



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DEL NUEVO MECANISMO DE CONTROL DE LA
 F_1F_0 ATPASA DE LA α - PROTEOBACTERIA *Paracoccus denitrificans*
MEDIADO POR LA SUBUNIDAD ζ

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)

PRESENTA:

ILSE MARIEL ZARCO ZAVALA

TUTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIETTA TUENA SANGRI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. HELIODORO CELIS SANDOVAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José de Jesús García Trejo en el laboratorio 117 y 206 del Departamento de Biología del Edificio F de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de México

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto Fisiología Celular, UNAM
Dr. Heliodoro Celis Sandoval	Instituto Fisiología Celular, 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 realizaron experimentos de centrifugación.

Se reconoce la colaboración del Dr. Gerardo Pérez Hernández, del Departamento de Ciencias Naturales, UAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de calorimetría isotérmica de titulación.

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de identificación de péptidos mediante espectrometría de masas.

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 experimentos de fluorescencia de residuos aromáticos.

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 la subunidad ϵ de *Paracoccus denitrificans* con la ablación de 9 aminoácidos de su porción carboxilo terminal.

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* en presencia y ausencia de nucleótido; y quien nos brindó amablemente los plásmidos con las subunidades silvestre y Δ NT de la subunidad ζ de *Jannaschia* sp.

Se reconoce la asesoría técnica del Lic. Héctor Malagón Rivero en los experimentos de producción de anticuerpos policlonales en conejo.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Edgar Morales Ríos durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACyT CB167622 y PAPIIT-DGAPA-UNAM IN211012. Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACyT.

El Jurado del Examen Doctoral está constituido por:

Presidente:	Dr. Diego González Halphen.
Secretario:	Dr. José de Jesús García Trejo.
Vocal:	Dr. Salvador Uribe Carvajal.
Vocal:	Dr. Alejandro Fernández Velasco.
Vocal:	Dra. Marina Gavilanes Ruíz.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral ha sido llevada a cabo gracias al inestimable apoyo de muchas personas, a las que me gustaría agradecer:

A la **Dra. Marietta Tuena Sangri** y el **Dr. Armando Gómez Puyou** por aceptarme en su laboratorio y dejarme convivir con ustedes, por revelarme la belleza de la ciencia y la pasión con la que ésta debe realizarse, por enseñarme que no importando cuanto se sepa del campo, la curiosidad y el asombro son valores que deben persistir, por mostrarme que la forma más divertida de hacerse preguntas es mediante experimentos y por ser los grandes científicos y personas que han sido.

A mi director de tesis, el **Dr. José de Jesús García Trejo**, por que desde que entré a su laboratorio no ha dejado de brindarme su apoyo incondicional, tanto dentro como fuera de éste; por que me ha dedicado su tiempo y guía a través de mi proyecto y por que me ha enseñado, con su ejemplo, que amar lo que uno hace brinda grandes satisfacciones en la vida.

A mi mamá **Irma Zavala Torres** por ser el mejor modelo de mujer que he conocido, por enseñarme que a base de tenacidad e inteligencia se consiguen las mejores triunfos, por estar ahí cada momento con el consejo certero, con todo el amor y comprensión que siempre he necesitado.

A mi papá **Fernando Zarco Romero**, por ser quien es, enseñarme que siempre hay otra forma de ver las cosas , que los valores más importantes son los que uno se imponga y por todo el amor y seguridad que siempre he sentido a su lado.

A mi hermana **Pamela Zarco Zavala** por transmitirme la importancia de la curiosidad y por enseñarme que los imprevistos de la vida te pueden hacer más fuerte y más capaz. Estoy orgullosa de ti.

A mi mamá **María Luisa Torres** y mi papá **Florencio Zavala**, por brindarme todo su amor y cuidados desde el primer día de mi vida, además de enseñarme que el avance de una familia se construye de amor y mucho trabajo duro.

A mi **cuñado** y a todos mis **tíos, tías, primos y primas** por su incondicionalidad, por que en cualquier situación siempre seremos un equipo.

A mi nueva **familia** por aceptarme como uno de ellos y por su apoyo constante.

A mi amigos **Alejandra Hernández, David Balbuena, Gustavo De la Rosa, Diana García, Ahiram Hernández, Gabriel Pérez y Paulette Fernández** por con ustedes los triunfos se disfrutan más y las penas duelen menos.

A mis compañeros del laboratorio **Fernando Minauro, Paulina Cortés, Edgar Morales, Sergio Couoh, Carlos Chávez, Verónica Posadas, Francisco Mendoza y Raquel Ortega**, por todas sus enseñanzas y apoyo durante las horas y horas que compartimos en el laboratorio.

Y finalmente, a **Lázaro Vázquez Sánchez**, por dejarme compartir la vida contigo, por llenar mi días con amor y alegría, por que después de todos los cambios que hemos sufrido en este tiempo aun te veo y me lleno de ilusión, por ser mi mejor amigo y mi cómplice de aventuras. Por ser mi pasado, mi presente y mi futuro te dedico este trabajo. Te amo.

¡Gracias!

Caracterización del nuevo mecanismo de control de la F_1F_0 -ATPasa de la α - proteobacteria *Paracoccus denitrificans* mediado por la subunidad ζ .

Índice

Reconocimientos	2
Agradecimientos	4
Índice	6
Resumen	8
Abstract	9
Abreviaturas	10
Introducción	11
I. La F_1F_0 ATP sintasa: Función, estructura y mecanismo catalítico	11
II. Mecanismos regulatorios de la actividad de ATPasa	18
i. Mecanismo bacteriano: subunidad ϵ	18
ii. Mecanismo de cloroplasto: Entrecruzamiento disulfuro de la subunidad γ de cloroplasto	22
iii. Mecanismo mitocondrial: Proteína IF_1	23
III. <i>Paracoccus denitrificans</i>	27
i. <i>P. denitrificans</i> como organismo modelo	27
ii. La ATP sintasa de <i>P. denitrificans</i> y el mecanismo regulatorio de su actividad de ATPasa	29
Planteamiento del Problema	31
Hipótesis	31
Objetivos	32
Resultados	32
I. Cinética de la inhibición de $Pd\zeta$ sobre la PdF_1 -ATPasa	32
II. Interacciones de la subunidad ζ en la porción PdF_1 aislada	35
III. Conservación evolutiva del mecanismo inhibitorio mediado por la subunidad ζ en las F_1F_0 -ATPasas de α -proteobacterias	41
IV. Identificación del dominio inhibitorio de la subunidad ζ	45
V. Conservación de la función inhibitoria de la subunidad ζ en la clase de las α -proteobacterias	56
VI. Determinación de la afinidad del sitio de unión a nucleótido de la $Pd\zeta$	57

Discusión	60
I. Cinética de inhibición de la Pd ζ sobre la PdF ₁ -ATPasa	60
II. Mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ	61
III. Conservación del mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ	64
IV. Regulación de la capacidad inhibitoria de la subunidad Pd ζ	65
Conclusiones	66
Materiales y Métodos	67
I. Determinación de proteína por el método de Lowry	67
II. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	67
i. Schagger, H. y Von Jagow G. (140)	67
ii. Laemmli, U. K. (119) no reductora	68
iii. Electroforesis en 2 dimensiones (no reductora -- reductora) (73)	68
III. Ensayo de hidrólisis de ATP	69
i. Liberación de fosfatos (141)	69
ii. Espectrofotométrico (142)	70
IV. Obtención de anticuerpo policlonal anti-Pde	72
V. Técnica de Western Blot	72
VI. Acoplamiento del anticuerpo anti anti-Pde y anti-Pd ζ a esferas de agarosa proteína G	73
VII. Amplificación, clonación y sobre-expresión de la subunidad Pd $\zeta^{\Delta NT}$, Js ζ^{WT} y Js $\zeta^{\Delta NT}$	73
VIII. Purificación de la porción F1 de Paracoccus denitrificans a partir de membranas	74
i. Preparación de membranas invertidas (PSB) de P. denitrificans	75
ii. Purificación de la PdF1 mediante cromatografía.	75
IX. Purificación del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$	76
X. Purificación de las subunidades Pd ζ^{WT} y Pd $\zeta^{\Delta NT}$.	77
XI. Purificación de la subunidad ϵ^{WT} de Paracoccus denitrificans	78
XII. Purificación de las subunidades Pd $\epsilon^{\Delta CT}$, Js ζ^{WT} y Js $\zeta^{\Delta NT}$	79
XIII. Entrecruzamiento químico de la PdF ₁	80
XIV. Calorimetría de titulación isotérmica	82
XV. Proteólisis limitada de la PdF ₁	82
XVI. Reconstitución de Pd ζ y Pde en PdF ₁ y $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$	83
XVII. Ensayos de competencia entre las mutantes de Pd ζ	83
XVIII. Construcción del árbol filogenético de las subunidades ϵ	84
XIX. Ajuste de los gráficos de inhibición enzimática.	84
Referencias	85
Publicaciones	94

Resumen

La F_1F_0 -ATP sintasa es un nanomotor reversible, localizado en las membranas transductoras de energía de bacterias, cloroplastos y mitocondrias, que sustenta la vida produciendo ATP. Esto lo lleva a cabo acoplando la fuerza protón-motriz ($\Delta\mu_{H^+}$) a través de una membrana con la síntesis química de ATP a partir de ADP y P_i . Mientras que su estructura básica y su mecanismo se han conservado en todo el reino biológico, los retos específicos que cada ATP sintasa debe enfrentar dentro de cada célula han originado adaptaciones particulares con el fin de obtener un funcionamiento óptimo. Un ejemplo de estas modificaciones son los diversos mecanismos regulatorios de la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima; esta actividad constituye un mecanismo de generación de $\Delta\mu_{H^+}$, sin embargo también puede conducir a una pérdida deletérea de ATP en condiciones de bajo $\Delta\mu_{H^+}$. Esta pérdida de ATP ocurre por ejemplo en la hipoxia o anoxia en las bacterias y mitocondrias, o en condiciones de baja intensidad de luz en las bacterias fotosintéticas o en los cloroplastos. A lo largo de la evolución biológica, algunas subunidades reguladoras o dominios se han integrado a la estructura del complejo F_1F_0 para inhibir la hidrólisis de ATP, como son la subunidad reguladora ϵ de las bacterias, la proteína inhibidora IF_1 de las mitocondrias, y un puente disulfuro en la subunidad y del rotor central de la enzima de cloroplasto; estos mecanismos han sido ampliamente caracterizados.

En contraste, el mecanismo regulatorio de la ATPasa de las α - proteobacterias, una clase filogenéticamente relacionada con el ancestro de la mitocondria, permaneció desconocido hasta que nuestro grupo descubrió una nueva subunidad inhibidora en la ATP sintasa de la α - proteobacteria *Paracoccus denitrificans* y que fue denominada “ ζ ” (1). Esta subunidad no está relacionada en secuencia ni en estructura con los inhibidores canónicos bacteriano (ϵ) o mitocondrial (IF_1), indicando la existencia de un mecanismo inhibitorio novedoso de la F-ATPasa. Con el fin de diseccionar este mecanismo particular, realizamos la caracterización de la subunidad ζ de la F_1 -ATPasa de *P. denitrificans* ($Pd\zeta$), a través de enfoques cinéticos, bioquímicos, bioinformáticos, proteómicos, y estructurales. Encontramos que la subunidad ζ es el inhibidor natural de la F-ATPasa conservado en las α - proteobacterias, el cual exhibe una fuerte inhibición de la F_1 , de manera independiente de la subunidad ϵ , a través de la obstrucción de la rotación del tallo central mediante su dominio inhibitorio N-terminal altamente conservado. Finalmente, también se observó que la subunidad ζ tiene un motivo de unión a nucleótidos, que regula su capacidad inhibitoria. En conclusión, este trabajo identifica un nuevo mecanismo de control del nanomotor F_1F_0 - ATP sintasa bacteriano, que permitirán comprender la evolución de los mecanismos regulatorios de la ATP sintasa.

