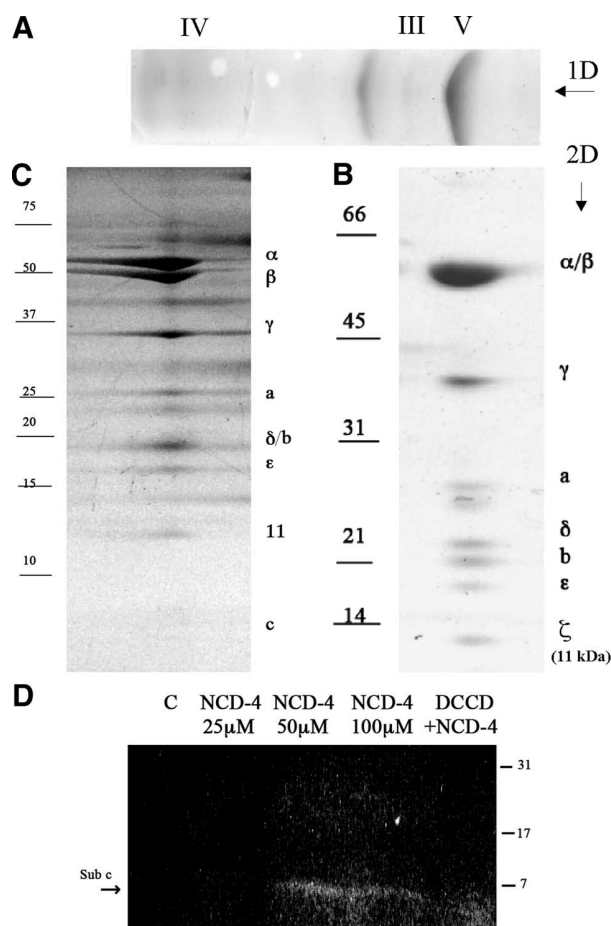


Figure 2. Two-dimensional-Blue Native-SDS-PAGE of extracted F_1F_O complex from *P. denitrificans* SBPs and identification of subunit c of F_O . SBPs (10 mg/ml) were extracted with lauryl maltoside (2 g/g protein), and 80 μg of the soluble extract was subjected to Blue Native PAGE and subsequent 2D-SDS-PAGE as described in Materials and Methods. A) After 1D-BN-PAGE, the major complex extracted from SBPs corresponded to the ATP synthase or complex V; other complexes identified previously (32) are present as faint bands as indicated. The band migrating below complex III was not identified. B) Another lane loaded as in A in the same BN-PAGE gel was loaded horizontally into 2D-SDS-PAGE as shown, according to Laemmli (27) (10–22% acrylamide). Subunit pattern contained all Pd F_1F_O subunits resolved by Laemmli gels after its isolation (Fig. 1A, lane 2). Subunit c ran off the 2D gel in order to get a better separation of the b and δ subunits. The 11-kDa subunit of *P. denitrificans* F_1F_O migrates just below ϵ as shown. C) Another lane of the 1D-BN-PAGE loaded as in A was subjected to 2D-SDS-PAGE (16% acrylamide), according to Schagger and Von Jagow (26). All subunits of the Pd F_1F_O complex were resolved except for the δ and b subunits, which stack together, and the c subunit was observed as a faint smeared band. D) Subunit c was labeled at its essential carboxyl group by incubating 100 μg of liposome-reconstituted Pd F_1F_O (see Materials and Methods) in reconstitution buffer (250 mM sucrose and 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) with the DCCD analog NCD-4 (25, 50, and 100 μM). The NCD-4 labeling was observed in the 6-kDa band of subunit c by its fluorescence under UV light after SDS-PAGE loaded with 25 μg Pd F_1F_O /lane. Specific binding of NCD-4 (50 μM) to subunit c was confirmed by hindering the NCD-4 labeling with previous modification with DCCD (50 μM), as shown in the last lane.

TABLE 1. Purification table of the F_1F_0 -ATPase and F_1 -ATPase of *P. denitrificans*

Fraction	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
PdF₁F₀ purification			
SBP LM-extract	162.5 (100%)	112.2 (100%)	0.69 (100%)
DEAE elution	10.5 (6.5%)	10.3 (9.2%)	0.98 (142%)
Sephacryl-S300 elution	2.4 (1.5%)	3.4 (3.0%)	1.41 (204%)
Glycerol gradient	0.5 (0.3%)	1.5 (1.3%)	3.00 (434%)
PdF₁ purification A			
SBP Sonic extract	16.2 (100%)	3.5 (100%)	0.21 (100%)
DEAE elution	5.3 (32.7%)	11.9 (340%)	2.26 (1076%)
Sephacryl-S300 elution	1.2 (7.2%)	6.0 (170%)	4.83 (2300%)
PdF₁ purification B			
SBP Chlor extract	5.25 (100%)	36.2 (100%)	6.9 (100%)
DEAH elution	3.0 (57.1%)	61.8 (170%)	20.3 (294%)
Superdex-200 elution	0.6 (11.4%)	19.85 (54.8%)	33.0 (478%)

(Fig. 2C). NCD-4 fluorescent labeling identified specifically this subunit after covalent modification with μM concentrations that target the essential carboxyl residue of the F_0 - c subunit. As expected from a c -subunit specific modification, NCD-4 labeling was prevented by previous modification with similar amounts of DCCD (Fig. 2D). Another band of ~ 24 kDa appeared consistently below subunit a in the PdF₁F₀ after being isolated (Fig. 1A, lane 2) or resolved by 2D-SDS-PAGE (Fig. 2B, C). This band was not identified here; thus, it remains to be ascertained whether this is another subunit of the enzyme. However, among the identified subunits, it is remarked that regardless of the method used to resolve the native PdF₁F₀ complex, the 11-kDa protein was consistently bound to the F₁F₀ complexes

of *P. denitrificans*, indicating that this protein is a structural component of the ATP synthase of this bacterium.

The 11-kDa protein is the sixth subunit of the F₁-ATPase of *P. denitrificans*

The soluble F₁-ATPase of *P. denitrificans* was extracted in its functional form to determine whether the 11-kDa subunit is associated to the F₁ or F₀ sectors of the enzyme. The F₁ particle was extracted by two different methods; in one, F₁ was released by incubation in EDTA, relatively high salt concentrations, and alkaline pH. However, the yield of F₁ was low, and this

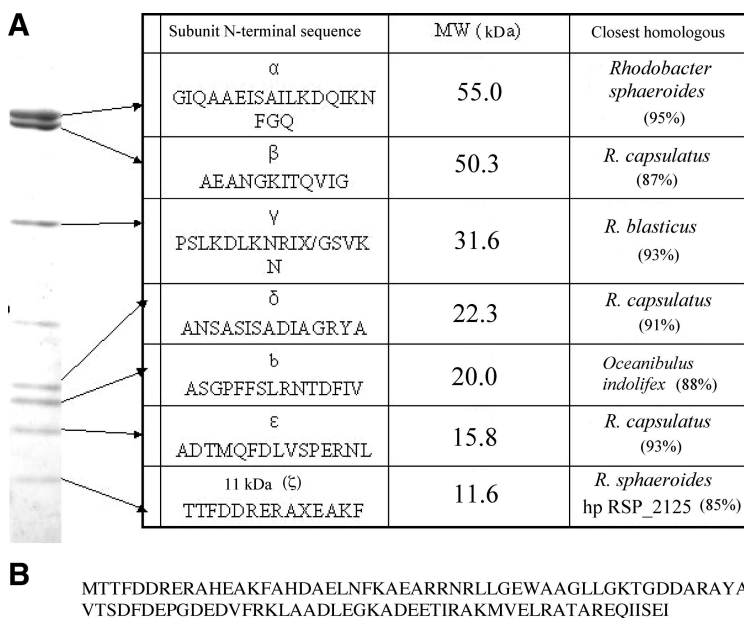


Figure 3. N-terminal sequences of subunits present in the purified F₁F₀ complex of *P. denitrificans*. A) Left: lane of SDS-PAGE showing subunits present in the isolated F₁F₀ complex of *P. denitrificans* after being transferred to a PVDF membrane and Coomassie stained. Right: arrows indicate the identity of each subunit as obtained by Edman sequencing from the PVDF membrane shown at left. Sequence of the first 12–20 residues of each subunit is indicated in the first column, except for the first Met. Second column shows predicted size of the mature proteins derived from their respective gene sequence, according to the ProtParam software at the ExPasy online facility. Third column shows the closest relative proteins found in BLAST analyses, including the percentage of identity of the indicated species with *P. denitrificans*; closest homologous subunits are found in *R. sphaeroides* and related α -proteobacteria. The 11th residue, indicated as X in the 11-kDa protein, was not resolved by Edman sequence, but it is a His residue, according to the gene sequence. B) Complete primary structure of the 11-kDa protein after

finding the corresponding gene and predicted protein (DUF1476) in the *P. denitrificans* genome database using the N-terminal sequence obtained in A; initial Met residue is included. Sequence was confirmed by direct DNA sequencing after PCR amplification and cloning of the 11-kDa protein, as described in Materials and Methods. Protein sequence shows no significant conserved domains with the IF₁ family; rather, the closest homologue is a hypothetical protein found in *R. sphaeroides*, indicated as hp RSP_2125. See text for further details.

was increased by sonication as used for the mitochondrial enzyme (33) and for other F_1 -ATPases from rhodobacteraceal sources (34). After releasing the F_1 particle from SBPs, the soluble extract was subjected to two consecutive anion exchange (DEAE-Sepharose) and gel filtration (Sephacryl S-300) chromatographic columns, followed by a discontinuous glycerol gradient, as described above for the PdF_1F_O complex. The F_1 yield was 7.6% of the total amount of protein in the soluble extract. The specific activity of the PdF_1 -ATPase measured in the presence of sulfite increased from 0.21 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ in the soluble extract to 4.83 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ in the final PdF_1 preparation after the glycerol gradient. This activity is 23-fold higher than that of the initial extract; but nonetheless, alternative methods were assessed in order to ascertain whether the final specific PdF_1 -ATPase activity could be further increased. In parallel, we were interested in removing some impurities that were observed above and below the α/β subunits in SDS-PAGE (see Fig. 1A, lane 1). Therefore, we assayed the chloroform extraction method in a similar fashion to that used to extract the rat liver (35) and *Rhodospirillum rubrum* (36) F_1 -ATPases from inverted membrane vesicles. The extraction protocol consisted in mixing the membranes and chloroform, a low-spin centrifugation to separate the aqueous from the organic phases and recovery of the F_1 extract from the former. Subsequently, the enzyme was further purified by using Sepharose-DEAH as affinity chromatography (33). This resin binds the mitochondrial F_1 and F_1F_O complexes through the coupled diethylaminoethyl arm, but it does not bind the *E. coli* F_1 -ATPase; thus, the efficient binding of the PdF_1 -ATPase to this resin suggests that there may be a similarity of the *P. denitrificans* F_1 particle and the mitochondrial F_1 -ATPase at the binding site of the DEAH moiety, which presumably lies at the catalytic site of β subunits (33). The enzyme was eluted from Sepharose-DEAH by a salt gradient and afterward desalted or concentrated in Amicon filters and loaded into Superdex-200 chromatography. The purity of the enzyme recovered from the chloroform extraction was significantly improved, essentially as a consequence of the removal of contaminant proteins that were present in the sonic extraction and DEAE/Sephacryl method (Fig. 1A); the preparation obtained with chloroform extraction was $\sim 95\%$ pure as judged by densitometry of Coomassie-stained SDS-PAGE (see Fig. 1B), the impurities of ~ 80 and 150 kDa found in the sonic-extraction method (Fig. 1A, lane 1) were totally removed in the chloroform extracted PdF_1 preparation (Fig. 1B) and in the PdF_1F_O preparations obtained (Fig. 1, lane 2). Noticeably, the specific activity of the final PdF_1 -ATPase preparation was 20–40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, a value that was about a 10-fold higher than that of the sonically extracted PdF_1 -ATPase (see Table 1, last column). As observed for the F_1F_O complex (Figs. 1A and 2B, C), regardless of the extraction method used to obtain the soluble F_1 -ATPase, the 11-kDa protein was present in all preparations of the soluble F_1 -ATPase (Fig. 1A, B). It was also found that

the ϵ and 11-kDa subunits detached partially from the soluble F_1 particle after purification: densitometry analyses showed that the band intensity ratios ϵ/δ and 11 kDa/ δ were 1.1 and 0.75 in the purified F_1F_O complex (Fig. 1A, lane 2). These ratios can be taken as the highest possibly attained, assuming minimal subunit detachment in the native PdF_1F_O complex. This ratio decreased to 0.84 (ϵ/δ) and 0.71 (11 kDa/ δ) in the sonically extracted PdF_1 (Fig. 1A, lane 1) and to 0.62 and 0.59 in the chloroform-extracted PdF_1 (Fig. 1B).

Regardless of the method used to purify the PdF_1 -ATPase, a first increase in total activity was observed after elution from the first chromatography step (Table 1, Total Activity column), this activity declined at the end but attained a larger percent total activity than that obtained from protein yield (Table 1, Total Protein column). For instance, the protein yield of purified PdF_1 was either 7.2 or 11.4% from the initial F_1 extract (Table 1, first column); however, the total activities finally recovered were 170 or 55%, respectively (Table 1, middle column). This evidenced a larger activation in the course of purification of the PdF_1 -ATPase (Table 1, lower rows) than that observed for the isolated PdF_1F_O complex (Table 1, upper rows). Bacterial F_1 -ATPase activation by dissociation of the ϵ subunit is a well-known observation (37). Therefore, partial release of ϵ and/or 11-kDa subunits can be related to the expression of the high-ATPase turnovers obtained in the presence of sulfite during the purification process and in the final chloroform-extracted PdF_1 preparation. Thus, the following reconstitution experiments were performed to ascertain whether ϵ and/or the 11-kDa protein controlled the ATPase turnover of the F_1F_O and F_1 -ATPase complexes of *P. denitrificans*.

The 11-kDa subunit is an intrinsic inhibitory subunit of the F_1F_O -ATPase of *P. denitrificans*

BLAST analyses using the 14 N-terminal residues of the 11-kDa protein obtained by Edman degradation (Fig. 3A) showed that it has 100% identity to a hypothetical protein of unknown function in *P. denitrificans* identified as the DUF1476 gene product. The same gene was also present as a family of hypothetical proteins in several α -proteobacteria, including *Rhodobacter sphaeroides* (Fig. 3A). The complete sequence of this protein in *P. denitrificans* is shown in Fig. 3B. Direct DNA sequencing of the cloned gene confirmed this sequence. Multiple alignment of the whole 11-kDa protein with 12 sequences of IF_1 proteins ranging from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to human IF_1 using Clustal-W revealed no conserved regions of the IF_1 family with this protein (not shown). However, alignment of the first 14 N-terminal residues of the 11-kDa protein (see Fig. 3B) with the IF_1 family showed some similarity with the inhibitory domain of the IF_1 protein (not shown). Regardless of these differences between the 11-kDa subunit and the mitochondrial IF_1 protein, and given the tight control of the ATPase turnover of the *P. denitrificans* ATP synthase, we hypothesized that

the 11-kDa protein controls the ATPase activity of the F_1F_O complex. Therefore, we assayed the putative inhibitory role of this protein in *P. denitrificans* by cloning, overexpressing, and purifying the 11-kDa protein from *E. coli* (Fig. 4, inset). After reconstituting an excess of the 11-kDa protein into SBPs, we indeed observed a clear inhibitory effect that induced a 75–80% inhibition of activity but leaving a residual functioning. It is possible that the insensitive ATPases were in outside-in vesicles or F_1 particles that were unable to bind the 11-kDa protein (Fig. 4).

In a parallel experiment, we also added the recombinant ϵ subunit that was cloned from *P. denitrificans* and overexpressed in *E. coli* (Fig. 4, inset). The ϵ subunit was unable to inhibit the PdF_1F_O -ATPase in SBPs (Fig. 4); only when the 11-kDa and ϵ subunits were reconstituted together, the ATPase activity was inhibited to the same extent as with the 11-kDa subunit alone. Similar results were obtained with soluble F_1 -ATPase in conditions in which ϵ and 11-kDa subunits were partially detached (Fig. 1 and Table 1). To confirm that the recombinant subunits actually bind to our F_1 preparation, the ϵ and ζ subunits were reconstituted in a 10- and 20-fold molar excess, respectively, into the isolated PdF_1 -ATPase lacking most of both subunits; afterward, 2D-SDS-PAGE after BN-PAGE or gel filtration through Superdex-200 was carried out. A negative control was included in which the PdF_1 was mixed with blank reconstitution buffer and resulted in removal of most of the ϵ and ζ subunits after BN-PAGE or gel

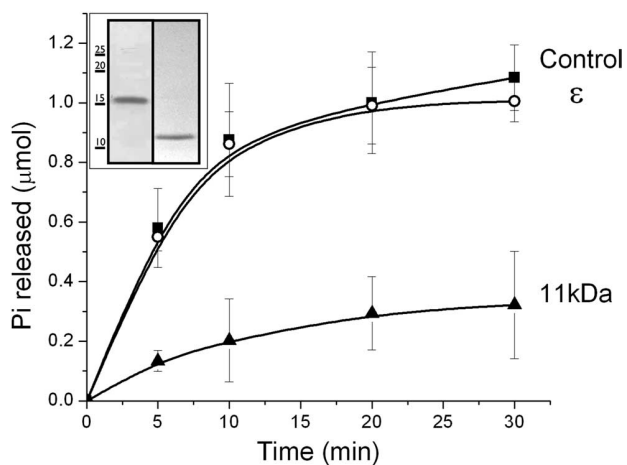


Figure 4. Effect of the recombinant ϵ and 11-kDa subunits on the F_1F_O -ATPase of *P. denitrificans* SBPs. *P. denitrificans* SBPs (500 μ g) were incubated with blank buffer (■), 20 μ g of the 11-kDa protein (▲) or 40 μ g of the ϵ subunit (○). Reaction started with 5 mM of MgATP, and an aliquot of 100 μ l was removed and arrested by adding 6% of trichloroacetic acid at 0, 5, 10, 20, or 30 min after the reaction was initiated. ATPase activity was calculated from the amount of P_i released from ATP by the PdF_1 (see Materials and Methods). Data shown are averages \pm SD from 3 independent determinations. If the ϵ and 11-kDa subunits are reconstituted together, the data points overlap with those obtained with the 11-kDa subunit alone (not shown for clarity). Inset: SDS-PAGE resolving the purified ϵ (left) and 11-kDa or ζ (right) recombinant subunits. Both subunits were purified by >95%.

filtration (Fig. 5, inset). In contrast, gel filtration after reconstitution of subunits yielded a preparation that recovered significant amounts of bound ϵ and ζ subunits (Fig. 5, inset A, lane 2). Remarkably, reconstitution of the ϵ subunit alone did not inhibit the soluble F_1 -ATPase, although it was bound to PdF_1 , as confirmed by increase of the ϵ band intensity resolved by 2D-SDS-PAGE after BN-PAGE (Fig. 5, inset B). In contrast to the inhibitory activity of ϵ in other bacterial F_1 -ATPases, the $Pd\epsilon$ subunit induced a modest but reproducible recovery of higher ATPase turnovers (Fig. 5). On the other hand, reconstitution of the ζ subunit alone induced a partial inhibition of the soluble PdF_1 -ATPase, but reconstitution of ζ together with ϵ produced a total inhibition of the sulfite-activated PdF_1 -ATPase activity (Fig. 5). This indicates that ϵ does not inhibit the PdF_1 -ATPase by itself, but it promotes the proper and productive binding of the ζ subunit to inhibit the PdF_1 -ATPase turnover. Thus, the 11-kDa protein of *P. denitrificans* acquires a major relevance as a inhibitory mechanism complementing or substituting the inhibitory role of the ϵ subunit exerted in most of the other bacterial F_1 -ATPases (for reviews, see refs. 10, 11).