Abstract

The F_1F_0 -ATP synthase is a reversible nanomotor, found in the energy-transducing membranes of bacteria, chloroplasts and mitochondria, and fuels life coupling a transmembrane proton-motive force ($\Delta\mu_{H^+}$) to the chemical synthesis of ATP from ADP and Pi. While its basic structure and mechanism have been conserved throughout the biological kingdom, the specific challenges that every ATP synthase should confront in each particular cell have promoted individual adaptations to obtain an optimal operation. An example of these modifications is the diversity of mechanisms for regulating ATP hydrolysis; this activity represents a powerful mechanism to generate a $\Delta\mu_{H^+}$, but it can also lead to a detrimental loss of ATP under conditions of low $\Delta\mu_{H^+}$ during hypoxia in bacteria and mitochondria or low light in photosynthetic bacteria and chloroplasts. Therefore, through biological evolution, some regulatory subunits or domains have been integrated to the structural core of the F_1F_0 complex to inhibit ATP hydrolysis, such as the regulatory ϵ subunit of bacteria, the inhibitor IF_1 protein of mitochondria, and a disulphide bridge at the γ subunit of the central rotor of the chloroplast enzyme; these mechanisms have been well characterized.

In contrast, the regulatory mechanism of the F_1F_0 of α -proteobacteria, a class phylogenetically related with the ancestor of mitochondria, was unknown until our group discovered a novel inhibitory subunit in the ATP synthase of the α -proteobacterium *Paracoccus denitrificans* denominated ζ (1). Interestingly, this subunit is not related neither in sequence nor in structure to the canonical F_1 -ATPase inhibitors from bacteria (ϵ) or mitochondria (IF_1), unveiling a completely novel regulatory mechanism F_1F_0 nanomotor. In order to resolve this new regulatory mechanism, the characterization of the *P. denitrificans* F_1 -ATPase ζ subunit ($Pd\zeta$) was carried out by combination of kinetic, biochemical, bioinformatic, proteomic, and structural approaches, resolving that the ζ subunit is a natural F -ATPase inhibitor conserved all along the α -proteobacteria class which exhibits a strong inhibitory function of the F_1 -ATPase in a manner independent of ϵ subunit, through the interference with rotation of the central stalk by its highly conserved N-terminal inhibitory domain. Furthermore, it was observed that the ζ subunit has a nucleotide-binding motif, which regulates its inhibitory capacity. This work provides the basis of a new mechanism controlling the bacterial F_1F_0 -ATP synthase nanomotor, which will help to understand the evolution of the ATP synthase regulatory mechanisms.

Abreviaturas

2-IT ---- 2-iminotiolano
2D-SDS-PAGE ---- Electroforesis en dos dimensiones de geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
ADP ---- Adenosín difosfato
ATP ---- Adenosín-5'-trifosfato
BLAST ---- Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
CD ---- Dicroísmo circular
DEAE ---- Dietilo-amino etilo
DEAH ---- Dietilo- amino hexilo
DTT ---- Ditiotreitól
DUF ---- Dominio de función desconocida
Ec ---- *Escherichia coli*
EDTA ---- Ácido etilendiaminotetraacético
IC₅₀ ---- Concentración de inhibición media máxima
IF₁ ---- Proteína inhibidora
IPTG ---- Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITC ---- Calorimetría de titulación isotérmica
Js ---- *Jannaschia sp.*
Jsζ^{WT} ---- Subunidad ζ silvestre de *Jannaschia sp*
Jsζ^{ΔNT} ---- Subunidad ζ²⁰⁻⁹⁹ de *Jannaschia sp*
ORF ---- Marco de lectura abierto
PBS ---- Amortiguador de fosfatos
PCR ---- Reacción en cadena de la polimerasa
Pd ---- *Paracoccus denitrificans*
Pdζ^{WT} ---- Subunidad ζ silvestre de *P. denitrificans*
Pdζ^{ΔNT} ---- Subunidad ζ¹⁴⁻¹⁰⁴ de *P. denitrificans*
PEP ---- Fosfoenolpiruvato
P_i ---- Fosfato inorgánico
PK/LDH ---- Piruvato cinasa / Lactato deshidrogenasa
PVDF ---- Polifluoruro de vinilideno
Q_{HP} Sepharose ---- Q Sefarosa de alto rendimiento
RMN ---- Resonancia magnética nuclear
TCA ---- Ácido tricloroacético
TEV ---- Proteasa del virus del tabaco
WB ---- Western Blot

Introducción

I. La F_1F_o ATP sintasa: Función, estructura y mecanismo catalítico

La ATP sintasa es el nanomotor ubicuo que sostiene energéticamente a todas las formas de vida, proporcionándoles la mayoría del ATP necesario para realizar las múltiples reacciones dependientes de energía que comprenden su metabolismo. La ATP sintasa es una enzima multiproteica encargada de acoplar la reacción de condensación del ADP y el P_i con la energía almacenada en los gradientes electroquímicos de protones ($\Delta\mu_{H^+}$), presentes en membranas transductoras de energía (2) como la membrana plasmática bacteriana, la membrana interna mitocondrial y la membrana tilacoidal de los cloroplastos (3).

Debido a su gran importancia biológica, tanto su arquitectura básica como su mecanismo catalítico han sido conservados a lo largo de la evolución, por lo que sin importar su origen las F-ATP sintasas se componen de dos motores rotatorios, uno hidrosoluble denominado F_1 y otro transmembranal denominado F_o , los cuales se interconectan por un cuello central y un cuello periférico (4).

En las bacterias, la porción F_1 de la ATP sintasa está constituida por cinco proteínas globulares llamadas α , β , γ , δ y ϵ , con una estequiometría de 3,3,1,1,1 ; y el dominio F_o por tres subunidades nombradas a, b y c, con una estequiometría 1,2, 9 - 15 (5). Esta composición representa la forma más sencilla de las ATP sintasas y es compartida por todos los organismos, sin embargo, dependiendo de su origen, cada enzima presenta sus propias particularidades, por ejemplo variaciones en la estequiometría de las subunidades c (6-9) o la presencia de subunidades accesorias (**Tabla 1**).

La información bioquímica y cristalográfica ha logrado establecer la posición y las interacciones entre las subunidades, determinando que las 3 subunidades α y 3β de F_1 constituyen el corazón catalítico de la enzima y se arreglan de forma alternada en un hexámero esférico de aproximadamente 100Å de diámetro(4), donde cada

interfaz α/β posee un sitio de unión a nucleótido. Los 3 sitios formados principalmente por los residuos de las subunidades α son sitios no catalíticos mientras que los 3 otros sitios formados principalmente por los residuos de las subunidades β son los sitios catalíticos de la enzima(4).

Del interior de esta esfera protruye una estructura alargada que corresponde a la subunidad γ y en cuya base descansa la subunidad ϵ , este complejo forma un eje central (10) que conecta directamente la porción F_1 soluble con una estructura en forma de carrusel, localizada en la membrana, la cual se construye a partir de la oligomerización de las subunidades c de F_0 .

En conjunto, el cuello central y el anillo de subunidades c forman el dominio conocido como rotor, el cual se encarga de transmitir la energía del transporte de protones a la síntesis del ATP. Adyacente al anillo de subunidades c se encuentra otra subunidad transmembranal denominada subunidad a , cuya interfaz de contacto con las subunidades c dan lugar a un canal de transporte de protones (11).

Finalmente, contigua a la subunidad a , se encuentra una estructura extendida que conecta lateralmente la porción soluble con la porción transmembranal, ésta se compone de las subunidades b , b' y δ y tiene como función mantener el subcomplejo $\alpha_3\beta_3$ y a la subunidad a estáticos con respecto al elemento rotatorio de la enzima y recibe el nombre de cuello lateral o estator (12) (**Fig. 1**).

La ATP sintasa realiza su función mediante un mecanismo rotatorio, en el cual la energía almacenada en un gradiente electroquímico de H^+ es transducida a energía química en forma de ATP. Este gradiente electroquímico es generado por complejos multiproteicos que forman la cadena de transporte de electrones, los cuales se encuentran al interior de las membranas transductoras de energía y se encargan de acoplar la transferencia de electrones al transporte de protones a través de la

membrana. Así, la acumulación de H^+ de un lado (el periplasma bacteriano, el espacio intermembranal mitocondrial y el estroma de los cloroplastos) con respecto al otro lado de la membrana (el citoplasma bacteriano, la matriz mitocondrial y el lumen tilacoidal), genera una diferencia de concentración (ΔpH) (13) y de carga ($\Delta\Psi$), que recibe el nombre de gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) y es utilizado para impulsar el giro del rotor de la ATP sintasa en el sentido sintético.

El mecanismo rotatorio de la ATP sintasa se basa en su capacidad para transportar protones, a través de un canal constituido por la subunidad a y el anillo de subunidades c de su fracción F_0 . Estudios de mutagénesis han mostrado la existencia de dos residuos esenciales para el transporte de H^+ (14), el primero, presente en cada una de las subunidades c (11, 15), es un residuo cargado negativamente (Asp o Glu) que se localiza en la parte externa del anillo, expuesto a los lípidos que lo rodean y que funciona como sitio de anclaje de los H^+ (16); el segundo aminoácido esencial de la subunidad a , es un residuo positivo (Arg) (17, 18) el cual se encuentra frente a las subunidades c que forman la interfaz a - c y le brinda dirección a la rotación.

Aunque la ruta exacta del transporte de protones aun no se conoce, una gran cantidad de evidencia bioquímica ha planteado que ésta se localiza en la interfaz entre la subunidad a y dos subunidades c , las cuales dan lugar a dos hemicanales independientes (19, 20) que comunican el espacio acuoso de uno u otro lado de la membrana con el sitio protonable (E o D) de las subunidades c .

La evidencia experimental ha permitido proponer un modelo de rotación de la ATPasa con el siguiente mecanismo (21-23):

1. Un H^+ penetra por el hemicanal desde la región ácida del medio y se une al grupo carboxilo del residuo negativo de la subunidad c.

2. Esta protonación neutraliza la carga del residuo y permite que la subunidad avance una posición en el anillo, adentrándose en la capa lipídica y alejándose de la subunidad α .

3. En ese mismo momento, a casi 360° de distancia, otra subunidad c protonada proveniente de la fase lipídica avanza hacia el segundo hemicanal de la subunidad α y expulsa su protón hacia la región básica del medio.

4. La liberación del H^+ del c^{Glu} o c^{Asp} restablece su carga negativa, la cual es atraída por la carga positiva de la α^{Arg} y conducida hacia el primer hemicanal donde otro H^+ neutraliza su carga, permitiendo que esta subunidad se interne en la membrana para dar una vuelta completa del anillo y cerrar el ciclo (**Fig. 2**).