The effect of the recombinant 11-kDa protein on the rate of ATP synthesis carried out by the PdF_1F_O complex in SBPs was assayed. The venturicidin-sensitive steady state ATP synthesis rate was not modified by reconstituting 0.5–10.0 μ g of 11-kDa protein/50 μ g SBPs (660 ± 70 vs. 600 ± 26 nmol/min/mg protein in control SBPs and after reconstitution, respectively; average of 3 independent experiments). This lack of inhibition of the steady-state ATP synthesis in energized SBPs is in accordance with the activation of the *P. denitrificans* F_1F_O complex by the establishment of the proton motive force (17). However, the 11-kDa subunit seems to delay the pre-steady-state lag phase that precedes the full activation of the enzyme (unpublished results). The average rate of ATP synthesis obtained with different SBP preparations was 1.0 μ mol/min/mg; this is \sim 5-fold faster than the rates obtained with *E. coli* and bovine inside-out vesicles. Estimation of the actual turnover of the PdF_1F_O complex will require determination of the relative F_1 or F_1F_O content of SBPs as reported, for instance, for the EcF_1F_O complex (38). Therefore, ongoing studies are being conducted to determine whether the high-ATP synthase rates exhibited by *P. denitrificans* SBPs result from a high turnover rate or from of a relatively high PdF_1F_O content in SBPs. The latter would be in concordance with the high enrichment of the PdF_1F_O complex observed after solubilization of SBPs (Fig. 2A).

It is also noted that another essentially unidirectional ATP synthase has been described in thermoalkaliphillic bacterium *Bacillus* sp. TA2.A1, (39); this enzyme has a 10-fold slower forward rate than the ATP synthase of *P. denitrificans*, and besides being controlled by the ϵ inhibitory subunit (12), unique salt bridges at the γ/β interface work as a ratchet that induces a rotation preferentially directed to ATP synthesis (40). Thus, in the F_1F_O -ATPase of *P. denitrificans*, its inhibitory control

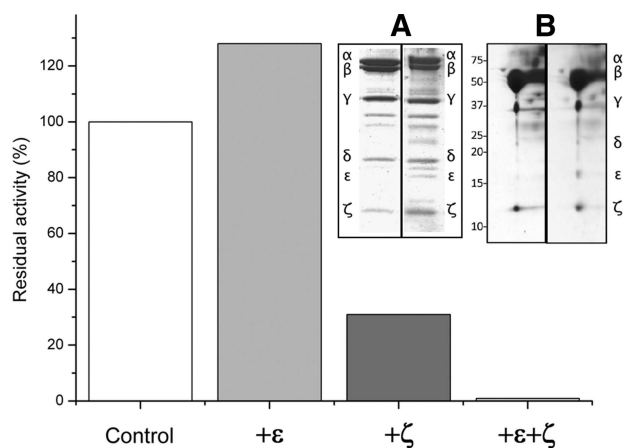


Figure 5. Reconstitution of recombinant ϵ and ζ subunits into isolated PdF₁-ATPase, 2D-BN-SDS-PAGE, gel filtration, and effect on ATPase activity. Isolated PdF₁-ATPase (0.5 μ M) was preincubated for 30 min with blank buffer (control and inset, lane 1) or with the 11-kDa (4.5 μ M) and/or ϵ (10 μ M) subunits, either each subunit added separately or both together, as indicated, in a final volume of 100 μ l or reconstitution buffer (250 mM sucrose and 20 mM Tris-HCl, pH 8.0). After preincubation, an aliquot was withdrawn from each sample to measure the PdF₁-ATPase activity as in Fig. 4, and the activity from two separate determinations was averaged and reported; 100% of control activity corresponded to 20.8 μ mol/min/mg. Deviation in ATPase values was <10%. Inset A: gel filtration through Superdex-200 was carried out after preincubation of PdF₁-ATPase with both recombinant subunits (right lane) or after mixing the PdF₁ with blank buffer (left lane). Gel filtration removed most of the ϵ and ζ subunits from the control PdF₁ (left lane); it also showed the recovery of significant amounts of ϵ and ζ subunits into the PdF₁-ATPase. F₁-ATPase subunits are indicated; other bands appearing after reconstitution are impurities carried with recombinant subunits. Inset B: SDS-PAGE after BN-PAGE carried out with 10 μ g of PdF₁ reconstituted with equimolar ϵ (right lane) or with blank buffer (left lane).

mechanism acquired a novel subunit instead of simply modifying the core subunits of the F₁-ATPase.

The 11-kDa F₁F₀-ATPase inhibitor protein in other α -proteobacteria related to *P. denitrificans*

Finally, we examined the distribution of this novel 11-kDa subunit of *P. denitrificans* as an F₁-ATPase inhibitor in other α -proteobacteria, as suggested by BLAST analyses. Polyclonal antibodies against the recombinant 11-kDa protein were raised in a rabbit, and the antisera that were obtained had a titration of 1:10,000, recognizing a single band in SBPs and isolated F₁ and F₁F₀ complexes of *P. denitrificans* by Western blot analysis (not shown). Chromatophores from the closely related α -proteobacteria *R. sphaeroides* were prepared as before (41), the chromatophores and the *P. denitrificans* SBPs were extracted with digitonin, and the soluble extracts were analyzed by BN-PAGE followed by 2D-SDS-PAGE. The 2D-SDS-PAGE was transferred to PVDF membranes and used for Western blot analysis against the 11-kDa antibody in parallel to an α -subunit blotting

using an antibody raised originally against the *E. coli* ATP synthase α -subunit. The F₁F₀ complex of *R. sphaeroides* showed the 11-kDa protein aligned vertically with the α -subunit and therefore associated with the ATP synthase in similar amounts to those found in *P. denitrificans* (Fig. 6). This was observed by mixing both antibodies (α and 11 kDa) as in Fig. 6, or by first carrying out the anti-11-kDa Western blot, followed by antibody stripping and blotting again against the α -antibody (not shown).

It is noted that previously reported gels of the soluble F₁-ATPase from *R. sphaeroides* apparently did not show the 11-kDa protein (34). Because in that study the SDS-PAGE gels were overrun or loaded with very low amounts of F₁-ATPase protein, the 11-kDa protein either could run off the gels or was present in very low amounts (34). The presence of this 11-kDa protein in the *R. sphaeroides* F₁F₀ complex was not unexpected, since it is one of the closest α -proteobacteria related to *P. denitrificans*, as judged by alignment of 5S rRNA (42) and respiratory chain subunit sequences (1). The presence of a family of homologous hypothetical proteins, as shown by BLAST, strongly suggests that the 11-kDa F₁-ATPase inhibitor of *P. denitrificans* works as such in other α -proteobacteria. In support of this, a putative sixth F₁ inhibitory subunit of low molecular weight was detected in a crude F₁-ATPase extract obtained from *R. rubrum* chromatophores (43); however, such inhibitory protein was not further isolated, sequenced, or characterized. Ongoing proteomic analyses in our laboratory are determining the putative wider expression and association of the 11-kDa protein in the ATP synthase complexes of other α -proteobacteria. So far, these results show that the 11-kDa inhibitor is not exclusive of the *P. denitrificans* ATP synthase, but it is also associated to the F₁F₀ complex of *R. sphaeroides*, one of the closest α -proteobacterium related to *P. denitrificans*.

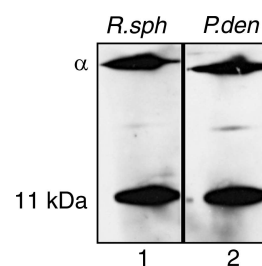


Figure 6. Immunoblot of *P. denitrificans* SBPs and *R. sphaeroides* chromatophores showing the presence of 11-kDa subunit associated with the F₁F₀ complexes from both species. SBPs and chromatophores were extracted with digitonin (2 g/g protein) and subjected to 1D-BN-PAGE and 2D-SDS-PAGE as in Fig. 2; afterward, each 2D gel, one for *R. sphaeroides* (lane 1), and another for *P. denitrificans* (lane 2), was electrotransferred to PVDF membranes and immunoblotted against a monoclonal anti- α subunit and another polyclonal raised against the 11-kDa subunit. The only two bands resolved (α and 11 kDa) were found aligned vertically as shown, indicating their association in complex V of each species.

The 11-kDa protein as the first regulatory F₁F_O subunit incorporated from a gene external to the ATP operon

The gene of this 11-kDa protein is external to the two separate operons that coordinate the expression of F_O and F₁ subunits in *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, and *R. rubrum* (see genome sequence links indicated in Materials and Methods and refs. 44, 45). Thus, the 11-kDa protein could represent the first event of incorporation of a regulatory subunit whose gene is external to the ATP operon of complex V in α -proteobacteria, *i.e.*, previous to the endosymbiotic event that contributed to the origin of mitochondria. Thus, genes external to the ATP operon had to be recruited as F₁F_O control mechanisms in α -proteobacteria because no further regulatory genes have been integrated in the bacterial ATP operon. Only two nonstructural genes in addition to the 8 core F₁F_O subunits have been found in bacterial ATP operons: the *uncI* gene that encodes an assembly factor of F_O (46), and the *wf6* gene of *Rhodobacter blasticus* (47, 48), which encodes a protein called majastridin, a member of the glycosyltransferases family. This protein is present in the cytosolic fraction of *P. denitrificans*, but it is not associated with the PdF₁-ATPase (see ref. 47 and this work). In summary, the 11-kDa protein of *P. denitrificans* described here emerges as the first regulatory ATP synthase subunit external to the ATP operon. The sequence of the 11-kDa protein does not have a significant similarity to that of the mitochondrial ATP synthase inhibitor protein IF₁; therefore, it does not seem to be its evolutive predecessor. However, this protein may preserve structural features similar to those of the mitochondrial IF₁; alternatively, it may also complement the inhibitory function of the ϵ subunit, which in this bacterium does not inhibit the ATPase activity as it does in most of other bacterial F₁-ATPases. On the other hand, the 11-kDa protein may have a completely novel mechanism to control the turnover of the F₁F_O nanomotor to rotate preferably in the ATP synthase direction. In the course of discerning the mechanism of action of this protein, we suggest naming it as the ζ subunit of the ATP synthase, to distinguish it from other inhibitory subunits in bacterial, mitochondrial, and chloroplast ATP synthases. FJ

The experimental work of Alicia Castillo-Martínez and Fermín Pacheco-Moisés in the initial part of this project is gratefully acknowledged. The excellent assistance of Paulina Cortés-Hernández in the preparation of the polyclonal antibody against the 11-kDa subunit is acknowledged. Monoclonal antibodies against *E. coli* F₁-ATPase subunits (subunit α) were kindly given by Prof. Roderick A. Capaldi (University of Oregon, Eugene, OR, USA). The supply of the PD1222 strain of *P. denitrificans* was provided by Juan Carlos Estrada-Mora (director of the Collection of Microbial Cultures, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico). This strain is also known as CDBB-B-912, according to the registration in the World Federation for Culture Collection. The collaborative efforts of Mario F. Fuentes-Iniestra [head librarian, Instituto Nacional de Cardiología (INC), Mexico City, Mexico], in literature

acquisition and submission of data are also acknowledged. The critical reading and excellent suggestions for the manuscript of Prof. Armando Gómez-Puyou are gratefully acknowledged. This work was supported by two consecutive research projects from the National Research Council of México (CONACyT; projects J34744-N and V43814-M) and by a recent grant from UNAM under the program Dirección General de Asuntos del Personal Académico–Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) 2009, (project IN213809-3).

REFERENCES

1. Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476–1481
2. John, P., and Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* **254**, 495–498
3. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660–669
4. Yagi, T. (1986) Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 302–311
5. Pennoyer, J. D., Ohnishi, T., and Trumppower, B. L. (1988) Purification and properties of succinate-ubiquinone oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **935**, 195–207
6. Berry, E. A., and Trumppower, B. L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. *J. Biol. Chem.* **260**, 2458–2467
7. Perez, J. A., and Ferguson, S. J. (1990) Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. I. Mechanism of ATP synthesis at the active site(s) of F₀F₁-ATPase. *Biochemistry* **29**, 10503–10518
8. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2003) Proton-translocating ATP-synthase of *Paracoccus denitrificans*: ATP-hydrolytic activity. *Biochemistry (Mosc.)* **68**, 1101–1108
9. Pacheco-Moisés, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) Sulfite inhibits the F₁F₀-ATP synthase and activates the F₁F₀-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 269–278
10. Feniouk, B. A., and Yoshida, M. (2008) Regulatory mechanisms of proton-translocating F(O)F (1)-ATP synthase. *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 279–308
11. García-Trejo, J. J., and Morales-Ríos, E. (2008) Regulation of the F₁F₀-ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *J. Biol. Phys.* **39**, 197–212
12. Keis, S., Stocker, A., Dimroth, P., and Cook, G. M. (2006) Inhibition of ATP hydrolysis by thermoalkaliphilic F₁F₀-ATP synthase is controlled by the C terminus of the epsilon subunit. *J. Bacteriol.* **188**, 3796–3804
13. Masaïke, T., Suzuki, T., Tsunoda, S. P., Konno, H., and Yoshida, M. (2006) Probing conformations of the beta subunit of F₀F₁-ATP synthase in catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 800–807
14. Iino, R., Hasegawa, R., Tabata, K. V., and Noji, H. (2009) Mechanism of inhibition by C-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of *Escherichia coli* FoF₁-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **284**, 17457–17464
15. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF₁) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 433–443
16. Bald, D., Noji, H., Yoshida, M., Hirono-Hara, Y., and Hisabori, T. (2001) Redox regulation of the rotation of F(1)-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **276**, 39505–39507
17. Pacheco-Moisés, F., Garcia, J. J., Rodriguez-Zavala, J. S., and Moreno-Sanchez, R. (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATPase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 993–1000
18. Harris, D. A., John, P., and Radda, G. K. (1977) Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase, and their role in

- oxidative phosphorylation. I. The *Paracoccus denitrificans* system. *Biochim. Biophys. Acta* **459**, 546–559
19. De Vries, G. E., Harms, N., Hoogendijk, J., and Stouthamer, A. H. (1989) Isolation and characterization of *Paracoccus denitrificans* mutants with increased conjugation frequencies and pleiotropic loss of a (nGATCn) DNA-modifying property. *Arch. Microbiol.* **152**, 52–57
 20. Fiske, C. H., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375–400
 21. Cortes-Hernandez, P., Vazquez-Memije, M. E., and Garcia, J. J. (2007) ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1F0-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization. *J. Biol. Chem.* **282**, 1051–1058
 22. Garcia, J. J., and Capaldi, R. A. (1998) Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in *Escherichia coli* F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 15940–15945
 23. 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
 24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
 25. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356
 26. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368–379
 27. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
 28. 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
 29. Schagger, H. (1995) Quantification of oxidative phosphorylation enzymes after blue native electrophoresis and two-dimensional resolution: normal complex I protein amounts in Parkinson's disease conflict with reduced catalytic activities. *Electrophoresis* **16**, 763–770
 30. Pringle, M. J., and Taber, M. (1985) Fluorescent analogues of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide as structural probes of the bovine mitochondrial proton channel. *Biochemistry* **24**, 7366–7371
 31. Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S. W., Ghosh, S. S., Garcia, J. J., Capaldi, R. A., and Marusich, M. F. (2002) A functionally active human F1F0 ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies. *J. Biol. Chem.* **277**, 33906–33912
 32. Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1555**, 154–159
 33. Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1977) A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 82–86
 34. Muller, H., Neufang, H., and Knobloch, K. (1982) Purification and properties of the coupling-factor ATPases F1 from *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* **127**, 559–566
 35. Williams, N., and Pedersen, P. L. (1986) Rapid purification of F1-ATPase from rat liver mitochondria using a modified chloroform extraction procedure coupled to high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **126**, 477–484
 36. Norling, B., Strid, A., and Nyren, P. (1988) Conversion of coupling factor 1 of *Rhodospirillum rubrum* from a Ca²⁺-ATPase into a Mg²⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **935**, 123–129
 37. 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
 38. Etzold, C., Deckers-Hebestreit, G., and Altendorf, K. (1997) Turnover number of *Escherichia coli* F0F1 ATP synthase for ATP synthesis in membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **243**, 336–343
 39. Cook, G. M., Keis, S., Morgan, H. W., von Ballmoos, C., Matthey, U., Kaim, G., and Dimroth, P. (2003) Purification and biochemical characterization of the F1F0-ATP synthase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2.A1. *J. Bacteriol.* **185**, 4442–4449
 40. Stocker, A., Keis, S., Vonck, J., Cook, G. M., and Dimroth, P. (2007) The structural basis for unidirectional rotation of thermoalkaliphilic F1-ATPase. *Structure* **15**, 904–914
 41. Sosa, A., and Celis, H. (1995) H⁺/PPi stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 421–427
 42. Ohkubo, S., Iwasaki, H., Hori, H., and Osawa, S. (1986) Evolutionary relationship of denitrifying bacteria as deduced from 5S rRNA sequences. *J. Biochem.* **100**, 1261–1267
 43. Johansson, B. C., and Baltscheffsky, M. (1975) On the subunit composition of the coupling factor (ATPase) from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* **53**, 221–224
 44. Falk, G., and Walker, J. E. (1988) DNA sequence of a gene cluster coding for subunits of the F0 membrane sector of ATP synthase in *Rhodospirillum rubrum*. Support for modular evolution of the F1 and F0 sectors. *Biochem. J.* **254**, 109–122
 45. Falk, G., Hampe, A., and Walker, J. E. (1985) Nucleotide sequence of the *Rhodospirillum rubrum* atp operon. *Biochem. J.* **228**, 391–407
 46. Ozaki, Y., Suzuki, T., Kuruma, Y., Ueda, T., and Yoshida, M. (2008) UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of FoF1-ATP synthase in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 663–666
 47. Brosche, M., Kalbina, I., Arnfelt, M., Benito, G., Karlsson, B. G., and Strid, A. (1998) Occurrence, overexpression and partial purification of the protein (majastridin) corresponding to the URF6 gene of the *Rhodobacter blasticus* atp operon. *Eur. J. Biochem.* **255**, 87–92
 48. Enroth, C., and Strid, A. (2008) Crystal structure of a protein, structurally related to glycosyltransferases, encoded in the *Rhodobacter blasticus* atp operon. *Biochim. Biophys. Acta.* **1784**, 379–384

Received for publication May 26, 2009.
Accepted for publication September 10, 2009.