La protonación y deprotonación concertada entre cada uno de los hemicanales promueve la rotación del anillo de las subunidades c (24-27) con respecto a la subunidad α , transformando la energía osmótica asociada al gradiente de H^+ en energía mecánica rotacional. Esta energía rotacional del anillo de subunidades c es transmitida a la porción catalítica de la enzima, mediante el giro de las subunidades γ y ϵ (28, 29) que se encuentran asociadas a la superficie del anillo (dominio rotor), y que funcionan como un árbol de levas de un motor, impulsando los cambios conformacionales que permiten la unión de los sustratos y la liberación del ATP de manera cooperativa y alternada en las tres interfaces catalíticas α/β de la porción F_1 .

El mecanismo catalítico de la enzima ha sido nombrado mecanismo de sitios alternantes y fue propuesto por Paul Boyer (5, 30), en éste se plantea que cada uno de los tres sitios tiene, en un momento dado, distinta conformación y afinidad por el nucleótido y ha sido respaldado por evidencia cristalográfica que ha confirmado las diferencias predichas entre los tres sitios catalíticos (4), mostrando que cada uno tiene una conformación distinta e interactúa con un nucleótido diferente: el primero (β_{TP}) tiene una conformación cerrada y une un análogo del ATP, (AMP-PNP), el segundo (β_{DP}) tiene una conformación semi-cerrada y une ADP, y finalmente el tercero (β_E) que tiene una conformación abierta y está vacío.

Además evidencias disponibles corroboraron que la subunidad γ mantiene contactos con cada una de las subunidades α/β de manera específica para cada interfaz debido a su asimetría intrínseca (4). Estas conformaciones en conjunto permiten la interconversión de los sitios catalíticos de forma concertada, permitiendo la entrada del sustrato, la catálisis y la liberación del producto en cada una de las interfaces de forma simultánea en cada desplazamiento de 120° (**Fig. 3**)

Tabla 1. Composición de la F-ATP sintasa en distintos organismos

Dominio	Subunidad (peso molecular KDa)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Bos taurus</i>
F₁	³ α (55)	³ α (55)	³ α (55)
	³ β (50)	³ β (50)	³ β (50)
	¹ γ (32)	¹ γ (31)	¹ γ (32)
	¹ δ (19)	¹ δ (22)	¹ OSCP (21)
	¹ ε (14)	¹ ε (15.8)	¹ δ (15)
			¹ ε (5.7)
			IF₁ (10)
F₀		ζ (11.6)	
	¹ a (30)	¹ a	¹ a (19)
	² b (17)	¹ b (20)	¹ b (24)
	¹⁰⁻¹⁵ c (8.2)	⁹⁻¹² c	⁸ c (7.6)
			d
			e
			f
			g
			F6
			A6L

Fig.1 Modelo de la ATP sintasa bacteriana

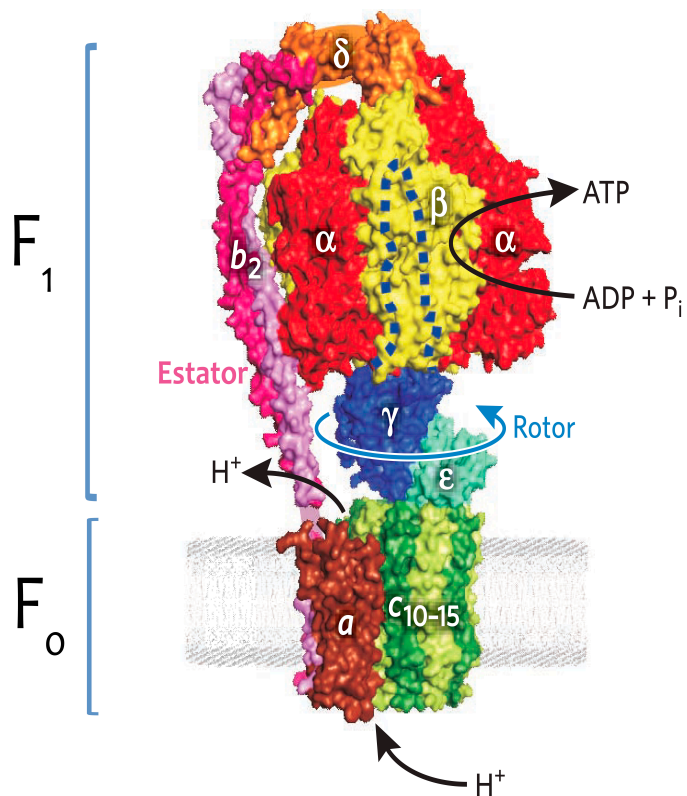


Tabla 1. Composición de subunidades de la ATP sintasa nativa aislada de diferentes especies. Se presentan dos organismos del dominio bacteria, la γ -proteobacteria *E. coli* y la α -proteobacteria *P. denitrificans*, así como un organismo del dominio eucaria, *Bos taurus*. Las subunidades se han separado de acuerdo al segmento al que pertenecen y sus homólogos se encuentran en el mismo renglón; a su lado izquierdo en superíndice se presenta la estequiometría de cada subunidad y de su lado derecho entre paréntesis se encuentra su peso molecular en KDa. La composición mínima de la enzima se presenta en la bacteria *E. coli* en la que se observan las 8 subunidades básicas de su estructura. Las subunidades regulatorias de cada enzima se encuentran en negritas: *E*cε, *P*dζ y *B*slF₁. Modificado de García-Trejo JJ y colaboradores (31).

Figura 1. Modelo de la ATP sintasa bacteriana. El modelo fue construido a partir de varias estructuras parciales obtenidas por cristalografía de rayos x, RMN y modelado. La ATP sintasa bacteriana presenta una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10-15}$ que se divide en las porciones F₁ y F₀. Su mecanismo de síntesis de ATP se encuentra representado, en el cual el flujo de H⁺ a través de los hemicanales de la interfaz a-c conduce la rotación del elemento rotor ($\gamma\epsilon c_{10-15}$), el cual genera cambios conformacionales en los sitios catalíticos de las subunidades β, de la porción estatora ($\alpha_3\beta_3\delta b_2$), que resultan en la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. Modificado de Weber (32).

Fig.2 Modelo del transporte de H^+ a través de F_o

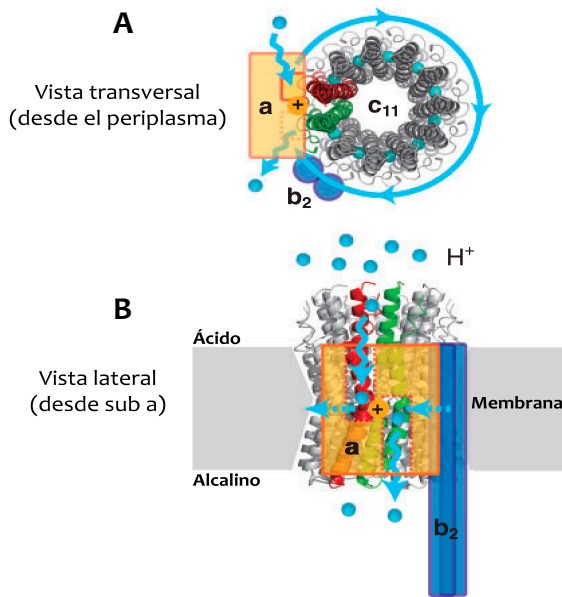


Fig. 3 Síntesis de ATP de acuerdo al modelo de sitios alternantes de Paul Boyer

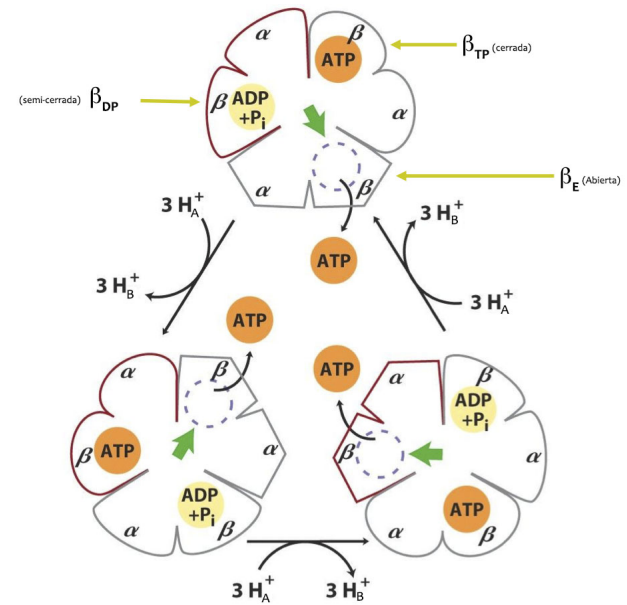


Figura 2. Representación del transporte de H^+ a través del dominio F_o de acuerdo al modelo de hemicanal. **A)** Estructura cristalográfica del anillo de subunidades c_{10} de *Ilyobacter tataricus* (1YCE) y a las subunidades a y b_2 como formas geométricas en color naranja y azul respectivamente. **B)** Se muestra la existencia de dos hemicanales con orientaciones contrarias dentro de la subunidad a , la presencia de la carga positiva conservada de la a^{Arg} entre ambos hemicanales y la formación de la interfaz de transporte entre dos subunidades c (roja y verde) y la subunidad a . En círculos azules se representan los H^+ , los cuales entran por el canal expuesto al lado ácido del medio e interactúan con la subunidad c , al dar la vuelta completa al anillo ésta subunidad se encuentra con el segundo hemicanal y libera su H^+ hacia el lado básico del medio. Modificado de Okuno D (21)

Figura 3. Síntesis de ATP de acuerdo al modelo de sitios alternantes de Paul Boyer. El complejo F_1 presenta 3 sitios catalíticos de unión a nucleótido no equivalentes entre sí. En un momento dado cada sitio presenta una conformación y una afinidad distinta por los nucleótidos (ATP, ADP y vacío) por lo que reciben el nombre de β_{TP} , β_{DP} y β_E respectivamente. La fuerza protón – motriz causa la rotación de la subunidad y del eje central (representada por una flecha verde), la cual hace contacto de forma diferente con cada uno de los sitios catalíticos y produce un cambio conformacional cooperativo en el que la β_{TP} se convierte en β_E (liberando el producto), β_{DP} se convierte en β_{TP} (promoviendo la condensación de $ADP + P_i$ para formar ATP), y β_E se convierte en β_{DP} (uniendo ADP y P_i del solvente) para iniciar de nuevo el ciclo. Modificado de Principles of Biochemistry, Lehninger (33)

II. Mecanismos regulatorios de la actividad de ATPasa

Como todo nanomotor molecular, el complejo F_1F_0 es reversible, por lo que además de sintetizar ATP, también es capaz de hidrolizarlo (29). Esta capacidad le permite tener un mecanismo de generación de $\Delta\mu_{H^+}$, sin embargo, debido a la importancia de mantener una poza estable de ATP y de evitar una actividad de ATPasa fútil, en condiciones de bajo oxígeno o baja luz, los complejos F_1F_0 han adquirido diferentes mecanismos de control de su actividad hidrolítica en forma de subunidades o dominios regulatorios, los cuales han sido optimizado a través de la evolución para operar en ambientes biológicos específicos, entre estos mecanismos se encuentran:

i. Mecanismo bacteriano: subunidad ϵ

Dentro del escenario bacteriano, la actividad hidrolítica de la ATP sintasa tiene un papel trascendental, ya que éstos organismos están expuesto a grandes cambios en sus hábitats, por ejemplo variaciones en las concentraciones de oxígeno. Durante la normoxia, la cadena respiratoria de las bacterias genera un gradiente de protones, el cual se utiliza en funciones celulares esenciales como la producción de ATP, la quimiotaxis y el transporte secundario. Sin embargo, cuando la bacteria debe enfrentarse a un ambiente anaerobio donde la cadena respiratoria ya no es capaz de generar este gradiente y en ausencia de cadenas alternas y/o aceptores alternos al oxígeno, es la actividad de F_1F_0 -ATPasa la que suple esta función, pues mediante la hidrólisis del ATP obtenido de la glicólisis, se restablece el gradiente de H^+ a través de la membrana, preservando de esta forma las funciones celulares que de él dependen. Ya que la cantidad de ATP celular es limitada, la actividad hidrolítica del complejo V debe ser escrupulosamente regulada, siendo la subunidad ϵ la encargada de su inhibición (34, 35).

La subunidad ϵ bacteriana es una proteína globular de 15 KDa de peso molecular, que se localiza en la base de la subunidad γ (36), sobre el anillo de subunidades c y forma parte intrínseca el rotor de la F-ATPasa (37). Se divide en dos dominios estructurales funcionalmente especializados, el primero, localizado en la porción amino terminal de la subunidad, adopta una estructura de sándwich β de 10 hojas y funciona como punto de anclaje entre las porciones F_1 y F_0 de la enzima (38, 39), estabilizando esta interacción (40); el segundo dominio, ubicado en su región carboxilo terminal se pliega en dos α -hélices (41-43) y se encarga directamente de la inhibición de la ATPasa (44). Debido a la división funcional de los dos dominios, el grado de conservación de cada uno difiere con respecto al otro en diferentes especies, mientras que el dominio amino terminal se encuentra altamente conservado debido a su relevancia estructural; el dominio carboxilo inhibitorio exhibe un alto grado de variabilidad, evidenciando las diferentes necesidades de control de las ATPasas, particulares para cada bacteria (35).

En la búsqueda del mecanismo inhibitorio de la subunidad ϵ , estudios con entrecruzadores químicos (41, 45, 46), ensayos unimoleculares (47, 48) y acercamientos estructurales mediante RMN y cristalografía de rayos x (36, 42, 49), han señalado que esta subunidad es capaz de adoptar dos conformaciones estructurales con capacidades inhibitorias diferentes. La primera es una configuración compacta (ϵ_c) no inhibitoria, en la cual las hélices presentes en su carboxilo terminal adquieren una estructura en forma de horquilla que se asocia a la porción globular de la subunidad, permitiendo el giro del rotor en ambas direcciones. La segunda estructura es la encargada de inhibir la actividad ATPasa y es conocida como conformación extendida (ϵ_x), ya que sus hélices c-terminales se alargan sobre la subunidad γ hacia el interior de la cavidad central del hexámero $\alpha_3\beta_3$, obstruyendo la rotación del cuello central en la dirección hidrolítica. En conjunto, la evidencia experimental ha propuesto que este mecanismo inhibitorio se basa en la interrupción del giro del rotor como respuesta a un cambio conformacional de las

hélices c-terminales de la subunidad y ha sido comparado con el funcionamiento de una matraca (o trinquete) ya que de igual forma permite el giro del rotor en un sentido (ATP sintasa) mientras inhibe la rotación en el sentido contrario (ATPasa) (**Fig. 4**).

Estudios en *Bacillus PS3* encontraron un sitio de unión de ATP específico (50) dentro de la subunidad ϵ (51, 52), el cual estabiliza la conformación compacta de la subunidad; éste presenta una secuencia de reconocimiento (I(L)DXXRA)(52) distinta a la descrita para las subunidades α y β , y se forma a partir de residuos pertenecientes a los dos dominios estructurales(52). Estudios bioquímicos han señalado que la interconversión conformacional de la subunidad ϵ es sensible a la presencia o ausencia de ATP (47, 53, 54), hecho que ha resaltado la importancia del sitio del nucleótido dentro del mecanismo inhibitorio de la subunidad, confiriéndole un carácter de sensor de ATP y por lo tanto de las condiciones energéticas celulares. De esta forma se ha propuesto que la conformación compacta de la subunidad ϵ se presenta en condiciones con altas concentraciones de ATP (donde el sitio del ATP está ocupado) en las cuales la actividad de ATPasa no necesita ser inhibida, pero cambia a su conformación extendida cuando la concentración del ATP disminuye (el sitio del nucleótido se vacía) y la hidrólisis del mismo es peligrosa para la bacteria. La observación de este sitio en bacterias distintas a *Bacillus PS3* (*E. coli* (52) y *Bacillus subtilis* (55)) ha revelado que el sensor de ATP no es exclusivo de esta bacteria sino que representa un mecanismo regulatorio distribuido en este dominio.

Estudios cristalográficos han permitido entender con mayor detalle la posición que adopta la subunidad ϵ en su configuración inhibitoria dentro de la enzima de *E. coli* (49), describiendo que las hélices C-terminales de ϵ_x se alinean a lo largo de la subunidad γ , formando una hélice superenrollada antiparalela con su porción amino terminal; además se introducen en la cavidad central del heterohexámero α/β y realizan contactos directos con las porciones carboxilo terminales de las subunidades

α_{DP} , α_E , β_{DP} y β_{TP} , confirmando la interacción de la subunidad ϵ con el motivo DELSEED de la subunidad β (56) y bloqueando de esta forma interacciones específicas entre β_{DP} y γ esenciales para el mecanismo de rotación.

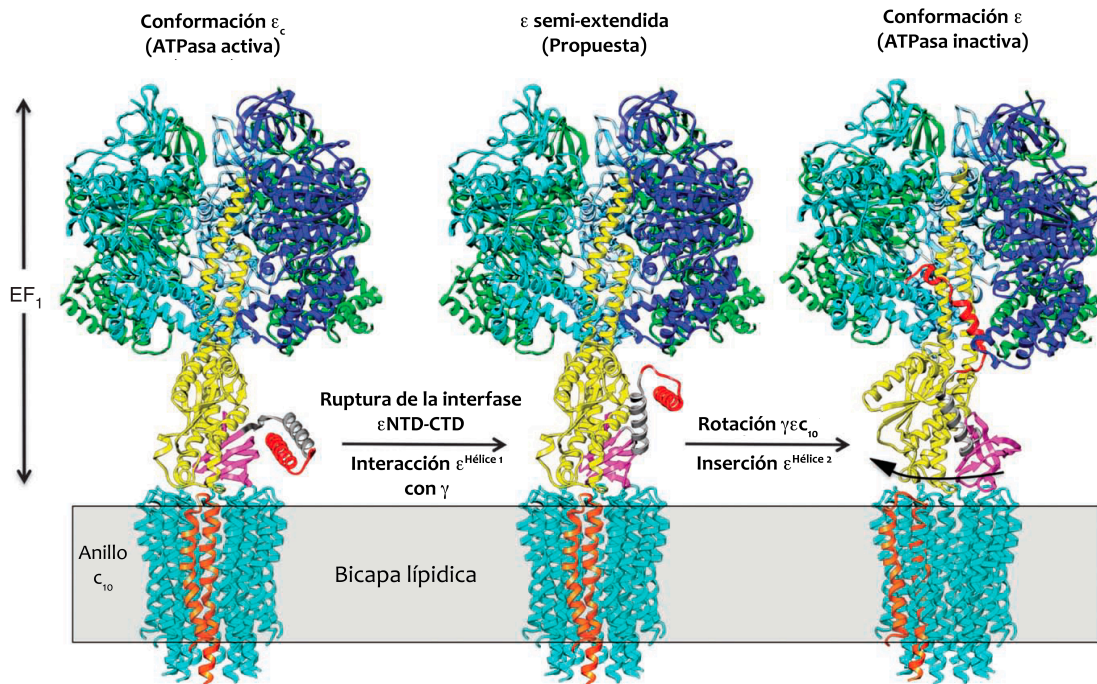


Figura 4. Modelo inhibitorio de la ATPasa mediado por la subunidad ϵ de *E. coli*. Los modelos de la EcF₁ se construyeron a partir de la estructura del anillo de subunidades c_{10} de levadura (2WPD) y la F₁-ATPasa de *E. coli* (3OAA); el dominio amino-terminal (NTD) de la subunidad ϵ se representa en rosa, mientras que en plata y rojo se presentan la primera y segunda hélice de su carboxilo terminal (CTD). De derecha a izquierda se representan los cambios conformacionales que sufre la subunidad ϵ durante su mecanismo inhibitorio, basados en la evidencia cristalográfica obtenida hasta el momento. En la imagen de la derecha se muestra la forma activa de la ATPasa en la cual la subunidad ϵ adquiere su conformación compacta donde la primera y segunda hélices se comprimen sobre su NTD. El modelo central representa un intermediario propuesto, el cual se basa en experimentos de proteólisis limitada y la estructura cristalográfica del subcomplejo $\gamma\epsilon$, éste representa a la ATPasa, también en su forma activa, pero con una conformación de ϵ en la cual, debido a la movilidad intrínseca de su CTD, la primera de sus hélices se ha extendido interactuando con la subunidad ϵ y la segunda se expone hacia el medio. Finalmente, la imagen de la izquierda representa la ATPasa en su forma inhibida en la cual la subunidad ϵ adquiere su conformación extendida alargando su CTD hacia el complejo $\alpha_3\beta_3$ y enrollándose sobre la subunidad γ impidiendo su giro. Modificado de Cingolani G y colaboradores (49).

ii. Mecanismo de cloroplasto: Entrecruzamiento disulfuro de la subunidad γ de cloroplasto

Como toda ATP sintasa, la enzima de cloroplasto se encarga de acoplar la síntesis de ATP a un gradiente electroquímico de protones, sin embargo, a diferencia de su contraparte bacteriana y mitocondrial, este gradiente no se establece a partir de la oxidación de compuestos con alto poder reductor sino a partir de la excitación luminosa de pigmentos presentes en sus fotosistemas, generando un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) a través de la membrana tilacoidal dependiente de la luz. Este gradiente permite la síntesis de ATP durante la fase de iluminación, pero se colapsa durante la fase oscura, favoreciendo la hidrólisis del nucleótido. Debido a la gran variabilidad de luz a la que estos organismos están expuestos, día/noche, sombra transitoria de las nubes, agujeros de luz etc. La enzima de cloroplasto ha adquirido un mecanismo regulatorio de la hidrólisis de ATP sensible a las condiciones redox del organismo cuya relevancia fisiológica reside en la prevención de la depleción fútil de la poza esencial del ATP intracelular en condiciones de oscuridad cuando la fotofosforilación es inactiva (57, 58).

Este mecanismo recibe el nombre de modulación tiol y se basa en la oxido/reducción reversible de un puente disulfuro de la subunidad γ de la porción F_1 de cloroplasto, el cual funciona como interruptor de la actividad de ATPasa de la enzima (59) y se localiza en un segmento regulatorio adicional de alrededor de 40 aminoácidos característico de las algas verdes y plantas superiores, que está ausente en las subunidades γ bacterianas y mitocondriales. La región regulatoria de γ se localiza en su porción central, cercana al anillo de subunidades c , donde el enlace disulfuro se forma entre las cisteínas C^{199} y C^{205} (en espinaca) (60) (**Fig. 5**). Sin embargo, debido a la falta de información estructural, hasta el momento se desconocen los eventos moleculares producidos por la oxidación. Ensayos de dinámica molecular han predicho que el enlace S-S genera dos estados conformacionales distintos, un primer estado completamente abierto con el disulfuro reducido y una segunda

conformación completamente cerrada con el disulfuro oxidado (61, 62), en el cual el dominio regulador se compacta, acercándose a la porción globular de la subunidad γ (63) (**Fig. 5**), impidiendo movimientos esenciales para la hidrólisis del ATP (64). Este modelo fue respaldado por estudios unimoleculares que demostraron que la oxidación de las cisteínas regulatorias disminuye el número de revoluciones que la subunidad γ realiza con respecto al hexámero $\alpha_3\beta_3$, afectando directamente la actividad enzimática de ATPasa (65).