Regulation of the F_1F_0 -ATP Synthase Rotary Nanomotor in its Monomeric-Bacterial and Dimeric-Mitochondrial Forms

José J. García-Trejo · Edgar Morales-Ríos

Received: 21 December 2007 / Accepted: 8 September 2008
© Springer Science + Business Media B.V. 2008

Abstract The F_1F_0 -adenosine triphosphate (ATP) synthase rotational motor synthesizes most of the ATP required for living from adenosine diphosphate, P_i , and a proton electrochemical gradient across energy-transducing membranes of bacteria, chloroplasts, and mitochondria. However, as a reversible nanomotor, it also hydrolyzes ATP during de-energized conditions in all energy-transducing systems. Thus, different subunits and mechanisms have emerged in nature to control the intrinsic rotation of the enzyme to favor the ATP synthase activity over its opposite and commonly wasteful ATPase turnover. Recent advances in the structural analysis of the bacterial and mitochondrial ATP synthases are summarized to review the distribution and mechanism of the subunits that are part of the central rotor and regulate its gyration. In eubacteria, the ϵ subunit works as a ratchet to favor the rotation of the central stalk in the ATP synthase direction by extending and contracting two α -helices of its C-terminal side and also by binding ATP with low affinity in thermophilic bacteria. On the other hand, in bovine heart mitochondria, the so-called inhibitor protein (IF_1) interferes with the intrinsic rotational mechanism of the central γ subunit and with the opening and closing of the catalytic β -subunits to inhibit its ATPase activity. Besides its inhibitory role, the IF_1 protein also promotes the dimerization of the bovine and rat mitochondrial enzymes, albeit it is not essential for dimerization of the yeast F_1F_0 mitochondrial complex. High-resolution electron microscopy of the dimeric enzyme in its bovine and yeast forms shows a conical shape that is compatible with the role of the ATP synthase dimer in the formation of tubular the cristae membrane of mitochondria after further oligomerization. Dimerization of the mitochondrial ATP synthase diminishes the rotational drag of the central rotor that would decrease the coupling efficiency between rotation of the central stalk and ATP synthesis taking place at the F_1 portion. In addition, F_1F_0 dimerization and its further oligomerization also increase the stability of the enzyme to natural or experimentally induced destabilizing conditions.

J. J. García-Trejo (✉) · E. Morales-Ríos
Facultad de Química, Departamento de Biología, Lab. F-117,
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, México
e-mail: jjgartre@unam.mx

Keywords F_1F_0 ATPase • F_1F_0 ATP synthase • IF_1 • Inhibitor protein • Epsilon • Dimeric • Rotation • Interface • Cristae • Regulation • F_1 ATPase

Abbreviations

EF_1 , EF_1F_0	<i>Escherichia coli</i> F_1 and F_1F_0 complexes
EM	electron microscopy
F_1F_0	the whole ATP synthase complex with its catalytic (F_1) and proton channel (F_0) parts
F_1F_0I	the whole ATP synthase containing its physiological inhibitor protein (IF_1)
IF_1	the intrinsic inhibitor protein of the mitochondrial ATP synthase
MF_1 , MF_1F_0	bovine heart mitochondrial F_1 and F_1F_0 complexes, respectively
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy

1 Introduction

The mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) synthase is a ubiquitous motor enzyme that provides most of the cellular chemical energy in the form of ATP to fuel all kinds of work in biological nature. This motor functions as a coupling factor between the condensation of adenosine diphosphate (ADP) and P_i that takes place at its catalytic F_1 -ATPase portion and proton flow through the transmembranous F_0 -proton channel that consumes energy from electrochemical proton gradients. According to the well-established chemiosmotic theory, this proton gradient is established by oxidative or photosynthetic electron transfer chains of the plasma membrane of bacteria, the inner mitochondrial membrane, and the thylakoid membranes of chloroplasts. Because of thermodynamic and mechanical reversibility, the F_1F_0 -ATP synthase becomes a proton-pumping F_1F_0 -ATPase under conditions of partial or total collapse of the proton gradient; for instance, during anoxia in bacteria where it works as a primary pump to drive secondary transporters, during ischemia in mitochondria, or under dark conditions in chloroplasts. In all these systems, different subunit structures control gyration of the central stalk by favoring rotation in the ATP synthase turnover direction. Chloroplast ATP synthase possesses a unique disulfide bridge in the γ subunit that controls rotation of the central stalk; however, only the structures of the bacterial and the bovine enzymes are reviewed here.

Important new information such as the dimerization of the ATP synthase and the role of the inhibitor protein (IF_1) in this process are also reviewed and used to propose a model of the structure of the ATP synthase dimer that explains the inhibitory and dimerizing roles of IF_1 . This model also explains how dimerization of the ATP synthase may confer a higher stability and efficiency of the dimeric enzyme to synthesize ATP. This also sheds light on how F_1F_0 dimerization promotes formation of tubular cristae membrane structures in mitochondria after further polymerization.

2 Structure and Rotational Mechanism of the ATP Synthase

The catalytic part of the enzyme is a water-soluble portion (F_1) that can be released in vitro from the membrane, retaining its capacity to hydrolyze ATP (F_1 -ATPase) [1]. ATP synthesis occurs in the whole F_1F_0 when the energy derived from proton conduction through the F_0 membrane channel is combined with the nucleotide (Mg-ADP) and P_i binding energies

[2–5] to drive the release of newly synthesized ATP from each of the three alternating catalytic sites of F₁. The coupling between F₁ and F₀ is critical for efficient ATP synthesis to occur and major progress in the understanding of this coupling mechanism has been achieved. Several approaches at different laboratories showed that a central rotor actually gyrates relative to a stator that holds the catalytic subunits; this rotation induces the alternating binding, catalysis, and product release from three catalytic sites of F₁ (for reviews, see [5–9]). These studies also indicated that the γ subunit, together with ϵ and the ring of 9–15 c subunits of F₀, form the rotor in the central part of the enzyme. The more direct evidence demonstrating this rotational movement was the observation by fluorescence microscopy of rotation of a fluorescent actin filament attached to the γ , ϵ , or c subunits of immobilized F₁ and F₁F₀ complexes [10–13]. These experiments established that the rotor of the enzyme is formed by the central γ - ϵ -c_{9–15} domain. This core rotor–stator structure is preserved in bacterial and mitochondrial ATP synthases and is shown in Fig. 1 indicating the reversible rotational mechanism of the enzyme.

The rotary mechanism of the enzyme implies that, in the central stalk, the γ subunit (together with ϵ and c_{9–15} subunits) rotates relative to a stator where the catalytic α - β interfaces are held. Therefore, this stator must be somehow anchored to an F₀ subunit at the lipid bilayer. A peripheral second stalk was literally “invoked” and found by means of high-resolution electron microscopy studies [14, 15] and by cross-linking of α , δ , b,

Fig. 1 Rotor–stator subunit distribution in the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. Only the core subunits present in bacteria and mitochondria are shown for simplicity. Rotating subunits are shown in red (γ), orange (ϵ), and yellow (ring of c subunits) whereas static subunits are in dark blue (β), blue (α), and cyan (subunits a and b). The arrows indicate the reversible rotation of γ - ϵ -c subunits relative to α and β catalytic subunits of F₁ that takes place during ATP synthesis (“clockwise” or right direction) and hydrolysis (“counterclockwise” or left direction). Bidirectional proton flow at the c-ring–sub a interface occurs associated with the gyration of the rotor as indicated by the red arrow. The second-stalk structure is simplified as two cyan subunits (a and b) that work as stator to anchor the catalytic $\alpha_3\beta_3$ to the membranous a subunit. Image is generated in RasMol 2.6 from the mitochondrial F₁F₀ structure of *S. cerevisiae* (PDB code 1Q01) and edited as shown

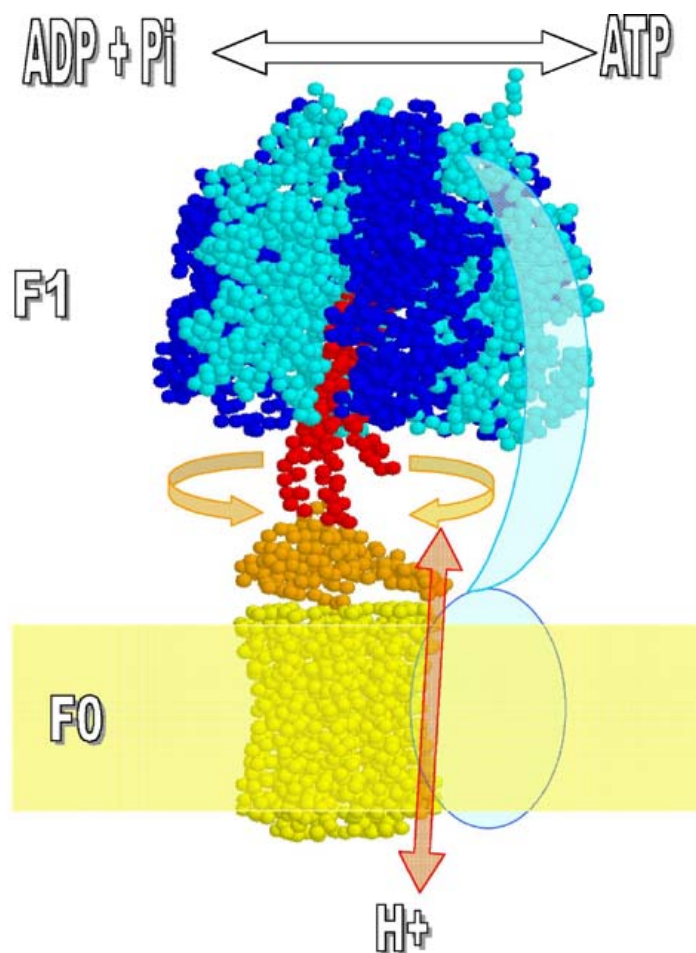


Table 1 Subunit composition of the *E. coli* and mitochondrial ATP synthases

	<i>E. coli</i> subunit	Bovine subunit	Yeast subunit
F ₁	α^3	α^3	α^3
	β^3	β^3	β^3
	γ^1	γ^1	γ^1
	δ^1	OSCP ¹	Sub 5 ¹
	ε^1	δ^1	δ^1
	–	ε^1	ε^1
F ₀	–	IF ₁ ¹	IF ₁ ¹
	A ¹	Sub. 6 ¹	Sub. 6 ¹
	B ²	b ¹	Sub 4 ¹
	C ^{9–15}	c ^{9–15}	Sub 9 ¹⁰
	–	d ¹	Sub 7 ¹
	–	e ¹	e ¹
	–	f ¹	f ¹
	–	g ¹	g ¹
	–	F6 ¹	h ¹
	–	A6L ¹	Sub 8 ¹

There are eight and 16 different subunits in the bacterial and bovine enzymes, respectively. Subunits are accommodated according to their corresponding homologs. For example, *E. coli* δ and ε correspond to bovine OSCP and δ , respectively. Corresponding subunit stoichiometries are indicated as superscripts. The enzyme from yeast (*S. cerevisiae*) contains at least three additional subunits, namely i, j, and k.

and *a* subunits along this peripheral second stalk [7]. The anchoring part of the second stalk with the α subunit of F₁ has been solved by nuclear magnetic resonance (NMR) for the *Escherichia coli* enzyme [16], whereas most of the structure of the second stalk of the bovine mitochondrial enzyme has been resolved by X-ray crystallography [17]. Thus, the whole picture of the simplest ATP synthase of *E. coli* involves a stator formed by (α - β)₃, δ , b₂, and *a* subunits and a central rotor formed by the γ - ε -c_{9–15} domain. This core rotor–stator structure of bacterial ATP synthase becomes more complex with about twice as many different subunits present in chloroplasts and mitochondria. Besides the core subunits and structure of the EF₁F₀ motor, there are six to eight additional or “supernumerary” subunits that are well described in mitochondrial yeast and bovine ATP synthases. These subunits are d, e, f, g, F6 (h in yeast), A6L (8 in yeast), the inhibitor protein (IF₁), and mitochondrial subunit ε which does not have a bacterial counterpart (see below and Table 1). Three additional F₀ proteins are also found in the yeast enzyme (see legend of Table 1). The roles of these additional subunits are related to regulation and oligomerization of the ATP synthase as will be described below.

3 The Central Stalk is Part of the ATP Synthase Rotor

Crystallographic studies have solved most of the central stalk structure in *E. coli* (EF₁) [18] and bovine mitochondrial (MF₁) F₁-ATPases [19–22]. The tertiary structure and orientation of the globular domain of the γ subunit is very similar in both species (Fig. 2), and it is in agreement with previous cross-linking data obtained with the enzyme from *E. coli*. However, the ε subunit of *E. coli* (bovine δ) was found far away from the cross-linking distance to the α or β subunits but closer to the F₀ subunit c in the crystals of the yeast [23] and bovine [20–22] enzymes. It was therefore unclear how ε could cross-link with α

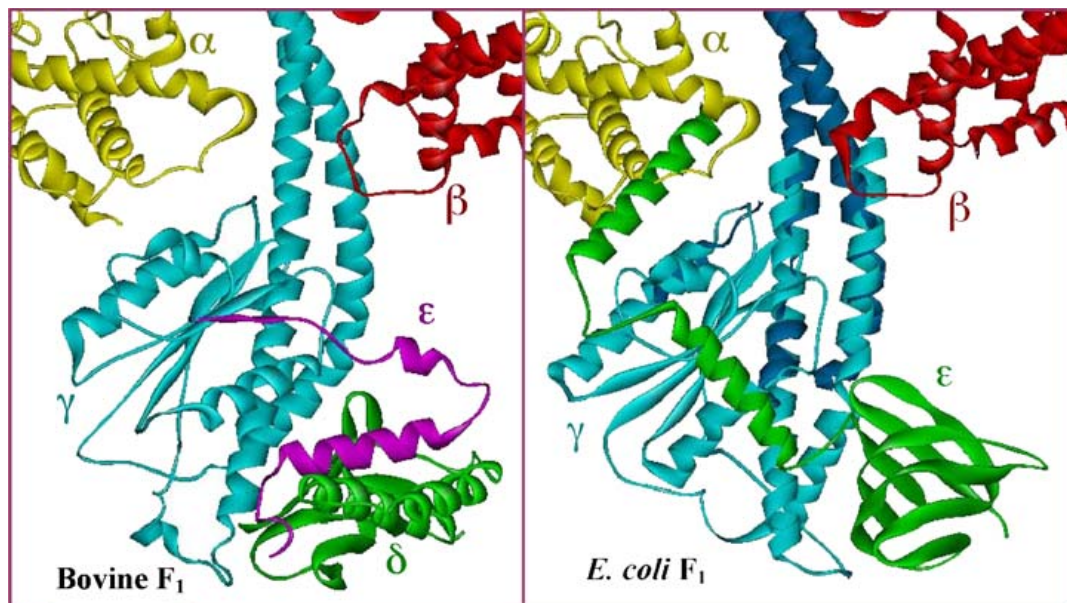


Fig. 2 Comparison of the bovine (*left*) and *E. coli* (*right*) F₁F₀-ATP synthases at the central stalk domain. Crystallographic structures of MF₁ and EF₁ central stalks are shown in the same orientation. Homologous subunits are shown in the same color, γ (*blue*), ϵ subunits (*green*). For clarity, only one α subunit (*red*) and one β subunit (*yellow*) are shown. The structure shown on the *right* is a composite of the *E. coli* γ - ϵ structure [18] and the bovine MF₁ structure [19], constructed by aligning segments of γ present in both structures. Segments of MF₁ γ subunit are shown in *darker blue*, and those of *E. coli* γ subunit are shown in *lighter blue*. This figure was modified from an original courtesy of Dr. Andrew J.W. Rodgers

or β subunits in the native enzyme as found before, until another X-Ray diffraction analysis was made with a soluble γ - ϵ complex from *E. coli* [18]. In this study, the structure of soluble ϵ was very different from the bovine δ subunit F₁. The soluble ϵ subunit associated with γ was found rotated in relation to the vertical axis of the central stalk and extending its two C-terminal helices toward the C-termini of α and β . This position placed the appropriate residues in cross-linking distance [18] (Fig. 2). The conclusion is therefore that ϵ experiences dramatic changes in conformation that are important for its role as an inhibitor of the ATPase activity of the enzyme, controlling the rate of rotation of the central stalk. Engineered cross-linking in the *E. coli* F₁F₀ complex entrapped these two conformations of the ϵ subunit [24]. Interestingly, when the C-terminus of ϵ is compacted as an antiparallel α -helix coil with its N-terminal β -sheet domain, the F₁F₀-ATPase activity is enhanced and the enzyme is coupled during ATP hydrolysis and synthesis. However, when the C-terminus of ϵ extends toward F₁ (as shown in Fig. 2), ATP hydrolysis is inhibited but ATP synthesis remains unaffected [24]. In agreement with this work, the structure of the γ - ϵ domain in the *E. coli* F₁-ATP synthase [25] was found very similar to that of the isolated subunits [18]. Furthermore, it has been found that the ratchet mechanism of ϵ can be regulated by ATP binding in some bacteria [9, 26]. When ATP is bound, the closed conformation is stabilized, thus favoring rotation of the central stalk in the ATPase direction; conversely, at low ATP concentrations, ϵ is unable to bind ATP, and therefore the extended conformation is favored, thus leaving the enzyme prone to rotate into the ATP synthase turnover. This model is supported with the recent crystal structure of the *Bacillus* PS3 subunit ϵ with ATP associated to the C-terminus of this subunit [27]. In summary, these studies show that ϵ works as an ATP sensor in bacteria that possess a novel ATP-binding motif in this subunit [26–29].