Finalmente, estudios en condiciones fisiológicas han encontrado que la exposición de las membranas tilacoidales a la luz resulta en la generación de un potencial electroquímico que estimula la reducción del puente S-S de la subunidad γ , liberando de esta forma la inhibición de la actividad hidrolítica. Asimismo investigaciones *in vivo* han señalado que la tioredoxina es la encargada de reducir el disulfuro de la subunidad γ (66) y que ésta a su vez es fotoreducida en el cloroplasto por la ferredoxina - tioredoxina reductasa de forma dependiente a la luz (67).

iii. Mecanismo mitocondrial: Proteína IF₁

La ATP sintasa mitocondrial ha desarrollado un mecanismo regulatorio propio para la inhibición de su ATPasa, el cual es esencial para preservar la poza de ATP en mitocondrias con un bajo potencial de membrana, por ejemplo, durante condiciones de isquemia celular en donde el gradiente electroquímico de protones se colapsa y la ATP sintasa tiende a restablecerlo bombeando protones mediante la hidrólisis del ATP. Este mecanismo es regido por una proteína nombrada proteína inhibidora o IF₁ (68), que es una subunidad accesoria de la F-ATP sintasa mitocondrial que regula su actividad hidrolítica (68) y su actividad sintética (69, 70). Es una proteína soluble de 84 aminoácidos estructurados en una α - hélice de 90Å de longitud (71), su

estequiometría con respecto a la ATP sintasa es de 1:1 (72) y es capaz de inhibir tanto al complejo F_1F_o como a la porción F_1 aislada.

Estudios de entrecruzamiento químico de la F_1I y la F_1F_oI de bovino señalaron que la proteína inhibidora se localiza próxima a la subunidad α y a las subunidades del rotor γ y ϵ (73). Estos resultados fueron reforzados mediante evidencia cristalográfica (74), que determinó la localización de la porción inhibitoria de la IF_1 , presente en su extremo amino (75), dentro de una hendidura profunda generada por los dominios C-terminales de las subunidades $\alpha_{DP}, \beta_{DP}, \alpha_{TP}$ y β_{TP} , la cual conduce a la IF_1 a la cavidad interna del hexámero catalítico y le permite interactuar con la región N-terminal de la subunidad γ (**Fig. 6**). En conjunto, estos resultados señalaron que su mecanismo inhibitorio afecta dos de los componentes principales del proceso catalítico de la enzima, ya que impide los cambios conformacionales de los sitios activos β y obstruye el giro del rotor.

Mecanísticamente, la inhibición mediada por IF_1 requiere de un primer paso de anclaje, en el cual el motivo inhibitorio se adhiere a su sitio de unión, presente en la interfaz α_E/β_E de la porción F_1 . Posteriormente, la enzima realiza dos pasos de rotación del cuello central conducidos por la hidrólisis de dos moléculas de ATP los cuales conllevan a la transformación de la interfaz vacía α_E/β_E en la interfaz α_{DP}/β_{DP} y la subsecuente estabilización del complejo F_1-IF_1 inhibido. La liberación de la inhibición se realiza mediante la energización de la membrana, la cual se cree que remueve a la proteína de su sitio inhibitorio hacia una posición desconocida (76) o fuera del complejo F_1F_o (77), permitiendo que la síntesis del ATP se reinicie.

Estudios bioquímicos han encontrado que la capacidad inhibitoria de la IF_1 es sensible al pH (78), pues ésta realiza una potente inhibición de la ATPasa a $pH \approx 6$ y una nula inhibición a pH mayores (8). Se ha propuesto que esta sensibilidad al pH funciona como sensor del gradiente electroquímico de protones, ya que en condiciones

anaeróbicas donde la cadena respiratoria no funciona adecuadamente, la ATP sintasa tiende a realizar la hidrólisis del ATP, y la glicólisis se vuelve la única fuente de ATP celular. La alta actividad de la glicólisis resulta en una reducción del pH citosólico (79) el cual es transmitido a la matriz mitocondrial (80), promoviendo la inhibición de la hidrólisis del ATP mediada por la IF_1 . Estructuralmente, este fenómeno ha sido explicado como un cambio en el estado de oligomerización de la subunidad, ya que estudios *in vitro* de ultracentrifugación analítica (81) y cristalográficos (71), han encontrado que a $pH \leq 6.5$ la IF_1 se asocia como un homodímero inhibitorio (enlazando sus extremos carboxilos terminales mediante una estructura de hélice superenrollada), pero al aumentar el pH a valores de 8 ésta se oligomeriza en una estructura tetramérica que oculta la porción inhibitoria de la subunidad. Esta propiedad sensora del pH se ha adjudicado a la presencia de cinco residuos de histidina dentro de su secuencia, cuyo estado de protonación controla su grado de oligomerización. Sin embargo, la relevancia fisiológica de este cambio conformacional en el control de la ATPasa, aún no ha sido comprobada. Por otra parte, evidencia bioquímica y de microscopía electrónica han señalado que la dimerización de la proteína IF_1 genera la dimerización de la ATP sintasa completa (82, 83) y que ésta se relaciona directamente con la morfología de la membrana interna mitocondrial generando sus invaginaciones características, conocidas como crestas mitocondriales (82, 84).

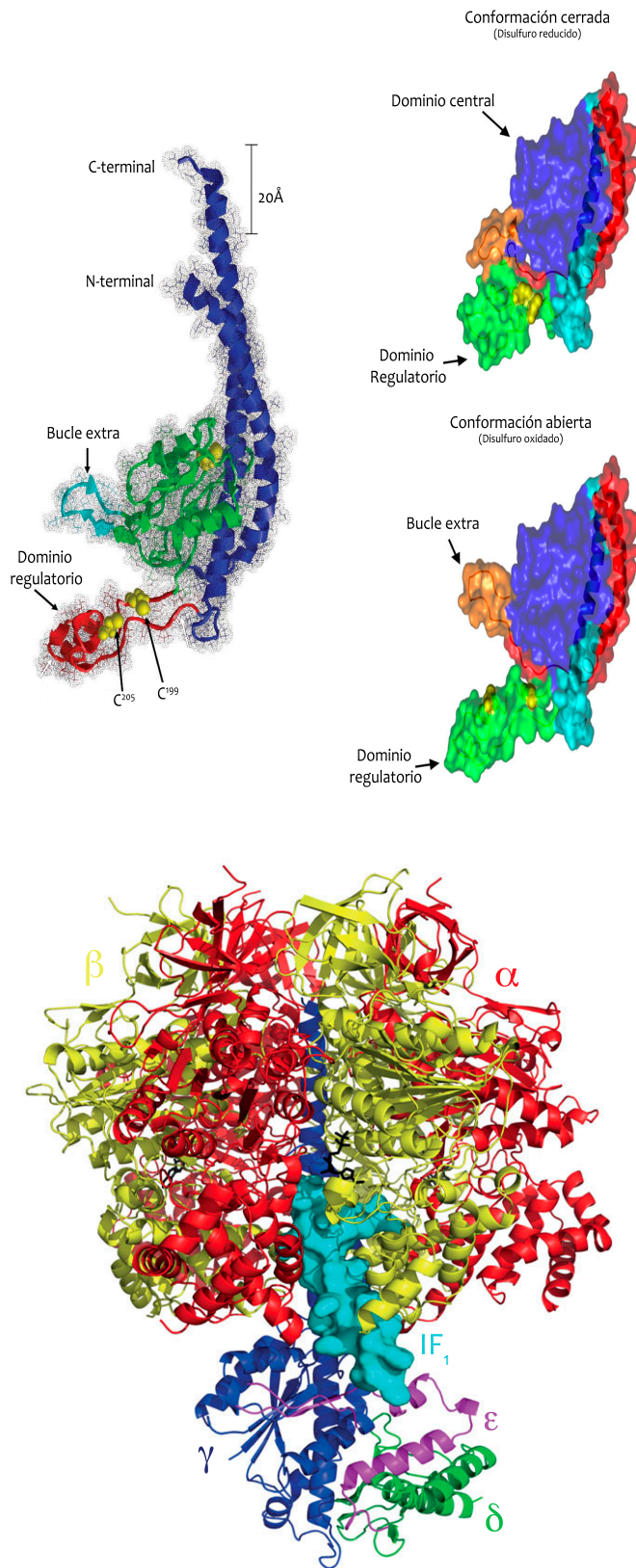


Figura 5. Modelo de la subunidad y de cloroplasto y de sus cambios conformacionales.

Estructura de la subunidad γ de cloroplasto de *Spinacia oleracea*, obtenida a través de modelado por homología con respecto a su contraparte mitocondrial. El panel izquierdo muestra los elementos estructurales de la subunidad, en azul se presentan sus N- y C- terminales, en verde su dominio central, en cian un dominio extra particular de la subunidad de cloroplasto y en rojo su dominio regulatorio donde las dos cisteínas oxidables se representan mediante esferas amarillas. El panel derecho muestra el probable cambio conformacional del dominio regulatorio en respuesta al estado redox de las cisteínas, arriba la conformación cerrada con el disulfuro oxidado y abajo la conformación extendida con el ditiol reducido. Modificado de Samra H. (61) y Richter M. (63)

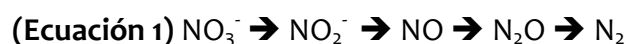
Figura 6. Estructura de la F_1 -ATPasa inhibida por la IF_1

Vista lateral de la estructura cristalográfica del complejo F_1 - IF_1 ¹⁻⁵³ de *S. cerevisiae*. Las subunidades α , β , γ , δ y ϵ se muestran en rojo, amarillo, azul oscuro, verde y magenta respectivamente y el fragmento 1-36 de IF_1 en azul claro, evidenciando la interacción del dominio amino-terminal de la proteína inhibidora con los dominios C-terminales de las subunidades α_{DP} , β_{DP} , α_{TP} y β_{TP} , así como con la subunidad γ del rotor. Reproducido de Robinson G (85)

III. *Paracoccus denitrificans*

i. *P. denitrificans* como organismo modelo

Paracoccus denitrificans es una α -proteobacteria coco Gram negativa y sin motilidad, que habita en el suelo, sedimentos y lodos (86) tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y que fue aislada por primera vez en 1910 por Beijerinck y Minkman (87). La selección original de esta especie fue basada en su habilidad de reducir nitratos y nitritos en nitrógeno molecular mediante la reacción conocida como desnitrificación (**Ec. 1**) la cual le permite crecer anaeróbicamente utilizando estos compuestos nitrogenados como aceptores terminales de electrones (88, 89).