Besides the control of rotation described so far for the bacterial enzymes by the ϵ subunit, it is important to introduce a novel inhibitory 11-kDa protein that we recently found in the ATP synthase of the α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans* (Morales-Ríos et al. 2008, submitted). The ATP synthase from *P. denitrificans* has been only described functionally as the fastest ATP synthase and the slowest ATPase found to date [30]; however, it has never been isolated until we addressed this issue. This novel inhibitory 11-kDa protein is present in F_1 -ATPase and F_1F_0 -ATPase preparations obtained from *P. denitrificans* membranes, and it will likely add a novel control and inhibitory mechanism to the α -proteobacteria family where the open reading frame exists. Importantly, the ϵ subunit of this enzyme does not inhibit the ATPase activity of the F_1 -ATPase or F_1F_0 -ATPase complexes in *P. denitrificans* (Morales-Ríos et al. 2008, submitted). Thus, the 11-kDa protein will add a novel control mechanism to the ATP synthases, in addition to the classical inhibitory mechanisms of bacterial, chloroplast, and mitochondrial F_1F_0 complexes. Unidirectional functioning of ATP synthase turnover has been also described for another bacterial enzyme of the thermoalkaliphilic type, *Bacillus sp.* TA2.A1 [31]. However, instead of additional regulatory proteins, unique polar interactions at the rotor–stator interface of the F_1 subunits allow almost exclusively unidirectional rotation in the ATP synthase direction for this enzyme [31]. To our knowledge, only two other bacterial proteins have been found encoded in the *atp* operon in addition to the eight core subunits of bacterial F_1F_0 (α , β , γ , δ , ϵ , *a*, *b*, *c*); these two proteins are encoded by the *unc-I* and *urf-6* genes that correspond, respectively, to an assembly factor of the c-ring [32] and to mastastridin, a cytosolic protein nonassociated with the *Rhodospirillum blasticus* ATP synthase [33]. In contrast, the gene encoding the 11-kDa protein of *P. denitrificans* is located upstream to both *atp* operons (one for F_0 and another for F_1 subunits) already sequenced on chromosome II of *P. denitrificans* (see Morales-Ríos et al. 2008, submitted, and the following link: http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/parde/parde.home.htm). Therefore, it seems that the 11-kDa regulatory protein that we found in the F_1F_0 complex of *P. denitrificans* is one of the first, if not the first, supernumerary subunit added to bacterial ATP synthases as an exogenous gene of the *atp* operon (formerly known as the *unc* operon). This 11-kDa protein therefore emerged during α -proteobacterial evolution and previous to the endosymbiotic event from which mitochondria emerged.

4 Supernumerary Subunits and Their Role in the Regulation and Dimerization of the Mitochondrial ATP Synthase

Most of the supernumerary subunits in the mitochondrial enzyme correspond to membrane proteins associated with the F_0 proton channel. These additional subunits are d, e, f, g, F6, and A6L. Subunits d and F6 are part of the second stalk, and A6L is a membrane protein of F_0 that is essential for the assembly of subunit 6, the one that forms the proton-conducting interface with the c_{9-15} ring. On the other hand, the roles of some of these subunits were recently unveiled by studies in yeast showing that subunits e and g are needed to form F_1F_0 dimers in situ [34, 35]. However, an unexpected result was the finding that genetic removal of these e and g subunits deformed the inner mitochondrial membrane and the classical cristae transformed into concentric membrane layers inside enlarged mitochondria [35]. This demonstrated that dimerization of the ATP synthase is not an artifact of detergent extraction as suspected but a natural and important biological process that improves the ATP synthase activity and the stability of the enzyme. Thus, besides dimerizing to improve

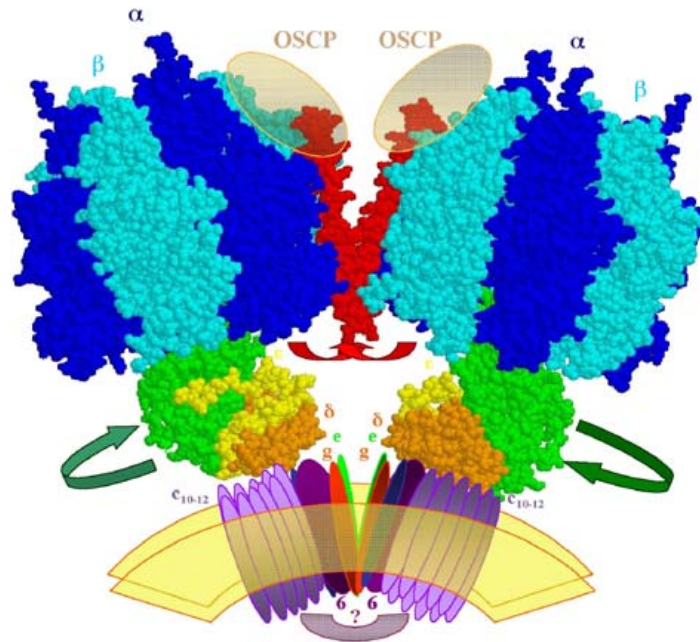


Fig. 4 Model of the dimeric-mitochondrial ATP synthase: possible localization of the IF₁ protein and its movements to allow rotation of the central stalk during ATP synthesis. The model depicts the overall shape of the dimeric ATP synthase molecule that we observed for the bovine mitochondrial enzyme [54]. The dimeric interface involves F₀ subunits (*e* and *g*) and two protein bridges, one at the F₀–F₀ side of unknown composition (*question mark*) and another at the F₁–F₁ interface where the second stalks (not shown for clarity) and the IF₁ protein (*red*) are likely to be located. The C-terminal side of the IF₁ molecule is assumed to cross the dimer interface and to stabilize the dimer by interacting with subunits OSCP [65] and possibly subunits of the second stalk. The N-terminal inhibitory domain that in the absence of the proton gradient blocks rotation of the central stalk by entering at an α – β – γ interface (Fig. 2) is removed from this position and exposed into the media after establishment of a transmembrane proton gradient, thus allowing rotation of the central stalk during ATP synthesis. The F₁ structures were constructed from the bovine F₁-DCCD coordinates available (PDF code 1E79)

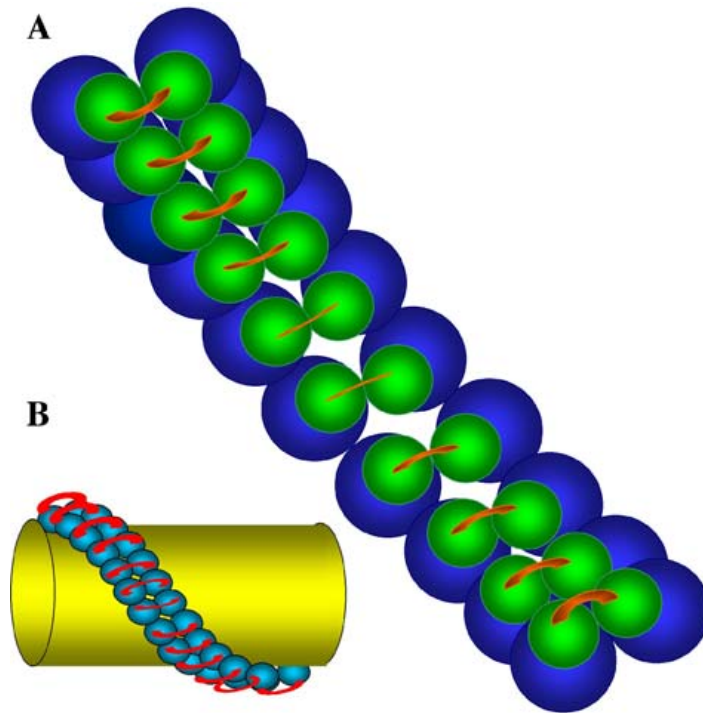
oligomycin sensitivity conferring protein (OSCP) which also interacts with subunits of the second stalk (see Fig. 4, and [17, 36–38]). As mentioned above, the connection between *E. coli* δ and α subunits has been resolved by NMR [16].

5 The Inhibitor Protein (IF₁) and its Inhibitory and Dimerizing Roles on the Mitochondrial ATP Synthase

A key regulatory subunit absent in bacterial or chloroplast F₁F₀ is the mitochondrial inhibitor protein (IF₁). Since its first isolation in 1963 by Pullman and Monroy [39], this protein was shown to inhibit the ATPase activity of the catalytic F₁ part. This protein is therefore crucial to preventing the hydrolysis of newly synthesized ATP in conditions of low membrane potential in mitochondria. Upon membrane energization, IF₁ is believed to be relocated from its inhibitory site into an unknown position within [40, 41] or outside the F₁F₀ complex [42, 43], therefore allowing ATP synthesis to occur. In de-energized or uncoupled conditions, such as ischemia, the bovine IF₁ is productively associated with the enzyme, inhibiting the ATPase turnover of the F₁I or F₁F₀I complexes. However, this protein allows the rotational ATP synthesis turnover during energization of mitochondrial membranes. Therefore, IF₁ is an important physiological regulator of the functioning of the ATP synthase.

Fig. 5 Possible arrangement of the ATP synthase helical polymer that wraps and gives shape to the mitochondrial tubular cristae.

a Inner view of the polymer from the interior of the cristae (membrane is transparent); the green spheres represent the F₀ channels connected by the protein bridge we observed [54]; the blue spheres are the F₁ heads. **b** The ATP synthase polymer is depicted from the outer surface of a single cristae (yellow). The F₁ particles are in blue and connected with a protein bridge that could be composed by the IF₁ and second-stalk subunits. The original model is from Allen et al. [75]



Although the location of the endogenous IF₁ in the whole F₁F₀I-ATP synthase remains unknown, on the basis of the available structural studies, we proposed a model of the binding site for the IF₁ that would explain the inhibitory role of IF₁ [44]. It is well known that the inhibitory domain of IF₁ lies on the N-terminal side of the molecule [45–47]; thus, according to our cross-linking data showing for the first time a relatively short distance (12 Å) between IF₁ and the γ and ϵ subunits, we placed the N-terminal inhibitory side in a cross-linking position of about 12 Å from the γ and ϵ subunits [44]. Figure 3 (top panels) shows this position of the N-terminal side on a cleft formed by the β_E catalytic subunit and the γ – ϵ part of the central rotor; lysine residues that are at 12-Å cross-linking distance are shown in purple. This β_E – γ – ϵ cleft was the wider binding site available for entrance of the IF₁ N-terminal side into the rotor–stator interface. It is clearly demonstrated from different perspectives that the binding of the N-terminal side of IF₁ in this position interferes not only with the conformational changes of the β subunits, as proposed before [19, 48], but also with the intrinsic rotation of the central stalk. Thus, we supported and proposed a novel mechanism of action for this protein that was later confirmed by the elegant crystal structure of the reconstituted dimeric F₁–IF₁ complex [22]. In the latter complex, the central coiled α -helixes of the γ subunit that extend along the central pseudosymmetry axis of the F₁-ATPase particle were found not only in proximity but in actual close contact with the N-terminal side of IF₁ [21, 22] (see Fig. 3, bottom panels). The IF₁ was found locked into a β_{DP} – γ cleft rather than in a β_E – γ – ϵ interface, as we originally proposed [44]. This shows that what we found by cross-linking and model building was the entrance site of IF₁ into the F₁-ATPase particle and that two further angular movements of the γ subunit of 120° lock the IF₁ into the β_{DP} form of the catalytic subunit that previously received the IF₁ in its open β_E conformation (see Fig. 3 and [21]). Thus, the mechanism of action of IF₁ as inhibitor involves blocking the rotation of the central stalk and inhibiting the opening–closing conformational changes of the catalytic β subunit that leads to substrate binding, catalysis, and product release from F₁.

Besides showing the close-up view of the IF₁- γ interaction, the isolation and resolution of the F₁-IF₁ crystal structure also showed that reconstitution of recombinant IF₁ induces dimerization of the soluble F₁-ATPase particles in the expected 1:1 IF₁-F₁ stoichiometry [22, 49]. Earlier blue native polyacrylamide gel electrophoresis analyses of mitochondria showed a dimeric ATP synthase species that appears after mitochondrial solubilization with several detergents [50] and that some F₀ subunits such as e and g are essential for ATP synthase dimerization [34, 35]. Thus, the question emerged of whether the IF₁ participates in the dimerization of the whole F₁F₀-ATP synthase in mitochondria, besides dimerizing the soluble F₁-ATPase in vitro [49]. Initially, several groups found that genetic or physical removal of the yeast or bovine IF₁, respectively, did not prevent F₁F₀ dimerization; thus, it was concluded that IF₁ does not participate in the homodimerization of the whole F₁F₀ [51, 52]. However, because the yeast IF₁ protein lacks most of the C-terminal dimerizing domain and it is much less prone to dimerize [53], it was conceivable that the role of IF₁ in dimerization of the ATP synthase might be excluded from the yeast enzyme but present in the bovine and rat mitochondrial enzymes. Besides, the results where IF₁ removal did not change the dimer to monomer ratio of the bovine ATP synthase were obtained in the presence of triton X-110 where the F₁F₀-ATPase is inactive [51]. Therefore, we reassessed the role of IF₁ as a dimerizing factor of the bovine and rat mitochondrial enzymes in digitonin-extraction conditions where the dimeric and monomeric forms of the F₁F₀ complex are functional [54]. Besides, instead of looking to the decrease in the dimeric ATP synthase after IF₁ removal, we looked for the recovery or promotion of the dimeric species after reconstitution of increasing amounts of IF₁ into submitochondrial particles. With this approach, we demonstrated that removal of IF₁ dissociated the whole ATP synthase into monomers of high ATPase activity, and the reconstitution of IF₁ into SMP brought a partial recovery of the dimer content of the SMP extract accompanied by an overall inhibition of the ATPase activity [55]. Interestingly, the larger ATP synthase oligomers were also partially recovered by IF₁ reconstitution [55], suggesting that IF₁ participates in the formation of aggregation states of the ATP synthase larger than the ATP synthase dimer. Thus, it seems that yeast IF₁ is not essential for F₁F₀ dimerization in *Saccharomyces cerevisiae* simply because it is much less prone to dimerize since it lacks most of the C-terminal coiled-coil dimerizing domain [53]. The latter seems therefore essential for bovine and rat IF₁ to promote and/or stabilize the dimer and higher oligomer structures of the mitochondrial ATP synthase. This is consistent with previous findings where it has been shown that IF₁ confers structural stability to the F₁F₀I and F₁I complexes during high-pressure denaturation that leads to dissociation of oligomeric species [56]. In line with the dimerizing role of IF₁, it has been recently shown that, among other metabolic effects, the overexpression of IF₁ increases the amount of mitochondrial cristae, and its downregulation decreases the number of cristae in mitochondria of cultured cells [57]. Taken together, these studies confirm that, besides the inhibitory role of IF₁, it is also an important factor that stabilizes dimerization and further oligomerization of the mitochondrial ATP synthase, thus promoting formation of mitochondrial cristae as detailed below.

6 Structure of the Dimeric-Mitochondrial ATP Synthase: Improving Rotational Catalysis, Adding Stability, and Giving Shape to Mitochondrial Cristae

In Fig. 4, the possible quaternary structure of the dimeric bovine F₀F₁I complex is depicted according to the structural data available from crystallographic [20], genetic [58–60],

subunit association [36, 37], cross-linking [38, 44, 61–65], and protease accessibility [38, 66, 67] evidence. How does this model accommodate the inhibitory and dimerizing functions of IF₁ in the F₁F₀ dimer? We assumed a crossed IF₁ structure at the dimer interface, given that we also resolved by high-resolution electron microscopy the dimeric F₁F₀ and found a conical homodimeric molecule containing a protein bridge at the F₁–F₁ interface [54]. In this model, the IF₁ N-terminal side is located at the rotor–stator interface in inhibitory position, whereas the C-terminal side of IF₁ crosses the dimer interface and interacts with the opposite monomer probably through the OSCP subunit at the top of the side stalk as found by cross-linking evidence [65]. This model explains both the inhibitory and dimerizing roles of IF₁; however, both functions of IF₁ would require some further distortion from the fully extended helix observed in the isolated IF₁ to a bent or random coil conformation. This distortion is necessary to introduce the N-terminal side of IF₁ into the β_{DP}–γ interface as shown by the crystal structures [21, 22]. In the F₁F₀ dimer model, we used a crystal IF₁ conformer that is bent in the middle of the IF₁ protein, and this fits better at this interface than the extended IF₁ dimer conformers [68]. Similar crossed IF₁ dimeric structures have been observed in the IF₁ crystal [68]; this arrangement would be different from the observed antiparallel coiled-coil dimer of isolated IF₁ [68]. It was necessary to invoke this crossed structure because the distance between the N-terminal inhibitory domains in the IF₁–IF₁ extended dimer is about 60 Å [68], whereas the F₁–F₁ distance observed in the soluble F₁–IF₁ dimer [22] or in the (F₁F₀)₂ dimer is ≤10 Å [54]. This implies that the IF₁ dimer must bend or cross somehow to be accommodated at the F₁–F₁ interface of the ATP synthase dimer that had an angle of about 40° which gives its conical shape.

On the other hand, it is also noted that, besides the bovine dimeric ATP synthase [54], other similar dimeric structures have been subsequently observed by electron microscopy in *S. cerevisiae* and *Polytomella sp* mitochondria. The latter species has a unique second-stalk composition and is therefore nonrepresentative of other mitochondrial ATP synthases [69]; however, in both cases, the dimeric structure adopted two angles of about 40° and 70° [69]. Dudkina and colleagues [70] named their open (70°) structure as the “true dimer”, and our compact (40°) structure as a “pseudo-dimer”; furthermore, they also suggest that, in line with other reports, only their open “true” dimer actually participates in cristae formation [71, 72]. However, their dimer structures have several drawbacks: (1) their image averages are collected not by hand but automatically by image analysis software; in consequence, a large proportion of their dimer particles lack one or both of the F₁-portions, showing that their preparation is largely unstable compared to our preparation, which contains mostly complete F₁F₀ structures. (2) The larger detergent concentration used to isolate the enriched open dimers [69, 70] decreases the dimer yield and stability, and, importantly, it also decreases the functional coupling between F₁ and F₀; in contrast, our dimer enriched at lower detergent concentrations preserves essentially full oligomycin sensitivity, i.e., F₁F₀ functional coupling (Minauro-Sanmiguel and García-Trejo, unpublished results). This parameter has not been reported in the preparations enriched with the open (70°) and unstable dimer; it would not be surprising to find there a decreased F₀ inhibition. (3) There is emerging evidence from others [73] and from our recent studies with the yeast F₁F₀ dimer (not shown) indicating that both structures (open and closed) coexist with a wide distribution of dimers showing different angles after detergent extraction, but there is no clear evidence indicating which protein or factor is controlling the opening or closing of the dimer angle. Although IF₁ is not essential for IF₁ dimerization in yeast [52], the possibility remains that the shift from an extended to a compact conformation of the IF₁ dimer could

participate in determining the angle of dimeric F_1F_0 . Therefore, we conclude that there is no reason to name arbitrarily the open or closed conformations as “pseudo” or “true” dimers; instead, we propose to refer to them just as “open” ($\cong 70^\circ$) and “closed” ($\cong 40^\circ$) dimers, with the understanding that the dimer population actually spreads through all angles between these values. Regardless of the observed angle values after detergent extraction, two major dimeric species correlate well with two distinct dimeric interfaces at the F_0 side that have been found in yeast F_1F_0 [74]; these two interfaces would build a helical polymer of dimers that wraps and gives shape to the tubular cristae of mitochondria [75], as it is currently proposed (Fig. 5).