P. denitrificans tiene una gran versatilidad metabólica, ya que es capaz de crecer de forma autótrofa usando hidrógeno, dióxido de carbono, metanol, tiosulfato o metilamina (90), o de manera heterotrófica con una amplia variedad de compuestos de carbono (91). El género *Paracoccus*, al cual *P. denitrificans* pertenece, es parte de la familia *Rhodobacteraceae*, del orden de las *Rhodobacterales* (92) y es uno de los géneros de las α -proteobacterias que se relaciona de forma más distante con *Escherichia coli* (93). Su genoma está compuesto por dos cromosomas circulares y un plásmido pequeño (89) y en conjunto se caracteriza por poseer genomas con un alto contenido de G+C que varía del 63.8 % al 70.2 % (94).

La clase α -proteobacteria a la que *P. denitrificans* pertenece es especialmente relevante, ya que evidencia filogenética a nivel genómico (95) (rRNA) y proteómico (96, 97) (secuencias de aminoácidos de apocitocromo b y las subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo oxidasa) han relacionado directamente a esta clase con el protoendosimbionte ancestral, que según la teoría endosimbiótica (98), dio origen a la mitocondria. Esta teoría propone que la asociación simbiótica entre una bacteria

Gram negativa aerobia (protoendosimbionte) y un huésped anaerobio fermentativo, probablemente un Arqueón, dio origen a los eucariotes mitocondriados.

Esto ha generado que *P. denitrificans* sea estudiado ampliamente en el campo de la bioenergética pues, además de la evidencia filogenética que lo relaciona con el ancestro de las mitocondrias, presenta un conjunto de características bioquímicas que le confieren una gran similitud con este organelo, por ejemplo:

- 1) La composición de su membrana plasmática evoca a la de la membrana interna mitocondrial, ya que cuenta con un alto contenido en fosfatidilcolina.
- 2) Cuenta constitutivamente con una cadena respiratoria casi idéntica a la mitocondrial (99), pues expresa versiones simplificadas en composición de subunidades de los complejos respiratorios presentes en mitocondrias, NADH deshidrogenasa (100), succinato deshidrogenasa (101), ubiquinol-citocromo c óxido reductasa (102), citocromo c oxidasa (103) y ATP sintasa (1, 104).
- 3) Exhibe una sensibilidad a los inhibidores respiratorios muy parecida a la mitocondrial, ya que su cadena respiratoria es sensible a rotenona, piericidina A, carboxina, tenoiltrifluoroacetona, antimicina A y su ATP sintasa es sensible a venturicidina y aurovertina (91).
- 4) Su función respiratoria muestra una propiedad única de las mitocondrias, pues al cuantificar el consumo de oxígeno de membranas aisladas acopladas de *P. denitrificans*, se observa que éstas son capaces de aumentar su velocidad respiratoria basal (estado IV) como respuesta a la adición de ADP (estado III) y de regresar a estado IV al consumir totalmente el sustrato (105, 106), tal como lo realizan las mitocondrias aisladas de bovino (107). Esta propiedad conocida como control respiratorio, asociada con la integridad membranal, el acoplamiento entre la ATP sintasa y los complejos respiratorios, y el acoplamiento entre la porción F_1 y F_0 de la

ATP sintasa; no se observa fácilmente en otras bacterias.

Consecuentemente, aun cuando cada una de las singularidades que *P. denitrificans* posee no son exclusivas, dado que hasta el momento ninguna otra especie bacteriana investigada posee en conjunto tantas similitudes con la mitocondria, *P. denitrificans* se ha convertido en un muy buen modelo para el estudio de la historia evolutiva de los complejos respiratorios mitocondriales, ya que brinda un acercamiento al escenario presente en su “ancestro bacteriano”, hecho que se ha explotado en la caracterización estructural y bioquímica del complejo I (108) y el complejo IV (109).

ii. La ATP sintasa de *P. denitrificans* y el mecanismo regulatorio de su actividad de ATPasa

Estudios del complejo V de *P. denitrificans* indicaron que éste presenta una gran peculiaridad que lo diferencia de sus contrapartes eucariótica y mitocondrial, ya que exhibe la velocidad sintética más rápida reportada, aunada a una actividad hidrolítica muy lenta o casi nula. Esta propiedad se manifiesta en un cociente de actividades ATP sintasa/ATPasa que ronda valores de entre 20 y 60 (110, 111) los cuales superan considerablemente los valores obtenidos para sus contrapartes de bacteria (112) y de mitocondria (o cloroplasto) que se encuentran por debajo de la unidad. La importancia del cociente ATP sintasa/ATPasa reside en que éste es un reflejo de la dirección preferencial de la enzima; ya que mientras las enzimas de bacteria y mitocondria hidrolizan el ATP más rápido de lo que lo sintetizan, la enzima de *P. denitrificans* exhibe prácticamente una ATP sintasa unidireccional (104), develando la existencia de un mecanismo inhibitorio de su actividad hidrolítica especialmente eficiente.

Durante varios años se intentó caracterizar el mecanismo regulatorio que inhibía a la ATPasa de *P. denitrificans*, sin embargo la inestabilidad que la enzima presentaba al

ser purificada había impedido la obtención de información directa sobre su composición y su estructura que permitiese explicar su carácter unidireccional.

A pesar de las dificultades, ensayos bioquímicos habían sugerido la existencia de una proteína inhibidora intrínseca de la ATPasa de esta bacteria, ya que de forma similar a otras ATPasas reguladas por proteínas inhibidoras (113), la proteólisis limitada de la PdF_1F_o de partículas sub-bacterianas (114) y de la PdF_1 semipurificada (115) generaba un aumento de su actividad hidrolítica.

La existencia y la identidad de esta subunidad inhibitoria no fue esclarecida sino hasta el 2010 cuando en el laboratorio del Dr. García-Trejo, se realizó la purificación de los complejos PdF_1F_o y PdF_1 estables (116)(1), mostrando que asociada a las subunidades canónicas que los constituyen, se encuentra una nueva subunidad estructural de 11 KDa de peso molecular designada subunidad “ ζ ” (**Tabla 1**), la cual es capaz de inhibir la actividad hidrolítica de la enzima y no posee similitud significativa con las subunidades regulatorias ϵ e IF_1 . Además, demostraron la presencia a la subunidad ζ (mediante WB) asociada al complejo V de *R. sphaeroides* (1), una α proteobacteria relacionada cercanamente con *P. denitrificans* (92), revelando la existencia de un nuevo mecanismo de regulación del nanomotor F_1F_o diferente a los descritos hasta el momento y posiblemente conservado entre la clase de las α -proteobacterias.

Posteriormente, un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Kurt Wütrich del Scripps Research Institute, California-USA, quienes habían resuelto la estructura de la subunidad homóloga en *Jannaschia* sp. (2KZC), develó la estructura de la subunidad $\text{Pd}\zeta$ en solución (PDB_id: 2LLO), mediante RMN, evidenciando que ésta es una proteína globular 100% α -hélice, estructurada como un haz de 4 hélices que forman un dominio central, del que protruyen los extremos amino y carboxilo, los cuales interactúan estrechamente entre sí (117). Esto mostró que la subunidad $\text{Pd}\zeta$ no

presenta homología estructural con las subunidades regulatorias bacteriana ni mitocondrial.

En conjunto, esta nueva información sobre la regulación de la ATP sintasa de *P. denitrificans* ha traído a la luz la existencia de un nuevo mecanismo inhibitorio de la ATPasa, mediado por una subunidad sin homología en secuencia ni estructura con los previamente descritos y cuya caracterización ayudaría a entender la evolución de los mecanismos regulatorios de la ATPasa de las F-ATP sintasas.

Planteamiento del Problema

La F_1F_0 -ATP sintasa es un nanomotor reversible y ubicuo que genera ATP. Las ATP sintasas bacteriana, mitocondrial y de cloroplasto controlan su rotación intrínseca mediante diferentes subunidades como la ϵ bacteriana, la IF_1 mitocondrial y una cisteína en la subunidad γ del cloroplasto. La α -proteobacteria *P. denitrificans* tiene una ATP sintasa prácticamente unidireccional, ya que presenta la actividad sintética más rápida y la actividad de ATPasa más lenta que se ha descrito (110). Durante el estudio de su composición se encontró una subunidad adicional, denominada ζ , la cual posee una potente capacidad inhibitoria de su actividad hidrolítica (1) y difiere en secuencia y estructura con las subunidades inhibitorias reportadas, asimismo la proteína se encontró asociada al complejo V de otra bacteria perteneciente a la clase α -proteobacteria. Toda la evidencia anterior refuerza la existencia de un nuevo mecanismo regulatorio de la F_1F_0 -ATP sintasa mediado por la subunidad ζ , específico del grupo de las α -proteobacterias, el cual debía ser caracterizado.

Hipótesis

La subunidad ζ es un inhibidor de la actividad hidrolítica de la F_1F_0 -ATPasa de *Paracoccus denitrificans*, que no presenta una clara relación filogenética ni estructural con las subunidades regulatorias bacteriana ni eucariótica y que está conservada en

otras α -proteobacterias; por lo tanto su mecanismo inhibitorio debe presentar características distintas a las descritas para ϵ e IF_1 y debe estar conservado en la clase α -proteobacterias.

Objetivos

Objetivo general: Caracterizar estructural y funcionalmente el mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ de la F_1F_o -ATPasa de la clase α -proteobacteria

Objetivos particulares:

- * Determinación de la IC_{50} de la subunidad ζ para inhibir a la F_1 -ATPasa de *P. denitrificans*.
- * Determinación de las Interacciones de la subunidad ζ con otras subunidades de la PdF_1
- * Identificación del dominio inhibitorio de la subunidad ζ
- * Evaluación de la función inhibitoria de la subunidad ζ de la α -proteobacteria *Jannaschia* sp.
- * Caracterización del sitio de unión a ATP en la subunidad ζ

Resultados

I. Cinética de la inhibición de $Pd\zeta$ sobre la PdF_1 -ATPasa

El mecanismo inhibitorio de la subunidad $Pd\zeta$ fue analizado cinéticamente reconstituyendo cantidades diferentes de la subunidad recombinante en la fracción PdF_1 pura y en la PdF_1 adicionada con un exceso de subunidad $Pd\epsilon$ o $Pd\epsilon^{\Delta CT}$, para posteriormente cuantificar su actividad hidrolítica mediante el ensayo de liberación de fosfatos; el objetivo de este experimento fue el de obtener un valor de afinidad aparente (IC_{50}) de la subunidad ζ por su sitio inhibitorio, además de explorar la posibilidad de que la subunidad ϵ poseyera alguna capacidad inhibitoria o un papel

indirecto en la inhibición mediada por ζ . Concluimos que la $Pd\zeta$ por sí misma tiene la habilidad de inhibir completamente la actividad de ATPasa de la PdF_1 con una afinidad de 380nM; mientras que las subunidades ϵ y $\epsilon^{\Delta CT}$ no exhiben capacidad inhibitoria sobre la PdF_1 y ninguna de ellas coadyuva o dificulta el efecto inhibitorio de la subunidad ζ , ya que las afinidades de unión de la $Pd\zeta$ por la PdF_1 reconstituida con estas subunidades fueron muy similares; es decir, de 360 nM y 380 nM respectivamente (**Fig. 7**).