In summary, the dimeric structure of the F_1F_0 ATP synthase is stabilized by the so-called inhibitor protein (IF_1) in the mitochondria of complex organisms such as rat or cow. Literally, on the other hand, the conserved N-terminal side of IF_1 inhibits the F_1F_0 -ATPase activity by entering through the open catalytic α_E - β_E interface in a cleft formed by β - γ - ϵ subunits. With the IF_1 bound at this interface, the F_1 -ATPase carries out two 120° gyrations of the central stalk and the N-terminal side of IF_1 locks at the β_{DP} - α_{DP} - γ interface, completely blocking rotation of the central stalk and the opening and closing of the catalytic sites. A further question that emerges is, how this deep inhibitory interaction of IF_1 with the rotor–stator interface of F_1 is reversed in the presence of the mitochondrial electrochemical proton gradient to allow ATP synthesis turnover? We are currently addressing this question by limited proteolysis experiments; interestingly, we observed that the N-terminal side of IF_1 becomes exposed to the media upon membrane energization, whereas the C-terminal side of IF_1 becomes shielded to proteolysis, indicating that it hides behind another F_1F_0 subunit (García-Trejo et al., unpublished). We propose here how this might happen in the dimeric F_1F_0 structure of bovine heart mitochondria. Upon membrane energization, the C-terminal side of IF_1 might become occluded between OSCP or second-stalk subunits at the dimer interface, whereas the N-terminal inhibitory domain is released from the α_{DP} - β_{DP} - γ cleft where it is bound, thus restoring rotation of the central stalk and the opening–closing conformational changes of the β subunits that are essential for F_1 catalysis. In this model, second-stalk subunits are not depicted for clarity, but they should contribute significantly to the dimer interface, as shown for the yeast H subunit (bovine subunit F6, see [75]). Once formed, the dimer structure seems more stable and in better shape to resist the rotational drag of the continuous gyration of the central stalk than its dimeric form (Fig. 4). In other words, the monomeric enzyme could lose coupling energy by rotating as a rigid body following the angular drag of the rotor; this would hardly occur in a dimerized or oligomerized ATP synthase. Indeed, it has been proposed that the rotational drag of each monomer promotes closer F_0 - F_0 interactions in the dimer as observed by atomic force microscopy in the dimeric enzyme [71]. It can also be questioned whether dimerization actually increases the coupling efficiency of the enzyme, given that the monomeric bacterial enzyme is already highly efficient as a coupling factor; indeed, the most efficient and practically unidirectional ATP synthases described so far are those of *P. denitrificans* [30] and of a thermoalkaliphilic bacterium [31]. However, it is also recalled that, in α -proteobacteria and even in eubacteria such as *E. coli*, it has been described that the rotary turnover of the F_1 portion undergoes slippage from the proton conduction through F_0 under conditions of low ADP and Pi concentrations [76, 77]. This slipping has not been observed for the mitochondrial enzyme, probably because the rotor and stator interfaces of each monomer interact more efficiently in the dimeric or oligomeric forms of the enzyme. In this line, we are currently collecting evidence to respond to the question of whether the dimeric enzyme possesses a higher stability and better efficiency as ATP synthase in comparison with its monomeric species;

preliminary results indicate that it is actually the case. Together with its role in formation of the mitochondrial cristae, these studies and models shed light on the mechanisms by which the F₁F₀-ATP synthase becomes not only the most efficient nanomotor in nature by its regulation in bacteria and by its dimerization in mitochondria, but also becomes a dimeric building block of a hypothetical helical polymer that wraps and gives shape to the mitochondrial cristae (Fig. 5).

Acknowledgements This work and our work reviewed here were supported by the CONACyT grants No. I32903-N, J34744-N, and V43814-M.

References

1. Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A., Racker, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **235**, 3330–3336 (1960)
2. Souid, A.K., Penefsky, H.S.: Mechanism of ATP synthesis by mitochondrial ATP synthase from beef heart. *J. Bioenerg. Biomembranes* **26**, 627–630 (1994). doi:[10.1007/BF00831537](https://doi.org/10.1007/BF00831537)
3. García, J.J., Gómez-Puyou, A., Maldonado, E., Tuena de Gómez-Puyou, M.: Acceleration of unisite catalysis of mitochondrial F₁-adenosinetriphosphatase by ATP, ADP and pyrophosphate—hydrolysis and release of the previously bound [γ -³²P]ATP. *Eur. J. Biochem.* **249**(2), 622–229 (1997). doi:[10.1111/j.1432-1033.1997.00622.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00622.x)
4. García, J.J., Capaldi, R.A.: Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in *Escherichia coli* F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**(26), 15940–15945 (1998). doi:[10.1074/jbc.273.26.15940](https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15940)
5. García, J.J.: The F₀F₁-ATP synthase: binding energy, coupling and rotational catalysis. In: Pandalai, S.G. (ed.) *Recent Research Developments in Bioenergetics*, p. 41. Transworld Research Network, Trivandrum (2000)
6. Boyer, P.D.: The ATP synthase a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749 (1997). doi:[10.1146/annurev.biochem.66.1.717](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717)
7. Capaldi, R.A., Schulenberg, B., Murray, J., Aggeler, R.: Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Exp. Biol.* **203**, 29–33 (2000)
8. Iino, R., Rondelez, Y., Yoshida, M., Noji, H.: Chemomechanical coupling in single-molecule F-type ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembranes* **37**, 451–454 (2005). doi:[10.1007/s10863-005-9489-5](https://doi.org/10.1007/s10863-005-9489-5)
9. Feniouk, B.A., Yoshida, M.: Regulatory mechanisms of proton-translocating F(O)F (1)-ATP synthase. *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 279–308 (2008). doi:[10.1007/400_2007_043](https://doi.org/10.1007/400_2007_043)
10. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr.: Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**, (6622), 299–302 (1997). doi:[10.1038/386299a0](https://doi.org/10.1038/386299a0)
11. Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M.: Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**(31), 19375–19377 (1998). doi:[10.1074/jbc.273.31.19375](https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19375)
12. Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, T., Yanagida, Y., Wada, M., Futai, M.: Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* **286**(5445), 1722–1724 (1999). doi:[10.1126/science.286.5445.1722](https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1722)
13. Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M., Capaldi, R.A.: Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₁F₀ ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(3), 898–902 (2001). doi:[10.1073/pnas.031564198](https://doi.org/10.1073/pnas.031564198)
14. Wilkens, S., Capaldi, R.: Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**(1–2), 93–97 (1998). doi:[10.1016/S0005-2728\(98\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00048-6)
15. Karrasch, S., Walker, J.E.: Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **290**(2), 379–384 (1999). doi:[10.1006/jmbi.1999.2897](https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2897)
16. Wilkens, S., Borchardt, D., Weber, J., Senior, A.: Structural characterization of the interaction of the δ and α subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **44**(35), 11786–11794 (2005)
17. Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G., Walker, J.E.: On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* **25**(12), 2911–2918 (2006). doi:[10.1038/sj.emboj.7601177](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601177)

18. Rodgers, A.J., Wilce, M.C.: Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.* **7**(11), 1051–1054 (2000). doi:[10.1038/80975](https://doi.org/10.1038/80975)
19. Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E.: Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**(6491), 621–628 (1994)
20. Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E.: The structure of the central stalk in bovine F₁(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**(11), 1055–1061 (2000). doi:[10.1038/80981](https://doi.org/10.1038/80981)
21. Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E.: How the regulatory protein, IF₁, inhibits F₁(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(40), 15671–15676 (2007). doi:[10.1073/pnas.0707326104](https://doi.org/10.1073/pnas.0707326104)
22. Cabezón, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E.: The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁. *Nat. Struct. Biol.* **10**(9), 744–750 (2003). doi:[10.1038/nsb966](https://doi.org/10.1038/nsb966)
23. Stock, D., Leslie, A.G.W., Walker, J.E.: Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**(5445), 1700–1705 (1999). doi:[10.1126/science.286.5445.1700](https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1700)
24. Tsunoda, S., Rodgers, A.J.W., Aggeler, R., Wilce, M.C.J., Yoshida, M., Capaldi, R.A.: Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F₁F₀ ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(12), 6560–6564 (2001). doi:[10.1073/pnas.111128098](https://doi.org/10.1073/pnas.111128098)
25. Hausrath, A.C., Capaldi, R.A., Matthews, B.W.: The conformation of the epsilon- and gamma-subunits within the *Escherichia coli* F₁(1) ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**(50), 47227–47232 (2001). doi:[10.1074/jbc.M107536200](https://doi.org/10.1074/jbc.M107536200)
26. Iino, R., Murakami, T., Iizuka, S., Kato-Yamada, Y., Suzuki, T., Yoshida, M.: Real-time monitoring of conformational dynamics of the epsilon subunit in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **280**(48), 40130–40134 (2005). doi:[10.1074/jbc.M506160200](https://doi.org/10.1074/jbc.M506160200)
27. Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., Akutsu, H.: Structures of the thermophilic F₁-ATPase epsilon subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(27), 11233–11238 (2007). doi:[10.1073/pnas.0701045104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701045104)
28. Kato-Yamada, Y.: Isolated epsilon subunit of *Bacillus subtilis* F₁-ATPase binds ATP. *FEBS Lett.* **579**(30), 6875–6878 (2005). doi:[10.1016/j.febslet.2005.11.036](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.036)
29. Yoshida, M., Kato-Yamada, Y.: Role of the epsilon subunit of thermophilic F₁-ATPase as a sensor for ATP. *J. Biol. Chem.* **282**(52), 37618–37623 (2007). doi:[10.1074/jbc.M707509200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707509200)
30. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D.: Proton-translocating ATP-synthase of *Paracoccus denitrificans*: ATP-hydrolytic activity. *Biochemistry (Mosc.)* **68**(10), 1101–1108 (2003). doi:[10.1023/A:1026306611821](https://doi.org/10.1023/A:1026306611821)
31. Stocker, A., Keis, S., Vonck, J., Cook, G.M., Dimroth, P.: The structural basis for unidirectional rotation of thermoalkaliphilic F₁-ATPase. *Structure* **15**(8), 904–914 (2007). doi:[10.1016/j.str.2007.06.009](https://doi.org/10.1016/j.str.2007.06.009)
32. Suzuki, T., Ozaki, Y., Sone, N., Feniouk, B.A., Yoshida, M.: The product of uncI gene in F₁F₀-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c ring assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(52), 20776–20781 (2007). doi:[10.1073/pnas.0708075105](https://doi.org/10.1073/pnas.0708075105)
33. Brosché, M., Kalbina, I., Arnfelt, M., Benito, G., Karlsson, B.G., Strid, Å.: Occurrence, overexpression and partial purification of the protein (majastridin) corresponding to the URF6 gene of the *Rhodobacter blasticus* atp operon. *Eur. J. Biochem.* **255**(1), 87–92 (1998). doi:[10.1046/j.1432-1327.1998.2550087.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550087.x)
34. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schagger, H.: Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* **17**(24), 7170–7178 (1998). doi:[10.1093/emboj/17.24.7170](https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170)
35. Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J.P., Velours, J.: The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**(3), 221–230 (2002). doi:[10.1093/emboj/21.3.221](https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221)
36. Collinson, I.R., Van Raaij, M.J., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Orriss, G.L., Miroux, B., Walker, J.E.: ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence. *J. Mol. Biol.* **242**(4), 408–421 (1994)
37. Collinson, I.R., Skehel, J.M., Fearnley, I.M., Runswick, M.J., Walker, J.E.: The F₁F₀-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F₁ and F₀ domains. *Biochemistry* **35**(38), 12640–12646 (1996). doi:[10.1021/bi960969t](https://doi.org/10.1021/bi960969t)
38. Xu, T., Zannoti, F., Gaballo, A., Raho, G., Papa, S.: F₁ and F₀ connections in the bovine mitochondrial ATP synthase: the role of the alpha subunit N-terminus, oligomycin-sensitivity conferring protein (OCSP) and subunit d. *Eur. J. Biochem.* **267**(14), 4445–4455 (2000). doi:[10.1046/j.1432-1327.2000.01492.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01492.x)
39. Pullman, M.E., Monroy, G.C.: A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769 (1963)

40. Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M.: Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as directed by antibodies against the inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**(1), 400–406 (1981). doi:[10.1016/S0006-291X\(81\)80110-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(81)80110-6)
41. Sánchez-Bustamante, V.J., Darszon, A., Gómez-Puyou, A.: On the function of the natural ATPase inhibitor protein in intact mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **126**(3), 611–616 (1982). doi:[10.1111/j.1432-1033.1982.tb06824.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06824.x)
42. Schwerzmann, K., Pedersen, P.L.: Proton adenosine triphosphatase complex of rat liver mitochondria: effect of energy state on its interaction with the adenosine triphosphatase inhibitory peptide. *Biochemistry* **20**(22), 6305–6311 (1981). doi:[10.1021/bi00525a004](https://doi.org/10.1021/bi00525a004)
43. Power, J., Cross, R.L., Harris, D.A.: Interaction of F₁-ATPase, from ox heart mitochondria with its naturally occurring inhibitor protein. Studies using radio-iodinated inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta* **724**(1), 128–141 (1983). doi:[10.1016/0005-2728\(83\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(83)90034-8)
44. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., García, J.J.: Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembranes* **34**(6), 433–443 (2002). doi:[10.1023/A:1022514008462](https://doi.org/10.1023/A:1022514008462)
45. Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perrucci, C., Candita, C., Minuto, M.: Identification of functional domains and critical residues in the adenosine triphosphatase inhibitor protein of mitochondrial F₀F₁ ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **240**(2), 461–467 (1996). doi:[10.1111/j.1432-1033.1996.0461h.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0461h.x)
46. Harris, D.A.: Functional regions of the H(+)-ATPase inhibitory protein from ox heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**8–16 (1997). doi:[10.1016/S0005-2728\(97\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00003-0)
47. van Raaij, M.J., Orriss, G.L., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Walker, J.E.: The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* **35**(49), 15618–15625 (1996). doi:[10.1021/bi960628f](https://doi.org/10.1021/bi960628f)
48. Jackson, P.J., Harris, D.A.: The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F₁ beta-subunit. *FEBS Lett.* **229**(1), 224–228 (1988). doi:[10.1016/0014-5793\(88\)80832-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80832-9)
49. Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., Walker, J.E.: Dimerization of bovine F₁-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *J. Biol. Chem.* **275**(37), 28353–28355 (2000). doi:[10.1074/jbc.C000427200](https://doi.org/10.1074/jbc.C000427200)
50. Schägger, H., Pfeiffer, K.: Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**(8), 1777–1783 (2000). doi:[10.1093/emboj/19.8.1777](https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777)
51. Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D.A., Mavelli, I., Lippe, G.: Dimerization of F₀F₁ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1556**(2–3), 133–141 (2002). doi:[10.1016/S0005-2728\(02\)00344-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00344-4)
52. Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H., Stuart, R.A.: Formation of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J. Biol. Chem.* **277**(42), 39289–39295 (2002). doi:[10.1074/jbc.M205720200](https://doi.org/10.1074/jbc.M205720200)
53. Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., Carbajo, R.J., Walker, J.E.: Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J. Biol. Chem.* **277**(44), 41334–41341 (2002). doi:[10.1074/jbc.M207169200](https://doi.org/10.1074/jbc.M207169200)
54. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., García, J.J.: 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**(35), 12356–12358 (2005). doi:[10.1073/pnas.0503893102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503893102)
55. García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernandez, P., Rodríguez-Zavala, J.S.: The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Biochemistry* **45**(42), 12695–12703 (2006). doi:[10.1021/bi060339j](https://doi.org/10.1021/bi060339j)
56. Fornells, L.A., Guimaraes-Motta, H., Nehme, J.S., Martins, O.B., Silva, J.L.: Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F₁-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**(2), 304–312 (1998). doi:[10.1006/abbi.1997.0454](https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0454)
57. Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., Duchon, M.R.: Regulation of mitochondrial structure and function by the F₁F₀-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab.* **8**(1), 13–25 (2008). doi:[10.1016/j.cmet.2008.06.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.001)
58. Fillingame, R.H., Jiang, W., Dmitriev, O.Y., Jones, P.C.: Structural interpretations of F₀ rotary function in the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**(2–3), 387–403 (2000). doi:[10.1016/S0005-2728\(00\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00089-X)
59. Vik, S.B., Patterson, A.R., Antonio, B.J.: Insertion scanning mutagenesis of subunit a of the F₁F₀ ATP synthase near His245 and implications on gating of the proton channel. *J. Biol. Chem.* **273**(26), 16229–16234 (1998). doi:[10.1074/jbc.273.26.16229](https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16229)

60. Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X., Nagley, P.: Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* **458**(2–3), 428–442 (2000)
61. Dupuis, A., Lunardi, J., Issartel, J.P., Vignais, P.V.: Interactions between the oligomycin sensitivity conferring protein (OSCP) and beef heart mitochondrial F₁-ATPase. 2. Identification of the interacting F₁ subunits by cross-linking. *Biochemistry* **24**(3), 734–739 (1985)
62. Joshi, S., Burrows, R.: ATP synthase complex from bovine heart mitochondria. Subunit arrangement as revealed by nearest neighbor analysis and susceptibility to trypsin. *J. Biol. Chem.* **265**(24), 14518–14525 (1990)
63. Belogradov, G.I., Tomich, J.M., Hatefi, Y.: Membrane topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g. *J. Biol. Chem.* **271**(34), 20340–20345 (1996). doi:[10.1074/jbc.271.34.20340](https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20340)
64. Velours, J., Paumard, P., Soubannier, V., Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V.: Organisation of the yeast ATP synthase F₀: a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1458**(2–3), 443–456 (2000). doi:[10.1016/S0005-2728\(00\)00093-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00093-1)
65. Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A., Papa, S.: Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF₁ of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembranes* **36**(5), 447–457 (2004). doi:[10.1023/B:JOB.0000047327.68173.9b](https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000047327.68173.9b)
66. Pan, W., Ko, Y.H., Pedersen, P.L.: Delta subunit of rat liver mitochondrial ATP synthase: molecular description and novel insights into the nature of its association with the F₁-moiety. *Biochemistry* **37**(19), 6911–6923 (1998). doi:[10.1021/bi9800698](https://doi.org/10.1021/bi9800698)
67. Ko, Y.H., Hüllihen, J., Hong, S., Pedersen, P.L.: Mitochondrial F₀F₁ ATP synthase. Subunit regions on the F₁ motor shielded by F₀, Functional significance, and evidence for an involvement of the unique F₀ subunit F₆. *J. Biol. Chem.* **275**(42), 32931–32939 (2000). doi:[10.1074/jbc.M004453200](https://doi.org/10.1074/jbc.M004453200)
68. Cabezón, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G., Walker, J.E.: The structure of bovine IF₁, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J.* **20**(24), 6990–6996 (2001). doi:[10.1093/emboj/20.24.6990](https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6990)
69. Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J., Braun, H.P.: Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* **579**(25), 5769–5772 (2005)
70. Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P., Boekema, E.J.: Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* **580**(14), 3427–3432 (2006). doi:[10.1016/j.febslet.2006.04.097](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.097)
71. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R., Kühlbrandt, W.: Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* **27**(7), 1154–1160 (2008). doi:[10.1038/emboj.2008.35](https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35)
72. Vonck, J., Schäfer, E.: Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta*; Epub ahead of print (2008). doi:[10.1016/j.bbamcr.2008.05.019](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.019)
73. Thomas, D., Bron, P., Weimann, T., Dautant, A., Giraud, M.F., Paumard, P., Salin, B., Cavalier, A., Velours, J., Brèthes, D.: Supramolecular organization of the yeast F₁F_o-ATP synthase. *Biol. Cell*; Epub ahead of print (2008). doi:[10.1042/BC20080022](https://doi.org/10.1042/BC20080022)
74. Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J., Brèthes, D.: The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry* **45**(21), 6715–6723 (2006). doi:[10.1021/bi0601407](https://doi.org/10.1021/bi0601407)
75. Allen, R.D., Schroeder, C.C., Fok, A.K.: An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J. Cell Biol.* **108**(6), 2233–2240 (1989). doi:[10.1083/jcb.108.6.2233](https://doi.org/10.1083/jcb.108.6.2233)
76. Turina, P., Rebecchi, A., D'Alessandro, M., Anefors, S., Melandri, B.A.: Modulation of proton pumping efficiency in bacterial ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**(5–6), 320–325 (2006). doi:[10.1016/j.bbabi.2006.04.018](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.018)
77. Feniouk, B.A., Mulkidjanian, A.Y., Junge, W.: Proton slip in the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus*: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1706**(1–2), 184–194 (2005). doi:[10.1016/j.bbabi.2004.10.010](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.10.010)

The Inhibitor Protein (IF₁) Promotes Dimerization of the Mitochondrial F₁F₀-ATP Synthase[†]

José J. García,*^{‡,§} Edgar Morales-Ríos,[‡] Paulina Cortés-Hernández,[‡] and José S. Rodríguez-Zavala[‡]

Departamento de Bioquímica and Cardiovascular Disease's Genomic and Proteomic Study Group, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, México, D.F., Mexico 14080

Received February 17, 2006; Revised Manuscript Received July 28, 2006

ABSTRACT: The effect of increased expression or reconstitution of the mitochondrial inhibitor protein (IF₁) on the dimer/monomer ratio (D/M) of the rat liver and bovine heart F₁F₀-ATP synthase was studied. The 2-fold increased expression of IF₁ in AS-30D hepatoma mitochondria correlated with a 1.4-fold increase in the D/M ratio of the ATP synthase extracted with digitonin as determined by blue native electrophoresis and averaged densitometry analyses. Removal of IF₁ from rat liver or bovine heart submitochondrial particles increased the F₁F₀-ATPase activity and decreased the D/M ratio of the ATP synthase. Reconstitution of recombinant IF₁ into submitochondrial particles devoid of IF₁ inhibited the F₁F₀-ATPase activity by 90% and restored partially the D/M ratio of the whole F₁F₀ complex as revealed by blue native electrophoresis and subsequent SDS-PAGE or glycerol density gradient centrifugation. Thus, the inhibitor protein promotes or stabilizes the dimeric form of the intact F₁F₀-ATP synthase. A possible location of the IF₁ protein in the dimeric structure of the rat liver F₁F₀ complex is proposed. According to crystallographic and electron microscopy analyses, dimeric IF₁ could bridge the F₁-F₁ part of the dimeric F₁F₀-ATP synthase in the inner mitochondrial membrane.

The F₁F₀-ATP synthase of energy-transducing membranes is the smallest and most efficient molecular motor of nature (1). During ATP synthesis, proton flow drives the rotation of a ring of 10–12 c subunits of its F₀ proton channel; this is connected to the central stalk and therefore drags the γ subunit whose gyration induces the alternating release of newly synthesized ATP from the three catalytic α/β interfaces of F₁ (2, 3). A peripheral stalk works as a stator by connecting the α and β subunits of the F₁ part to static subunits of F₀ (4). This rotational mechanism is completely reversible; when the transmembrane proton gradient decreases, the enzyme becomes an ATPase that rotates in the opposite direction as driven by ATP binding energy (3, 5). To prevent wasteful ATP cleavage, the enzyme is controlled in bacteria, chloroplasts, and mitochondria, albeit by different mechanisms. In mitochondria, this regulation is carried out by a powerful inhibitor of ATP synthesis and hydrolysis of 10 kDa (IF₁)¹ that binds to the soluble F₁ part with a 1:1 stoichiometry (6, 7). As shown by cross-linking studies, IF₁ interferes with rotation of the central stalk and with the conformational changes of the catalytic α/β interfaces by binding at a distance ≤ 12 Å from the α , β (8, 9) catalytic interfaces and the rotary γ and ϵ subunits of F₁ (10). This was subsequently confirmed by resolution of the N-terminal

inhibitory portion of bovine IF₁ reconstituted into its corresponding F₁-ATPase (11) showing that the N-terminal side of IF₁ actually interacts with the γ subunit of the rotor, and it binds in a catalytic α/β interface.

It has also been shown that IF₁ self-associates as an inhibitory dimer (12) that induces dimerization of soluble F₁ particles (13). Indeed, the crystal form of the F₁I complex containing the reconstituted inhibitory protein exhibits this dimeric structure (11). These findings raised the question of the extent to which IF₁ contributes to the dimerization of the native F₁F₀-ATP synthase in mitochondria. In this regard, the effect of removal of IF₁ on the dimer/monomer (D/M) distribution of mitochondrial F₁F₀ extracted with different detergents has been studied, either genetically as in yeast mitochondria (14) or physically by releasing IF₁ from bovine heart submitochondrial particles (15). In both systems it was shown by blue native electrophoresis (BN-PAGE) that dimeric F₁F₀ is formed even though the preparations lack IF₁. From these and other studies it was shown that, rather than IF₁, other subunits of F₀ such as e and g are essential for F₁F₀ dimerization (16–18). These studies also showed that the F₁F₀ dimer has a key role in the morphology of the mitochondrial inner membrane and in mtDNA stability,

[†] This work was supported by Grants J-34744-N and V43814-M from CONACyT, México.

* Address correspondence to this author. Tel: (011-5255) 5573-2911 ext 1298. Fax: (011-5255) 5573-0926. E-mail: jjgarcia_trejo@yahoo.com.

[‡] Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

[§] Cardiovascular Disease's Genomic and Proteomic Study Group, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

¹ Abbreviations: BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; D/M, ratio of dimeric/monomeric species of the F₁F₀-ATP synthase; EDTA-SMP, submitochondrial particles prepared in the presence of EDTA and lacking IF₁; EM, electron microscopy; F₁-IF₁, soluble F₁-ATPase complexed with its inhibitor protein; IF₁, inhibitor protein of the mitochondrial F₁F₀-ATPase; MF₁F₀, F₁F₀-ATP synthase complex from bovine heart mitochondria; MgATP-SMP, submitochondrial particles prepared in the presence of MgATP containing the endogenous IF₁; OSCP, oligomycin sensitivity conferring protein of F₁F₀-ATP synthase; SMP, submitochondrial particles.

because the e and g yeast deletion mutants eventually lose the cristae and the mtDNA (16–18). However, the effect of mitochondrial IF₁ increased expression or its reconstitution on the D/M ratio of the whole F₁F₀ complex has not been studied in conditions where the active ATP synthase dimer is enriched (16, 19, 20).

Therefore, we determined the effect of overexpressing or reconstituting IF₁ on the D/M ratio of the mitochondrial or particulate F₁F₀-ATP synthase that was subsequently extracted with digitonin. We used mitochondria from rat liver where the ratio of IF₁/F₁ is 0.4 (21) and mitochondria from rat AS-30D hepatoma where this ratio raises to about 1.0 and IF₁ is therefore more efficiently associated to F₁F₀ (22). We compared the D/M ratio of the ATP synthase solubilized from hepatoma to that found in normal rat liver mitochondria and submitochondrial particles by BN-PAGE. In addition, we assayed the effect of reconstituting recombinant rat liver IF₁ on the D/M ratio of the rat F₁F₀-ATP synthase solubilized from submitochondrial particles. The results of increased expression and reconstitution of IF₁ are consistent with each other and show that IF₁ participates in the dimerization of the intact mitochondrial F₁F₀-ATP synthase.

MATERIALS AND METHODS

Rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria were isolated by differential centrifugation as described before (22). Submitochondrial particles containing its endogenous IF₁ (MgATP-SMP) or devoid of IF₁ (EDTA-SMP) were prepared by sonication as described for the bovine heart SMP (10). Recombinant rat liver IF₁ was overexpressed from the pMal-IF₁ plasmid and purified by the maltose affinity column described elsewhere (23). Alternatively, the recombinant IF₁ from rat liver or bovine heart were overexpressed with the pJSRLIF₁ plasmid or its bovine heart counterpart (pJSBHIF₁), which are derivatives of plasmid pIN-III-A3 (22), and purified by ammonium sulfate precipitation followed by carboxy methyl chromatography as described before (24).

Most of the chemicals were purchased from Sigma, including ATP, ADP, lauryl maltoside, digitonin, and coupling enzymes for activity assays (pyruvate kinase and lactate dehydrogenase). Reactants for SDS-PAGE and BN-PAGE were obtained from Bio-Rad. Coomassie blue for native gels was purchased from Serva.

Blue Native Electrophoresis of Solubilized Mitochondria and Submitochondrial Particles. BN-PAGE was carried out essentially as described by Schägger and Von Jagow (25). Because the detergent/protein ratio is crucial during mitochondrial solubilization, special care was taken in the protein determination procedure. This was carried out by the TCA-Lowry protein assay (26) that eliminates any interference from buffer components. In this way, after careful titration of digitonin/protein ratios, an optimal detergent/protein ratio of 1.5 mg of digitonin/mg of protein was found as the best condition to extract intact F₁F₀ in its monomeric and dimeric forms. This ratio was therefore kept constant in all experiments shown. After mitochondrial solubilization, BN-PAGE was carried out in minigel format by overnight 40 V runs at 4 °C using 75–150 µg of solubilized protein per lane. Gels were then fixed and stained with Coomassie or used for 2D SDS-PAGE before fixation as described elsewhere (10).

Lanes of BN gels that were chosen for 2D SDS-PAGE were excised and incubated for a half hour in 1% SDS and 5 mM DTT before loading them into a 10–22% denaturing gel. When necessary, “in-gel ATPase activity” was developed by incubating BN-PAGE gels in “ATPase developing buffer” (50 mM glycine, 0.15% lead acetate, 7.5 mM MgCl₂, and 7.5 mM ATP, pH 8.5) for several hours as indicated.

Alternatively, separation of dimeric and monomeric F₁F₀-ATP synthase was carried out with 20–40% glycerol gradient centrifugations as described before (27).

Reconstitution of Recombinant Rat Liver IF₁ into Submitochondrial Particles. Purified recombinant rat liver IF₁ was reconstituted into EDTA-SMP in the presence of 6 mM MgATP as described before (22, 23). The IF₁ reconstituted at the amounts indicated in the figures exerted a maximal inhibition of about 90% of the ATPase activity of EDTA-SMP. After reconstitution, EDTA-SMP were washed once by ultracentrifugation at 45000 rpm for removal of excess IF₁ and resuspended in a loading buffer of BN-PAGE for native electrophoresis. When activity assays were carried out, EDTA-SMP reconstituted with IF₁ were resuspended in 250 mM sucrose and 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, and ATPase activity was carried out by the spectrophotometric coupled enzyme assay (28) following NADH oxidation at 340 nm.

RESULTS

Rat liver mitochondria have an IF₁/F₁ stoichiometry of 0.4 (21) that raises to about 1.0 in rat AS-30D liver hepatoma mitochondria due to an increase in the expression of IF₁ (22). Concomitantly, and relative to rat liver, there is a higher association of IF₁ with the F₁F₀ complex in AS-30D hepatoma as shown by cross-linking and ATPase activation assays (22). Taking advantage of the AS-30D system, we studied the effect of its 2-fold IF₁ increased expression on the ratio of dimeric and monomeric F₁F₀ complexes (D/M). To this end, rat liver and AS-30D mitochondrial preparations were solubilized with digitonin as detailed in Materials and Methods to extract the monomeric and dimeric ATP synthase (16, 20). BN-PAGE and denaturing 2D analyses showed the presence of extracted monomeric and dimeric F₁F₀ complexes in both preparations with a tendency to increase the D/M ratio in AS-30D mitochondria (Figure 1A). To obtain a D/M ratio that will average the variations obtained by densitometric analyses, several digitonin extracts were obtained from different preparations of liver and AS-30D mitochondria that were subjected to BN-PAGE. Furthermore, to avoid variations in the D/M ratio produced by different protein loads, duplicate lanes of liver or hepatoma in different BN gels were loaded with 75 or 150 µg of protein (see representative gel in Figure 1A). Remarkably, a statistically significant increase in the D/M ratio to a value of 1.61 ± 0.22 (\pm SD; $n = 6$) was found in AS-30D mitochondria as compared to 1.17 ± 0.07 (\pm SD; $n = 6$) found in rat liver (Figure 2). For comparison, the D/M ratio of mitochondrial F₁F₀ extracted with digitonin from bovine heart mitochondria was determined in the same conditions used for rat liver and hepatoma mitochondria. This ratio showed a higher D/M ratio of 2.7 ± 0.9 (\pm SD; $n = 3$) after densitometry analyses of different lanes loaded in three separate BN gels (see two representative lanes labeled as “Bov” in Figure 2A). To confirm this result, we also analyzed the D/M ratio of ATP synthase in the so-called MgATP-SMP that retain the endogenous IF₁ protein

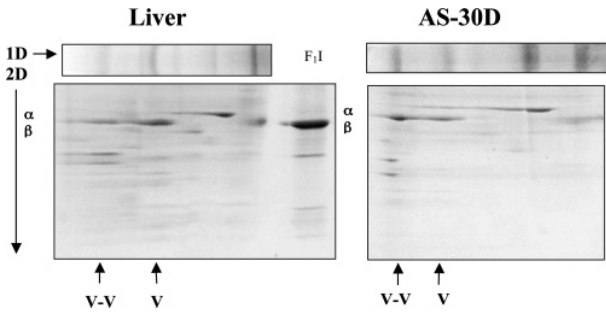


FIGURE 1: Separation of dimeric and monomeric F₁F₀ complexes by BN-PAGE and 2D SDS-PAGE. 150 μ g of mitochondrial digitonin extracts of liver (left) or AS-30D (right) were subjected to BN-PAGE (upper horizontal lanes). In the same BN gel, other lanes were loaded with 200 μ g of protein of the same samples, excised and subjected to BN-PAGE and subsequently to 2D SDS-PAGE as detailed under Materials and Methods. The two major uppermost bands of BN-PAGE correspond to dimeric (V-V) and monomeric (V) forms of the ATP synthase as resolved by 2D SDS-PAGE. An F₁ standard was included showing the position of the α and β bands of F₁. Other mitochondrial complexes were resolved with higher protein loads; for example, the faint bands above and below the ATP synthase monomer (V) correspond to monomeric complex I and dimeric bc₁ (see also Figure 2A). Other major proteins resolved in the right side of 2D gels were not identified.

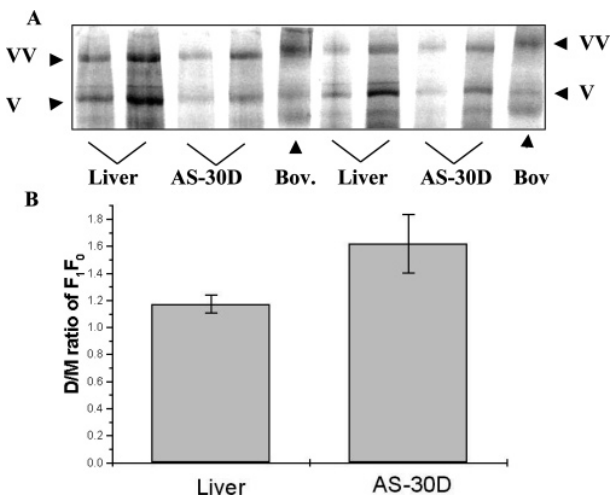


FIGURE 2: Densitometric analyses of the D/M ratio of the F₁F₀-ATP synthase in liver and hepatoma mitochondria. (A) BN-PAGE of digitonin extracts obtained from liver and AS-30D mitochondria were subjected to densitometric analyses to calculate the relative intensities of dimeric (V-V) and monomeric (V) bands. Lanes 1, 3, 5, 6, and 8 were loaded with 75 μ g of protein, whereas lanes 2, 4, 7, and 9 were loaded with 150 μ g of protein. Lanes labeled as Bov were loaded with 100 μ g of digitonin extracts obtained from bovine heart mitochondria. (B) Statistical analyses showed a significant increase of the dimeric F₁F₀ in AS-30D mitochondria compared to rat liver. A Student's *t*-test indicated that the differences between liver and AS-30D samples are statistically significant ($p = 0.00071$, $n = 6$). Error bars indicate the standard deviation of the data. The actual SD values are indicated in the text (see the Results section where this figure is cited).

functionally bound to the F₁F₀-ATP synthase. After solubilizing MgATP-SMP from liver and hepatoma with the same optimal amount of digitonin (1.5 mg/mg of protein), the monomeric (V) and dimeric (V-V) forms of the F₁F₀ complex were resolved by BN-PAGE followed by denaturing 2D SDS-PAGE and Coomassie staining (Figure 3). It was clearly evident that the D/M ratio of F₁F₀ of hepatoma SMP

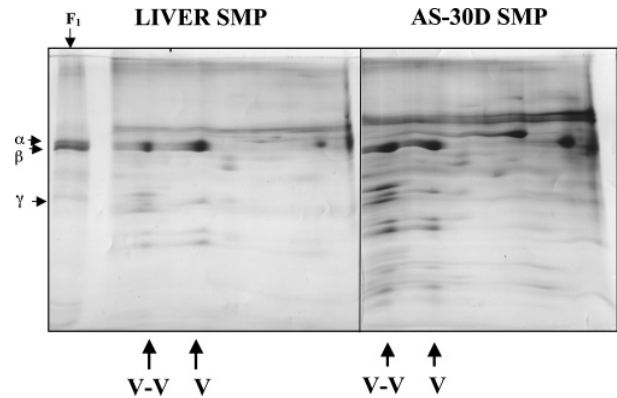


FIGURE 3: 2D SDS-PAGE resolution of dimeric and monomeric F₁F₀ in liver and AS-30D SMP. 150 μ g of SMP digitonin extracts were subjected to BN-PAGE (not shown) and 2D SDS-PAGE. The amount of dimeric F₁F₀ (V-V) was increased relative to the monomeric (V) ATP synthase in AS-30D hepatoma SMP, as compared to rat liver SMP. The right side bands that increase in AS-30D were not identified.

was higher than in SMP from normal rat liver. Densitometry analyses of the α/β bands of the F₁F₀ dimer and monomer resolved by 2D SDS-PAGE showed that the D/M ratio of ATP synthase in AS-30D SMP was 0.9 whereas in liver SMP it was 0.6. This result is similar to that found with extracted mitochondria. However, the D/M ratios are lower in SMP, presumably due to disruption of the inner membrane structure through SMP preparation. Figure 3 shows that a couple of proteins resolved just above and below the γ subunit seem to comigrate with the ATP synthase dimer and to increase in AS-30D mitochondria. However, these bands remained in the same position of 2D gels after the ATP synthase dimer was almost completely removed during activation conditions (see below, Figure 4). Thus, these proteins comigrate with the dimer but do not seem to be associated stoichiometrically with it. The increase in other proteins in AS-30D that resolved in the far right side of the 2D gel was not further explored here because those do not form part of the ATP synthase dimer or the monomer. Taken together, the data show that the higher the expression of IF₁, the higher the D/M ratio of the F₁F₀-ATP synthase.