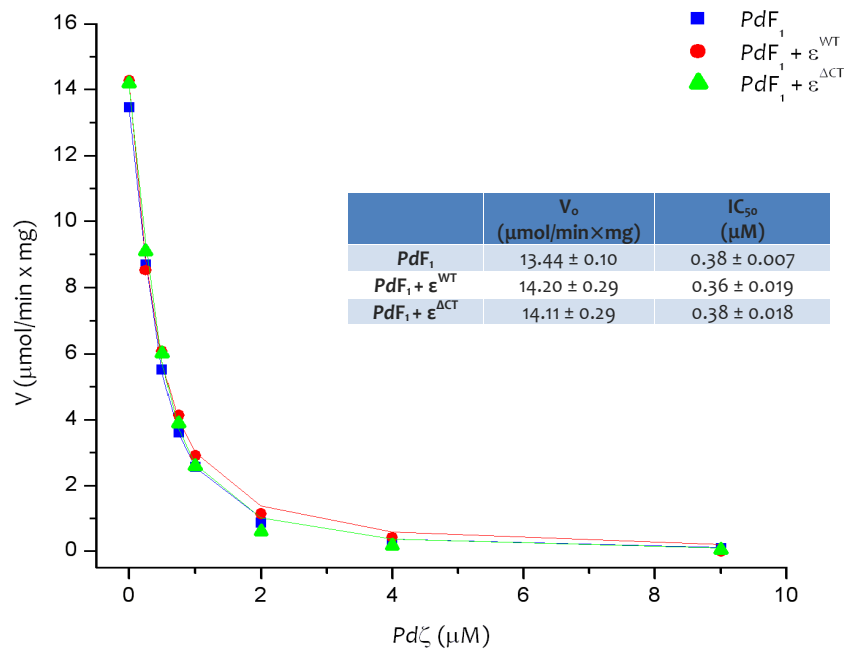


Figura 7. Curva de inhibición de la actividad hidrolítica de la PdF_1 mediada por la subunidad $Pd\zeta$. Diez microgramos de PdF_1 se reconstituyeron durante 30 min. con cantidades crecientes de subunidad ζ en presencia de 60 mM sulfito de sodio, posteriormente se inició la actividad hidrolítica añadiendo 10 mM de Mg^{2+} ATP e incubando durante 1 min a 37° C. Finalmente se añadió 6 % de TCA para detener la reacción y se cuantificó el fosfato libre mediante el ensayo colorimétrico de Fieske y Subarrow. En cuadrados (■) se muestra la reconstitución de la subunidad $Pd\zeta$ sobre la PdF_1 mientras que en círculos y triángulos (•, ▲) se presenta la adición de subunidad ζ a la PdF_1 previamente reconstituida con un exceso de 10 veces subunidad ϵ^{WT} y $\epsilon^{\Delta NT}$ respectivamente. Las líneas continuas muestran el ajuste de los datos a un modelo de inhibición de Hill modificado y la tabla incorporada muestra los valores de Velocidad inicial (V_0) y la concentración de inhibidor necesaria para obtener el 50 % de la inhibición total (IC_{50}).

Sin embargo, dado que la porción F_1 cuenta con un contenido endógeno de subunidades ϵ y ζ , las cuales podrían estar afectando directamente el valor de la afinidad de la subunidad inhibitoria o encubrir algún efecto indirecto mediado por ϵ , decidimos purificar un complejo PdF_1 libre de éstas subunidades ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta$). La purificación se realizó removiendo las subunidades ϵ y ζ mediante una columna de inmuno-afinidad anti- ϵ y anti- ζ como se ha descrito anteriormente para la ATPasa de *E. coli* (118); este método de purificación removió más del 90% de ambas subunidades, calculado densitométricamente con respecto a la F_1 inicial (**Fig. 8**).

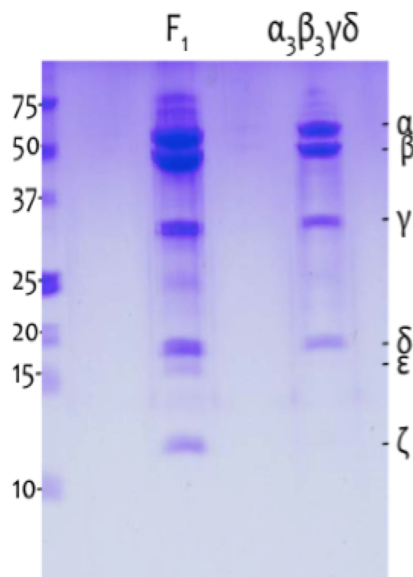


Figura 8. Purificación del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$. Gel Von Jagow al 12.5 % teñido con azul de Coomassie de la PdF_1 purificada mediante la columna Q-Sefarosa y la columna Superdex 200 (12.6 μg carril 2) y de la $F_1 - \epsilon - \zeta$ repurificada mediante las columnas de inmunoafinidad anti- $Pd\epsilon$ y anti- $Pd\zeta$ (6.3 μg carril 3). La actividad máxima del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ fue de 14 $\mu\text{molas/min/mg}$

Posteriormente, se realizó la reconstitución de la $Pd\zeta$ sobre el complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ en presencia o ausencia de un exceso $Pd\epsilon$ y $Pd\epsilon^{\Delta\text{CT}}$ recombinantes y se cuantificó la actividad hidrolítica de las enzimas reconstituidas. Todos los experimentos mostraron curvas de inhibición hiperbólicas coincidentes entre sí, que fueron ajustadas a un modelo de inhibición total. Demostrándose así que la subunidad ζ actúa como un inhibidor total de la PdF_1 -ATPasa aun en las condiciones de máxima activación en presencia de sulfito, con una afinidad de unión alrededor del intervalo nanomolar (270nm). Asimismo, se evidenció que la subunidad $Pd\epsilon$ no promueve ni antagoniza las propiedades inhibitorias de la ζ y no cuenta con capacidad inhibitoria intrínseca. Por su parte, la superposición entre la curva adicionada con $Pd\epsilon^{\Delta\text{CT}}$ con respecto a la

adicionada con su versión nativa, indicó que la remoción del fragmento extra del C-terminal de la subunidad ϵ no le confiere ninguna propiedad inhibitoria (**Fig. 9**)

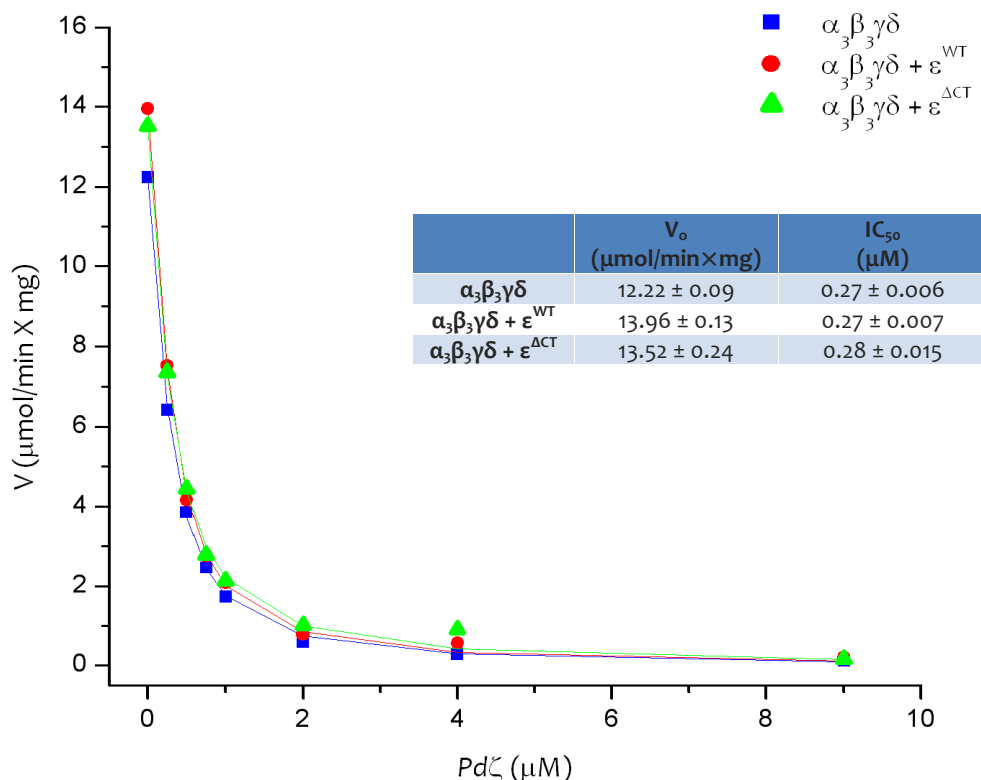


Figura 9. Inhibición de la actividad hidrolítica del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ mediada por la subunidad $Pd\zeta$. Diez microgramos del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ puro se reconstituyeron durante 30 min con las cantidades indicadas de subunidad ζ en presencia de 60 mM de sulfito de sodio. La medición de la actividad hidrolítica se inició añadiendo 10 mM de Mg^{2+} ATP e incubando durante 1 min a 37° C, finalmente se detuvo la reacción agregando 6 % de TCA; la actividad específica se calculó el P_i libre. En cuadrados (■) se muestra la reconstitución de la subunidad $Pd\zeta$ sobre el complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$, mientras que en círculos y triángulos (•, ▲) se presenta la adición de subunidad ζ al $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ previamente reconstituido con un exceso de subunidad ϵ^{WT} y $\epsilon^{\Delta\text{NT}}$ respectivamente, durante 30 min.

II. Interacciones de la subunidad ζ en la porción PdF , aislada

Con el fin de definir la posición inhibitoria de la subunidad ζ en la estructura cuaternaria de la PdF_1 -ATPasa, recurrimos a una estrategia de entrecruzamiento

químico utilizando el agente tiolante de aminas primarias 2- iminotiolano (2-IT) y la subsecuente oxidación de los tioles contiguos mediante la adición de CuCl_2 . La identidad de los productos de entrecruzamiento se analizó mediante ensayos de Western blot; para lo cual realizamos la producción del anticuerpo policlonal anti-Pd ϵ en conejo y su posterior titulación mediante el análisis de su reconocimiento en curvas de proteína de Pd ϵ pura , PdF $_1$ y membranas invertidas de *P. denitrificans*; encontrando que a una dilución de 1:20000, el anticuerpo es capaz de reconocer 5 ng de proteína pura, 25 ng de F $_1$ y 0.5 μg de PSB (**Fig. 10**); por su parte la obtención y descripción del anticuerpo anti-Pd ζ policlonal ya había sido descrita (1).