The differences between liver and AS-30D mitochondria are not only limited to the content of IF₁. Other factors such as the lipid composition or the shifts in expression of other mitochondrial proteins (see, for example, Figure 3) might influence the D/M ratio of the ATP synthase. Therefore, to assess the actual role of IF₁ on the control of the ATP synthase dimerization, we modeled the *in vivo* IF₁ increased expression by *in vitro* reconstitution of inhibitory amounts of IF₁ into rat liver F₁F₀ of SMP devoid of IF₁. An increase in D/M ATP synthase induced by IF₁ reconstitution would indicate that this protein is a key factor promoting F₁F₀ dimerization. Therefore, rat liver SMP from which most of the endogenous IF₁ was previously released (EDTA-SMP; see Materials and Methods) were reconstituted with several concentrations of recombinant IF₁ that exerted a maximal inhibition of about 90% of the F₁F₀-ATPase activity (Figure 4). EDTA-SMP with or without reconstituted IF₁ (4 μ g/50 μ g of SMP) were solubilized and analyzed by BN-PAGE and subsequent 2D SDS-PAGE together with a control sample of Mg-ATP SMP containing the endogenous IF₁

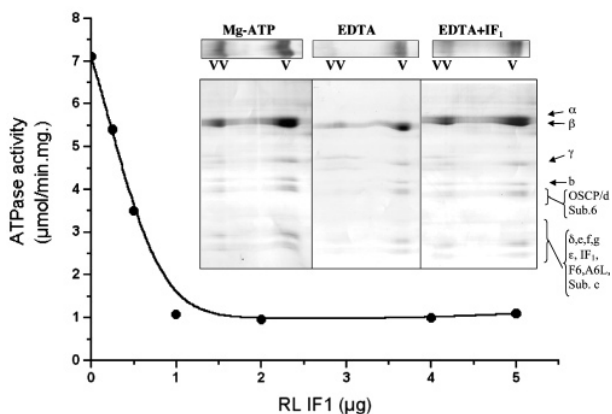


FIGURE 4: Effect of IF₁ reconstitution on the F₁F₀-ATPase activity and the D/M ratio of rat liver submitochondrial particles. 50 μg of EDTA-SMP devoid of IF₁ were incubated with the indicated amounts of recombinant IF₁ as indicated in Materials and Methods. 5 μL aliquots were withdrawn after 15 min to measure the specific ATPase activity spectrophotometrically. About 1 μg of IF₁ was enough to exert maximal ATPase inhibition (86%). Inset: 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE of SMP extracted with digitonin. Left panel, SMP containing its endogenous IF₁ (MgATP-SMP); center panel, SMP lacking most of its endogenous IF₁ (EDTA-SMP); right panel, SMP-EDTA reconstituted with saturating IF₁ (4 μg of IF₁/50 μg of SMP). The positions of the ATP synthase dimer (V-V) and its monomer (V) are indicated. Removal and reconstitution of IF₁ were carried out as described in Materials and Methods. ATPase activities of MgATP, EDTA, and EDTA-SMP reconstituted with IF₁ were 0.8, 6.5, and 1.1 μmol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹, respectively.

(Figure 4 inset). It was clearly observed that removal of IF₁ decreased the D/M ratio in SMP devoid of IF₁. Furthermore, reconstitution of saturating recombinant IF₁ restored the D/M ratio of the particulate F₁F₀-ATP synthase. To avoid ambiguity of the data due to variations in total protein loaded into the gels, average densitometries of dimeric and monomeric F₁F₀ were carried out with three different 1D and 2D gels loaded with 75 and 150 μg of protein. These analyses showed that the average D/M ratios (±SD) were 0.65 ± 0.04 for MgATP-SMP and 0.17 ± 0.04 in EDTA-SMP; i.e., removal of IF₁ vanished most of the F₁F₀ dimer. Furthermore, when recombinant IF₁ was reconstituted into EDTA-SMP, this ratio was restored to a value of 0.49 ± 0.13. Titration experiments with lower and higher amounts of IF₁ showed that maximal increase in the D/M ratio was attained with saturating inhibitory concentrations of IF₁ (about 2 μg of IF₁/50 μg of SMP). It is important to point out that according to previous studies carried out with the soluble bovine heart F₁-ATPase (29) there is no strict correlation between inhibition of ATPase activity and the propensity to form F₁-F₁ dimers as induced by the inhibitor protein; i.e., IF₁ can inhibit almost fully the F₁-ATPase in a mixture of dimeric and monomeric F₁-IF₁ complexes of different D/M ratios that exist in a dynamic equilibrium (29). Thus, although higher D/M ratios closer to or higher than 1.0 can be predicted expecting a F₁F₀ dimerization proportional to the 90% inhibition of ATPase activity, the actual D/M ratio can be lower as found here. Keeping this in mind, the recombinant rat liver IF₁ was also reconstituted into the digitonin rat liver mitochondrial extracts obtained with 2.5 mg of detergent/mg of protein to assess the ability of IF₁ to promote dimerization of the soluble F₁F₀. A modest but reproducible increase in the D/M ratio

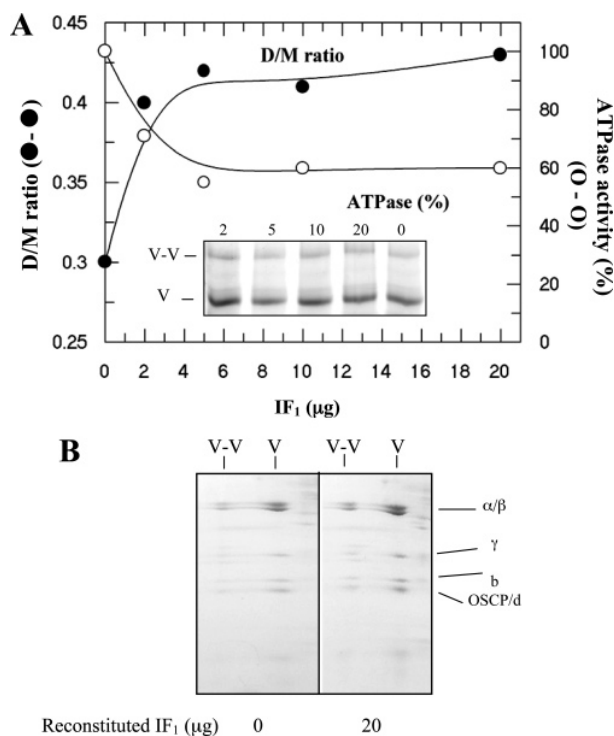


FIGURE 5: Effect of IF₁ reconstitution on the soluble F₁F₀-ATPase activity and the D/M ratio of rat liver digitonin mitochondrial extracts. (A) The indicated amounts of recombinant IF₁ isolated in solubilization buffer were reconstituted as detailed in Materials and Methods into rat liver mitochondrial digitonin extracts containing 115 μg of proteins. Immediately after IF₁ reconstitution, 2–4 μL aliquots containing 15 μg of protein were withdrawn to measure spectrophotometrically the ATPase activity in the presence of digitonin (0.05%). Controls confirmed that 0.05% digitonin did not interfere with coupling enzymes of the assay. The plot shows the average ATPase activity of two independent determinations (○). 100% ATPase activity of control samples incubated in conditions of reconstitution but without IF₁ was 1.3 μmol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹. Following ATPase determination, about 100 μg of all digitonin extracts were loaded into 1D BN-PAGE (inset). The positions of the ATP synthase dimer (V-V) and its monomer (V) are indicated. The amounts of reconstituted IF₁ (0–20 μg) are shown on top of the inset. Average D/M ratios obtained by densitometry intensities of the ATP synthase dimer and monomer bands are plotted (●). (B) Duplicate lanes of the 1D BN-PAGE (inset of panel A) containing about 100 μg of control (no IF₁, left) or reconstituted IF₁ (20 μg, right) were subjected to 2D SDS-PAGE, followed by fixation and Coomassie staining. The positions of the ATP synthase dimer (V-V) and monomer (V) as well as the resolved F₁F₀ subunits are indicated. Densitometry analyses of the α/β intensities indicated an increase in D/M ratio from 0.32 to 0.40, similar to that observed in the BN-PAGE (panel A).

was obtained after 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE from an average densitometric ratio of 0.30 to a maximal value of 0.43 (Figure 5). Remarkably, the increase in D/M ratio paralleled the decrease in ATPase activity when plotted versus the amount of IF₁ used for reconstitution (Figure 5A). The lower impact of IF₁ on ATPase activity and D/M ratios obtained with extracted F₁F₀ as compared to the particulate ATP synthase (Figure 4) is likely a reflection of inefficient IF₁ binding because it is well described that high salt concentrations (as present in the solubilization buffer, see Materials and Methods) reduce the yield of IF₁ association to F₁ and F₁F₀. Nevertheless, similar results were obtained when IF₁ was reconstituted into soluble F₁F₀ extracted with

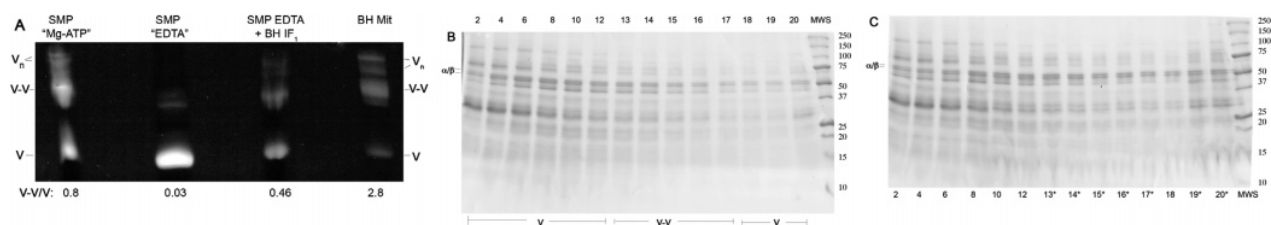


FIGURE 6: Dimerization of bovine heart F₁F₀-ATP synthase induced by reconstitution of recombinant bovine heart IF₁. Three different samples containing 12 mg of MgATP-SMP (1 sample) or EDTA-SMP (2 samples) were diluted to 20 mg of protein/mL in reconstitution buffer. One of the samples containing EDTA-SMP was reconstituted with 2 μ g of bovine IF₁/50 μ g of SMP as described in Materials and Methods. The other two samples containing MgATP-SMP or EDTA-SMP were incubated in the same conditions but without recombinant IF₁. Subsequently, aliquots of 1.5–3.0 μ L were withdrawn from each sample to measure spectrophotometrically the steady-state rate of particulate F₁F₀-ATPase activity. The specific activities obtained were 1.1, 5.4, and 0.53 μ mol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹, for MgATP, EDTA, and EDTA + IF₁ SMP, respectively. Afterward, samples were centrifuged once at 186000g at 4 °C to remove the reconstitution buffer and the excess IF₁ (if present) by discarding the supernatant. The pellet containing SMP of each sample was resuspended to 15 mg/mL in solubilization buffer and extracted with 2 mg/mL digitonin as described in Materials and Methods. Different aliquots of the digitonin extracts obtained were subjected overnight to 16 h runs of BN-PAGE (A) or 20–40% glycerol density gradient centrifugation at 4 °C (B and C) as described before (27). (A) 140 μ g of protein from the digitonin extracts of MgATP-SMP (first lane), EDTA-SMP (second lane), and EDTA-SMP reconstituted with bovine heart IF₁ (BH IF₁) (third lane) were loaded on a BN-PAGE gel that was subsequently developed for in-gel ATPase by incubation during 48 h in ATPase developing buffer as described in Materials and Methods. A control lane containing 80 μ g of a digitonin extract (1.5 mg/mg of protein) of bovine heart mitochondria was included (fourth lane, BH Mit). Densitometry of the bands of the F₁F₀-ATPase dimer (V-V), monomer (V), and higher F₁F₀ oligomers (V_n) showed the relative percentage of each component as follows: 43% (V-V), 53% (V), and 4% (V_n) for MgATP-SMP; 3% (V-V), 95% (V), and 3% (V_n) for EDTA-SMP; and 32% (V-V), 64% (V), and 4% (V_n) for EDTA-SMP + IF₁. The control lane loaded with the bovine heart mitochondrial extract showed 62% (V-V), 22% (V), and 16% (V_n), similar to the proportions obtained by densitometry of Coomassie staining of BN-PAGE (see Figure 2 and text). The F₁F₀ dimer/monomer ratios (V-V/V) of each sample are indicated at the bottom of the gel. (B, C) 0.5 mL aliquots of the digitonin extract of each SMP sample were subjected to a 16 h run of a 20–40% glycerol gradient centrifugation as described before (27). Afterward, each gradient tube was fractionated from top to bottom into 20 fractions of 1 mL each. 15 μ L aliquots of selected fractions were loaded on 10–22% gradient SDS-PAGE gels and stained with Coomassie. Gradient separation-obtained digitonin extracts of EDTA-SMP (B) and EDTA-SMP + IF₁ (C) are shown. The regions of the gradients where dimeric (V-V), monomeric (V), and multimeric (V_n) F₁F₀-ATP synthase are enriched are shown at the bottom of panel B. The positions of F₁ α/β bands are indicated, and their intensity shows the relative amount of F₁F₀ on each fraction. Fraction numbers are indicated at the top or at the bottom of each gel. Fractions where the content of dimeric and multimeric F₁F₀-ATP synthase is increased by reconstitution of recombinant bovine IF₁ are labeled with an asterisk. A similar enrichment of dimeric and multimeric bovine heart F₁F₀ at the bottom gradient fractions can be observed with mitochondrial extracts and MgATP-SMP extracts containing its endogenous IF₁. Molecular weight standards (MWS) are shown at the far right of each gel.

digitonin from rat liver SMP (not shown). We next explored more closely the range of 0–2 μ g of IF₁ where it induces sharp decreases and increases in ATPase activity and D/M ratio, respectively (Figures 4 and 5). To this end, rat liver MgATP-SMP were reconstituted with 0, 1, and 2 μ g of rat liver IF₁, and the D/M ratio of digitonin-extracted F₁F₀ was determined by BN-PAGE and densitometry as before. The average of two independent experiments showed an increase in D/M ratio from 0.45 without reconstituted IF₁ to 0.70 and 0.90 with 1 and 2 μ g of IF₁, respectively. These were among the highest D/M ratios obtained after IF₁ reconstitution and likely reflect the IF₁ binding into vacant F₁ sites in SMP. In some experiments, D/M ratios higher than 1 (1.2–1.5) were obtained after reconstitution of 2–4 μ g of IF₁/50 μ g of SMP (not shown). Taken together, the results show that IF₁ controls the D/M ratio of the whole ATP synthase in the same concentration range at which it does inhibit the ATPase activity of the F₁F₀ complex associated to the inner mitochondrial membrane.

Finally, to confirm the IF₁-promoted F₁F₀ dimerization in other systems and through experimental techniques different to BN-PAGE, bovine heart SMP were subjected to similar reconstitution experiments as those described for rat liver and hepatoma SMP. Besides BN-PAGE, in-gel ATPase activity and parallel glycerol density gradients were carried out with F₁F₀ extracted from bovine heart SMP in order to separate the F₁F₀ dimer from the monomer. MgATP-SMP, EDTA-SMP, and EDTA-SMP reconstituted with 2 μ g of IF₁/50 μ g of SMP were extracted with digitonin and subjected overnight to BN-PAGE and in parallel to 20–40% glycerol

density gradients that separate dimeric from monomeric F₁F₀ extracted from bovine heart mitochondria (27). The BN-PAGE gel was also loaded with a control sample of digitonin extract obtained from whole bovine heart mitochondria and developed for in-gel ATPase activity as described in Materials and Methods. This was carried out by incubation of the BN-PAGE gel in ATPase development buffer for 48 h to develop efficiently the residual ATPase activity of samples containing endogenous or reconstituted IF₁. Figure 6A shows that the D/M ratio can be also estimated from the ATPase development of the BN-PAGE gel. As a control, the lane containing the bovine heart mitochondrial extract obtained with 1.5 mg of digitonin/mg of protein showed a densitometric ATPase D/M ratio of 2.8, i.e., very close to the average 2.7 D/M ratio obtained with the densitometry of Coomassie-stained BN-PAGE (see Figure 2). In addition, at least two larger F₁F₀ oligomers (V_n) were also observed representing 9% and 7% of the total functional F₁F₀-ATPase. These F₁F₀ oligomers have been observed before (30, 31). Furthermore, it was also confirmed that ATPase development was proportional to the steady-state F₁F₀-ATPase activity that was measured spectrophotometrically with an ATP regenerating system (see Materials and Methods). The respective steady-state ATPase activities of MgATP-SMP, EDTA-SMP, and EDTA-SMP reconstituted with IF₁ were 1.1, 5.4, and 0.53 μ mol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹ as determined immediately after incubation of SMP with or without IF₁. As shown in Figure 6A, the development of ATPase activity in the BN-PAGE correlated with the IF₁ content of SMP; i.e., it was higher for EDTA-SMP, intermediate for MgATP-

SMP, and lower for EDTA-SMP reconstituted with IF₁. Finally, the BN-PAGE combined with ATPase development and densitometry showed clearly that the D/M ratio decreased from 2.8 in the bovine heart mitochondrial extract to 0.81 in MgATP-SMP. This ratio decreased dramatically to 0.03 after removal of IF₁ in EDTA-SMP (concomitant to an increase in ATPase activity of the F₁F₀ monomer), and reconstitution of IF₁ brought a partial recovery of the D/M ratio to 0.5 with an overall decrease in ATPase activity. In addition, it was observed that IF₁ reconstitution also induced the recovery of ATP synthase oligomers larger than the dimer (V_n in Figure 6A). On the other hand, fractionation of the glycerol gradients and subsequent SDS-PAGE showed similar results in that in comparison to EDTA-SMP (Figure 6B), reconstitution of IF₁ into these particles increased the F₁F₀ content in fractions 13–20 where the F₁F₀ dimer and higher ATP synthase oligomers were enriched (Figure 6C). A similar but higher enrichment of the dimer and higher oligomers was also observed in gradients carried out with digitonin extracts from bovine heart mitochondria or MgATP-SMP containing the endogenous IF₁ (not shown; see also ref 27). No densitometry calculations of D/M ratios were obtained from these gradients because the fractions are not continuous in the gels (Figure 6B,C); however, good D/M estimations were obtained from Figure 6A. In conclusion, the inhibitory protein promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase from mitochondria of different higher eukaryots, and it also promotes its polymerization to form higher ATP synthase oligomers. However, no strict correlation exists between maximal inhibition by IF₁ and maximal yield of F₁F₀ dimerization. This is likely because other protein factors different from IF₁ are essential for F₁F₀ dimerization and polymerization in the inner mitochondrial membrane.

DISCUSSION

The salient result of this work is that the increased expression or the reconstitution of the inhibitory protein (IF₁) increases the D/M ratio of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase in whole mitochondria and in submitochondrial particles. Therefore, our overall results show that IF₁ promotes and/or stabilizes the dimeric structure of the F₁F₀ complex. These results are in apparent contrast with previous studies showing that genetic or physical removal of IF₁ in yeast mitochondria and bovine SMPs, respectively, does not prevent ATP synthase dimerization (14, 15). However, the prevalence of the F₁F₀ dimer as formed through F₀ interactions by other subunits such as e or g in the absence of IF₁ (14) does not discard a possible role of IF₁ on the formation or stabilization of the F₁F₀ dimer through F₁-F₁ bridging. By studying the effect of increased expression or reconstitution of IF₁, we used two alternative approaches that together with statistical averages of densitometry analyses of BN-PAGE and 2D SDS-PAGE complement each other to support the same conclusion: the inhibitory IF₁ binding contributes to the formation of the F₁F₀ dimer. Rat liver and AS-30D hepatoma offer a unique comparative system to assay the effect of IF₁ increased expression in whole mitochondria, because IF₁ is stoichiometric in relation to F₁ in rat liver (21). Thus, the effect of a 2-fold IF₁ increased expression as in AS-30D hepatoma on the ag-

gregation state of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase was comparatively assessed with rat liver mitochondria. Furthermore, by modeling the IF₁ increased expression with reconstitution of the recombinant IF₁ on SMP devoid of IF₁, we confirmed the role of IF₁ in promoting the dimerization of the whole ATP synthase associated to the inner mitochondrial membrane. A similar reconstitution experiment carried out with the bovine IF₁ and SMP showed no changes in the D/M ratio of the ATP synthase extracted with Triton X-100 (15). Because the dimeric ATP synthase extracted with Triton X-100 is less enriched and inactive (15), compared to that obtained with digitonin, which is highly enriched and functional as ATPase (see Figure 6A and refs 19 and 27), we consider that the dimeric ATP synthase extracted with digitonin is structurally and functionally a better model to study the changes in the D/M ratio of the ATP synthase dimer. In this regard, we have also observed oligomycin sensitivity and IF₁-increased D/M ratio on the digitonin-extracted and sucrose gradient-purified bovine F₁F₀ (see Figure 6B,C), together with an IF₁ increase in D/M ratio of lauryl maltoside-extracted F₁F₀ from rat liver mitochondria (not shown). Besides, restoration of the D/M ratio by reconstitution of exogenous IF₁ after removal of the endogenous IF₁ in EDTA-SMP (Figures 4–6) discards a significant instability or irreversible denaturation of the F₁F₀ dimer or monomer caused by the activation conditions used to release IF₁ from SMP; otherwise, restoration of the D/M ratio by IF₁ would not be observed. Furthermore, the finding that recombinant IF₁ also increases the D/M ratio of the digitonin-extracted ATP synthase in negative parallelism with a partial inhibition of the F₁F₀-ATPase activity (Figure 5) confirms that IF₁ promotes or stabilizes the dimeric F₁F₀ structure. Nevertheless, the lower impact of IF₁ on the D/M ratio and on ATPase activity of soluble F₁F₀ as compared with its effects in SMP indicates that IF₁ is less efficiently reconstituted to soluble F₁F₀ in the solubilization media than in SMP. This might be related to the high salt concentrations (EACA and Tris) in the solubilization buffer that are known to decrease IF₁ binding to F₁F₀. However, this also suggests that IF₁ is more efficient to promote or stabilize the F₁F₀ dimer when it is integrated in the inner mitochondrial membrane than when it is solubilized in digitonin micelles. Finally, the promotion of F₁F₀ dimerization by IF₁ was also confirmed in the bovine heart mitochondrial system. Removal and reconstitution of bovine IF₁ from and into SMP controlled dimerization and even higher order oligomerization of the bovine F₁F₀ (Figure 6). This was confirmed by developing of ATPase activity in the BN-PAGE gel (Figure 6A) and by enrichment of dimeric and multimeric F₁F₀ in the bottom fractions of glycerol density gradients carried out after reconstitution of IF₁ into EDTA-SMP (Figure 6B,C). Thus, the role of IF₁ in the dimerization of F₁F₀ is not exclusive of rat liver, but it is extended into bovine heart mitochondria, and we also have evidence that the same effect of IF₁ occurs in human mitochondria from cultured cells (Cortés-Hernández et al., submitted for publication). It seems therefore that the high propensity to dimerize of IF₁ from mitochondria of higher eukaryots is the key factor that lacks the yeast IF₁ to contribute in the dimerization of the whole F₁F₀ in yeast mitochondria.

On the other hand, the present results showing that IF₁ contributes to F₁F₀ dimerization are consistent with a number

of structural and biophysical studies. It is well documented that IF₁ adds stability to the soluble F₁ and to the whole ATP synthase in SMP to denaturants and high pressure (32, 33). This is also in consonance with the observed IF₁-induced dimerization of the soluble F₁ (13, 29). Therefore, a structure similar to that of the soluble F₁I dimer could exist in the whole dimeric F₁F₀ of the inner mitochondrial membrane. The location of IF₁ on the native structure of the F₁F₀-ATP synthase molecule is an unresolved issue that has been studied for several decades. Cross-linking (8–10) and subsequent crystallographic analyses (11) have shown that IF₁ binds in a cleft formed by an α/β interface and the γ subunit, thus hindering catalytic conformational changes as well as rotary motions of the central stalk (10, 11). On the other hand, the C-terminal sides of two IF₁s form a coiled coil structure that is instrumental in the dimerization of two soluble F₁ molecules bound to their N-termini. Our results indicate that, in order to stabilize the dimeric structure of the whole F₁F₀ molecule, IF₁ must form a bridge between both extramembranal F₁ parts. Recently, we resolved the structure of the dimeric F₁F₀-ATP synthase from bovine heart mitochondria by high-resolution electron microscopy (EM) (27). It is relevant that the MF₁F₀ dimer showed a crossed bridging protein density between the two F₁ moieties which is reminiscent of the IF₁ bridge found in the crystal structure of the F₁-I complex (11).

On the basis of these cross-linking, crystallographic, and EM antecedents together with our present data, the approximate position of the IF₁ bridge in the whole rat liver F₁F₀ is proposed in Figure 7. According to a previous model of monomeric F₁F₀ (34), the location of IF₁ in the dimer interface was modeled by simple fitting of the crystal structure of rat liver F₁-ATPase (35) with a model of the rat liver IF₁ constructed with the software SWISS-MODEL according to the coordinates of the bovine IF₁ (36). A bent conformer of the four crystallographic bovine IF₁ structures (36) was used to form a crossed IF₁ dimer in the F₁F₀ dimer interface. Using RASMOL 2.6, the inhibitory N-terminal IF₁ sides were oriented close to the rotor/stator interfaces between α/β and γ/ϵ subunits, whereas the C-terminal sides were bent upward close to the position of the OSCP subunits according to cross-linking and crystallographic studies (10, 11). To accommodate the two IF₁ molecules in a F₁-F₁ distance of about 10 Å as observed in the bovine F₁F₀ dimer (27), IF₁ bending was necessary to reduce the observed 62 Å that separate the extended structure of the IF₁ dimer (11). In the present model, the C-terminal sides of both IF₁s are proposed to cross the interface and interact with the OSCP subunit of the neighboring monomer. Crossed protein structures have been observed in the bovine heart IF₁ crystal (36) and in the iron sulfur protein (ISP) of the dimeric *bc*₁ respiratory complex III (37). However, in the *bc*₁ complex the bridging protein ISP induces crossed-electron transfer (38, 39). In contrast, in this proposed position, the IF₁ protein would have a better resistance to the rotational drag of the central rotor, which is one of its conformational targets for inhibition (27). Thus, this working model explains how IF₁ can stabilize the F₁F₀ dimer, and reciprocally, the dimeric F₁F₀ will reinforce the inhibitory function of IF₁. The exact position of IF₁ in the dimeric F₁F₀ will wait for further structural analyses of higher resolution. Our conic working model of the rat liver F₁F₀ dimer was constructed according

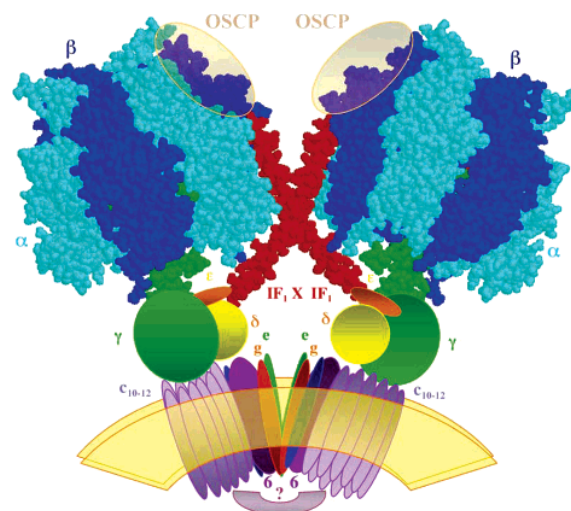


FIGURE 7: Working model of the possible accommodation of the IF₁ bridge on the rat liver dimeric F₁F₀. A structural model of rat liver IF₁ was obtained from a bent conformer of the four resolved for bovine heart IF₁ (36). The model was obtained with the software SWISSMODEL (42–44). Two identical rat liver IF₁ molecules were fitted manually into the F₁-F₁ interface by using RASMOL 2.6. The overall model was made according to the EM structure of bovine heart F₁F₀ that shows a crossing F₁-F₁ bridge in the dimer interface attributable at least in part to IF₁ (27). Distances and orientations are approximate, and the possible accommodation of dimerizing subunits e and g in the F₀-F₀ interface is shown. Another F₀-F₀ bridging structure (?) of unknown composition observed in the bovine heart dimer (27) was also depicted on the intermembrane space side. The C-terminal sides of both IF₁s are proposed to bend and cross the dimer interface to contact the subunit OSCP, as observed by cross-linking results (45, 46). Peripheral stalk subunits are not shown for simplicity; they are likely to form part of the dimer interface (27). Subunits are named according to their respective color; the dark blue F₀ subunit close to subunit 6 is subunit A6L. See text for further details.

to the EM structure of the dimeric bovine heart F₁F₀ (27) assuming a 1:1 stoichiometry of IF₁ per F₁F₀ in the ATP synthase dimer, as found in soluble F₁-I and monomeric F₁F₀-I complexes; however, the exact stoichiometry remains to be determined. The model does not exclude that other second stalk subunits presumably located in the dimer interface (27) (not shown) would also contribute to the observed F₁-F₁ crossing bridge. In this dimer, the close F₀-F₀ interface is likely formed by dimerizing subunits e and g, together with another F₀-F₀ bridging protein of unknown composition (?) that lies on the intermembrane space side (see Figure 7).

Finally, it has recently been shown that an important role of F₁F₀ dimerization is to induce the formation of the inner membrane cristae of mitochondria. Mutations that disrupt the dimeric structure of the ATP synthase shift the shape of the inner mitochondrial membrane from the normal cristae into several concentric layers within enlarged “onion-like” mitochondria (17, 30, 31, 40). Thus, the dimeric conic structure of F₁F₀ is a primary building block that polymerizes to form an arc in a budding inner membrane which eventually forms tubular cristae wrapped by a helical F₁F₀ polymer (41). By bridging the F₁F₀ dimer, IF₁ should also add stability to the formation of mitochondrial cristae. Experiments are under way in our laboratory to assess the possible role of IF₁ in the stability of the ATP synthase dimer that gives shape to mitochondrial cristae of transfected cells and to confirm the

identity of the F_1 - F_1 bridge of the bovine heart F_1F_0 -ATP synthase dimer.

ACKNOWLEDGMENT

The valuable suggestions of Prof. Armando Gómez Puyou from the National University of México (UNAM) on the initial manuscript are gratefully acknowledged. The technical assistance of Concepción Bravo and Fernando Minauro-Sanmiguel in the initial part of this work is also acknowledged. The cloned gene of bovine heart IF_1 was a generous gift of Prof. John E. Walker (Medical Research Council, Cambridge, U.K.). The cloned gene of rat liver IF_1 was derived from the pMal- IF_1 plasmid that was a generous gift of Prof. Roderick A. Capaldi (University of Oregon), and it was originally constructed and generously gifted by Prof. Peter L. Pedersen (The Johns Hopkins University, Baltimore).

REFERENCES

- Noji, H., and Yoshida, M. (2001) The rotary machine in the cell, ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 276, 1665–1668.
- Boyer, P. D. (2002) Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis, *FEBS Lett.* 512, 29–32.
- García, J. J. (2000) *The F_0F_1 -ATP synthase: binding energy, coupling and rotational catalysis*, Vol. 1, 1st ed., Transworld Research Network, Trivandrum.
- Wilkens, S., and Capaldi, R. A. (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F_1 and F_0 parts of the *Escherichia coli* ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 93–97.
- García, J. J., and Capaldi, R. A. (1998) Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in *Escherichia coli* F_1 -ATPase, *J. Biol. Chem.* 273, 15940–15945.
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., and Vignais, P. V. (1981) Photoaffinity labeling of mitochondrial adenosine triphosphatase by an azido derivative of the natural adenosine triphosphate inhibitor, *Biochemistry* 20, 1339–1344.
- Hashimoto, T., Negawa, Y., and Tagawa, K. (1981) Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase—stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme, *J. Biochem. (Tokyo)* 90, 1151–1157.
- Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1988) The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F_1 beta-subunit, *FEBS Lett.* 229, 224–228.
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N., and Tagawa, K. (1993) Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between alpha- and beta-subunits of F_1F_0 ATPase upon de-energization of mitochondria, *J. Biochem. (Tokyo)* 113, 350–354.
- Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and García, J. J. (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF_1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase, *J. Bioenerg. Biomembr.* 34, 433–443.
- Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F_1 -ATPase in complex with its regulatory protein IF_1 , *Nat. Struct. Biol.* 10, 744–750.
- Cabezón, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F_1 -ATPase inhibitor protein, IF_1 , by pH, *J. Biol. Chem.* 275, 25460–25464.
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., and Walker, J. E. (2000) Dimerization of bovine F_1 -ATPase by binding the inhibitor protein, IF_1 , *J. Biol. Chem.* 275, 28353–28355.
- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H., and Stuart, R. A. (2002) Formation of the yeast F_1F_0 -ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, $Inh1$, *J. Biol. Chem.* 277, 39289–39295.
- Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D. A., Mavelli, I., and Lippe, G. (2002) Dimerization of F_0F_1 ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF_1 , *Biochim. Biophys. Acta* 1556, 133–141.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., and Schagger, H. (1998) Yeast mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits, *EMBO J.* 17, 7170–7178.
- Arselin, G., Giraud, M. F., Dautant, A., Vaillier, J., Brethes, D., Couлары-Salin, B., Schaeffer, J., and Velours, J. (2003) The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane, *Eur. J. Biochem.* 270, 1875–1884.
- Bustos, D. M., and Velours, J. (2005) The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 280, 29004–29010.
- Krause, F., Reifschneider, N. H., Goto, S., and Dencher, N. A. (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 583–590.
- Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 154–159.
- Schwerzmann, K., Hüllihen, J., and Pedersen, P. L. (1982) Proton adenosine triphosphatase complex of rat liver mitochondria. Interaction with the ATPase inhibitor peptide covalently labeled with *N*-hydroxysuccinimidyl-*p*-azidobenzoate, *J. Biol. Chem.* 257, 9555–9560.
- Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Rios, E., Rodriguez-Zavala, J. S., and García, J. J. (2004) Overexpression of the inhibitor protein IF_1 in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F_1F_0 ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies, *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 257–264.
- Lebowitz, M. S., and Pedersen, P. L. (1993) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence, overexpression, and secondary structural characterization of a functional protein inhibitor, *Arch. Biochem. Biophys.* 301, 64–70.
- Van Heeke, G., Deforce, L., Schnizer, R. A., Shaw, R., Couton, J. M., Shaw, G., Song, P. S., and Schuster, S. M. (1993) Recombinant bovine heart mitochondrial F_1 -ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification, and structural studies, *Biochemistry* 32, 10140–10149.
- 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.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and García, J. J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F_0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12356–12358.
- García, J. J., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1995) Inhibition by trifluoperazine of ATP synthesis and hydrolysis by particulate and soluble mitochondrial F_1 : competition with H_2PO_4 , *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 127–136.
- Dominguez-Ramirez, L., Mendoza-Hernandez, G., Carabez-Trejo, A., Gomez-Puyou, A., and Tuena de Gomez-Puyou, M. (2001) Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F_1 -inhibitor protein complexes, *FEBS Lett.* 507, 191–194.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology, *EMBO J.* 21, 221–230.
- Gavin, P. D., Prescott, M., Luff, S. E., and Devenish, R. J. (2004) Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae, *J. Cell Sci.* 117, 2333–2343.
- de Gomez-Puyou, M. T., Dominguez-Ramirez, L., Perez-Hernandez, G., and Gomez-Puyou, A. (2005) Effect of denaturants on multisite and unisite ATP hydrolysis by bovine heart submitochondrial particles with and without inhibitor protein, *Arch. Biochem. Biophys.* 439, 129–137.
- Fornells, L. A., Guimaraes-Motta, H., Nehme, J. S., Martins, O. B., and Silva, J. L. (1998) Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F_1 -ATPase, *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 304–312.
- García, J. J., Minauro-Sanmiguel, F., and Bravo, C. (2002) in *Recent Research Developments in Human Mitochondrial Myopathies* (García, J. J., Ed.) p 21, Research Signpost, Trivandrum.

35. Bianchet, M. A., Hüllihen, J., Pedersen, P. L., and Amzel, L. M. (1998) The 2.8-Å structure of rat liver F₁-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11065–11070.
36. Cabezón, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2001) The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase, *EMBO J.* 20, 6990–6996.
37. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex, *Science* 281, 64–71.
38. Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2002) Inhibitory analogs of ubiquinol act anti-cooperatively on the yeast cytochrome bc₁ complex. Evidence for an alternating, half-of-the-sites mechanism of ubiquinol oxidation, *J. Biol. Chem.* 277, 1195–1202.
39. Covian, R., Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2004) Anti-cooperative oxidation of ubiquinol by the yeast cytochrome bc₁ complex, *J. Biol. Chem.* 279, 15040–15049.
40. Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D., and Velours, J. (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology, *J. Biol. Chem.* 279, 40392–40399.
41. Allen, R. D. (1995) Membrane tubulation and proton pumps, *Protoplasma* 189, 1–8.
42. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31, 3381–3385.
43. Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
44. Peitsch, M. (1995) Protein modeling by E-mail, *BioTechnology* 13, 658–660.
45. Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A., and Papa, S. (2004) Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase, *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 447–457.
46. Papa, S., Zanotti, F., and Gaballo, A. (2000) The structural and functional connection between the catalytic and proton translocating sectors of the mitochondrial F1F0-ATP synthase, *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 401–411.

BI060339J