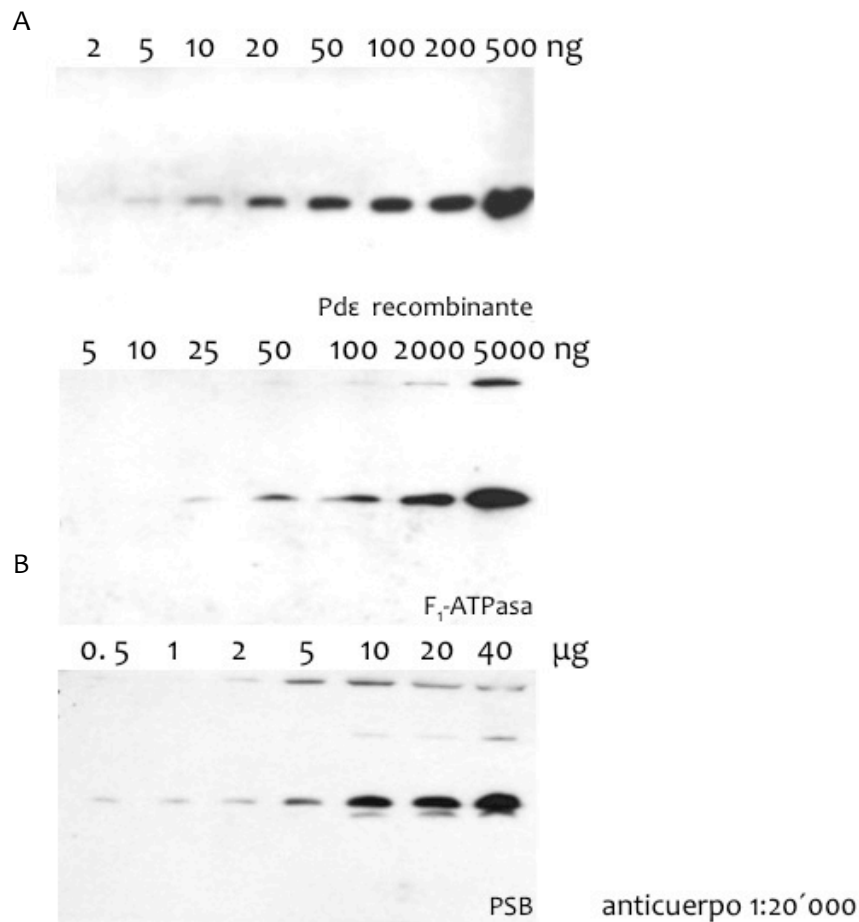


Figura 10. Titulación del anticuerpo policlonal anti Pd ϵ . Ensayos de Western Blot usando el anticuerpo primario anti-Pd ϵ a una dilución 1:20000 en PBS-T adicionado con 5 % de leche y anticuerpo secundario anti-conejo a dilución 1:20000 en leche-PBS-

T de **A.** Curva de 2 a 500 ng de subunidad épsilon pura que corrió en un gel Von Jagow al 12.5 % y se transfirió a una membrana de PVDF; **B.** Curva de 5 ng a 5 µg de PdF_1 que corrió en un gel Von Jagow al 12.5 % y se transfirió a una membrana de PVDF; **C.** Curva de 0.5 µg a 40 µg de membranas de *P. denitrificans* corridas en un gel Von Jagow al 12.5 % y transferido a una membrana de PVDF

El entrecruzamiento de la porción PdF_1 pura y su corrimiento electroforético en condiciones no reductoras se realizó como se ha explicado en la sección de material y métodos, posteriormente efectuamos su transferencia a una membrana de PVDF y finalmente la revelamos con los anticuerpos anti- $Pd\zeta$ y anti- $Pd\epsilon$. El patrón de bandeo producto de este experimento nos permitió proponer, de acuerdo a los pesos moleculares de los aductos obtenidos, que el dominio carboxilo terminal de la subunidad épsilon interactúa con las subunidades α , β , γ y ζ durante las condiciones control (ya que en su secuencia solo se encuentran 2 residuos de lisina posicionados en este extremo susceptibles a entrecruzarse); por su parte, la subunidad ζ se posiciona en cercanía a las subunidades α , β , γ y ϵ ; interactuando tanto con las subunidades del corazón catalítico, como con las subunidades del rotor (**Fig. 11**).

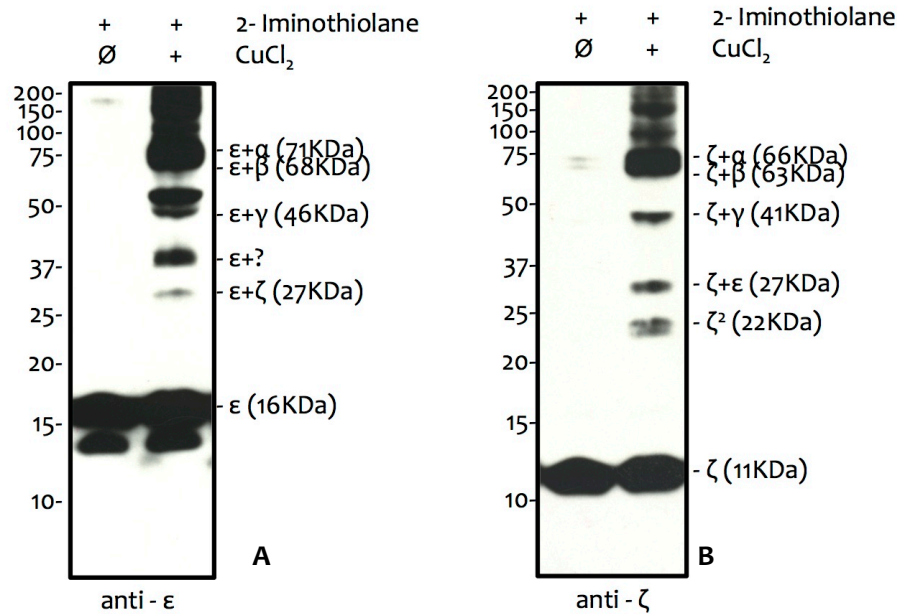


Figura 11. Identificación de los productos de entrecruzamiento de la porción PdF₁. Veinte microgramos de PdF₁ tiolada (carril 1) y 20 µg de PdF₁ tiolada y entrecruzada (carril 2) se corrieron en un gel de acrilamida Von Jagow al 15 % y se transfirieron durante 2 h a una membrana de PVDF con poro de 0.22 µm. En **A** la membrana se retó contra el anticuerpo anti pde a una dilución 1:20000; mientras que en **B** el anticuerpo utilizado fue anti pdζ a la misma dilución. Las figuras A y B presentan el reconocimiento de ambos anticuerpos sobre la misma membrana, por lo que entre ambas detecciones se realizó la remoción de los anticuerpos, incubando la membrana en un amortiguador con β-mercaptoetanol 100 mM, 2 % SDS y tris 62.5 mM pH 6.5 durante 30 min a 60° C, ratificando la ausencia de quimioluminiscencia residual usando el anticuerpo secundario anti-conejo.

Este análisis, sin embargo, solo nos permitió garantizar la identidad específica del aducto ε-ζ, por lo cual necesitamos de otra estrategia electroforética de mayor resolución para resolver la composición del resto de los entrecruzamientos. Ante ésto se decidió utilizar la técnica de electroforesis bidimensional, la cual consiste en una primera dimensión SDS-PAGE en condiciones no reductoras, seguida de una segunda dimensión SDS-PAGE en condiciones reductoras (en presencia de DTT o β-mercaptoetanol). El patrón de bandeo característico se compone por una diagonal (formada por las subunidades no-entrecruzadas) y algunos puntos fuera de la recta. Estos últimos, al ser alineados verticalmente y horizontalmente en la 2ª dimensión, reflejan la composición de los diversos aductos de manera directa y sin la necesidad del uso de anticuerpos.

Este tipo de análisis se realizó a partir de muestras de PdF₁ entrecruzada, encontrando que la subunidad ζ, en efecto, interactúa con las subunidades α, β y γ dentro de la PdF₁ durante la conformación inhibida (**Fig. 12**). Sin embargo, debido a la disminución en el contenido de las subunidad ε y ζ propia de la purificación y la baja eficiencia de entrecruzamiento del 2-IT, la detección de los aductos no pudo ser realizada mediante la tinción de azul de coomassie; por lo que el gel final fue teñido

con nitrato de plata, que proporciona una mayor sensibilidad en la detección. Cabe recalcar que aún con esta tinción, no fue posible visualizar una interacción de las subunidades ζ y ϵ .

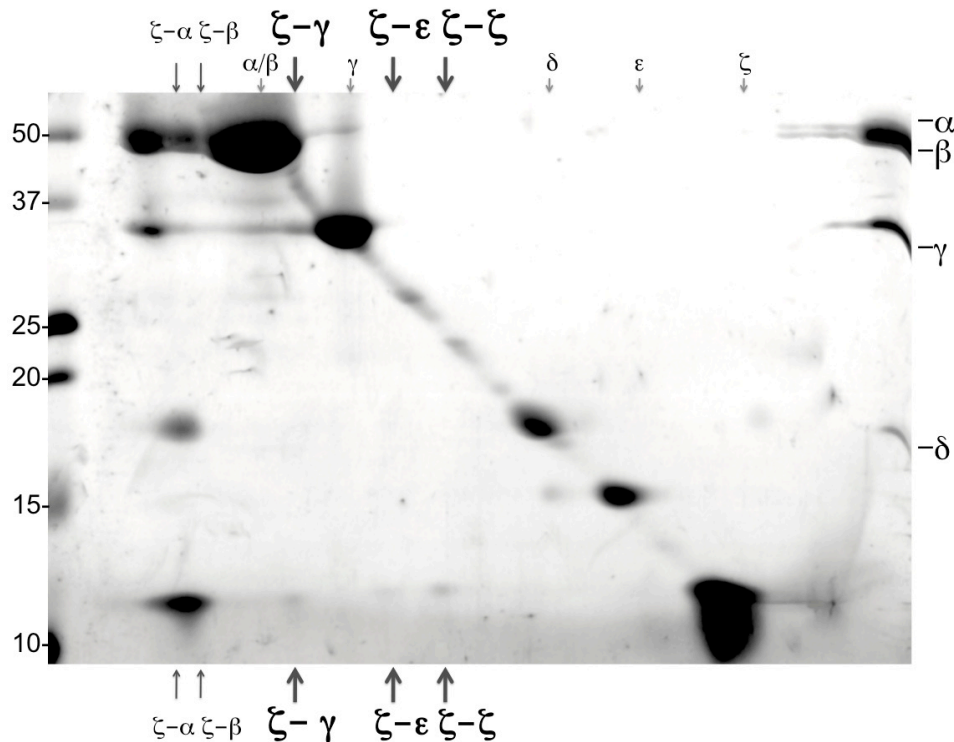


Figura 12. Entrecruzamiento de la subunidad Pd ζ endógena con las subunidades del estator y del rotor de la porción F₁ de *P. denitrificans*. Quinientos microgramos de PdF₁ pura fueron tiolados con 1 mM de 2-IT durante 1 h y entrecruzados con 120 μ M de CuCl₂ durante 30 min; después de este tratamiento, la muestra fue incubada en amortiguador de carga sin reductor y cargada en un gel desnaturalizante de acuerdo a Laemmli (119). Al finalizar la corrida, el carril correspondiente a la F₁ entrecruzada fue cortado e incubado en condiciones reductoras en amortiguador del gel Von Jagow 1X con 10 mM de DTT y 5 % de β -mercaptoetanol durante 1 h, inmediatamente después fue cargado en un gel desnaturalizante Von Jagow y corrido durante 18 h a 120 V a 4° C, el gel resultante fue teñido mediante el protocolo de tinción con nitrato de plata. La figura del gel muestra en el extremo izquierdo estándares de peso molecular y en el extremo derecho PdF₁ pura sin entrecruzar. En el centro del gel se puede observar la diagonal característica de ésta técnica en la cual se encuentran las subunidades no entrecruzadas y los aductos residuales no reducidos; fuera de la diagonal se encuentran puntos de proteína que resuelven la identidad de los

entrecruzamientos ζ - α , ζ - β y ζ - γ , así como los posibles entrecruzamientos ζ - ϵ y un dímero de ζ .

Con el fin de aumentar la formación de los productos de entrecruzamiento, se reconstituyó la porción F_1 con las subunidades ζ y ϵ recombinantes y se realizó nuevamente el análisis electroforético bidimensional, encontrando que la subunidad ζ , en efecto, interactúa con las subunidades α , β , γ y ϵ en la PdF_1 cuando ésta presenta una conformación inhibida (**Fig. 13**).

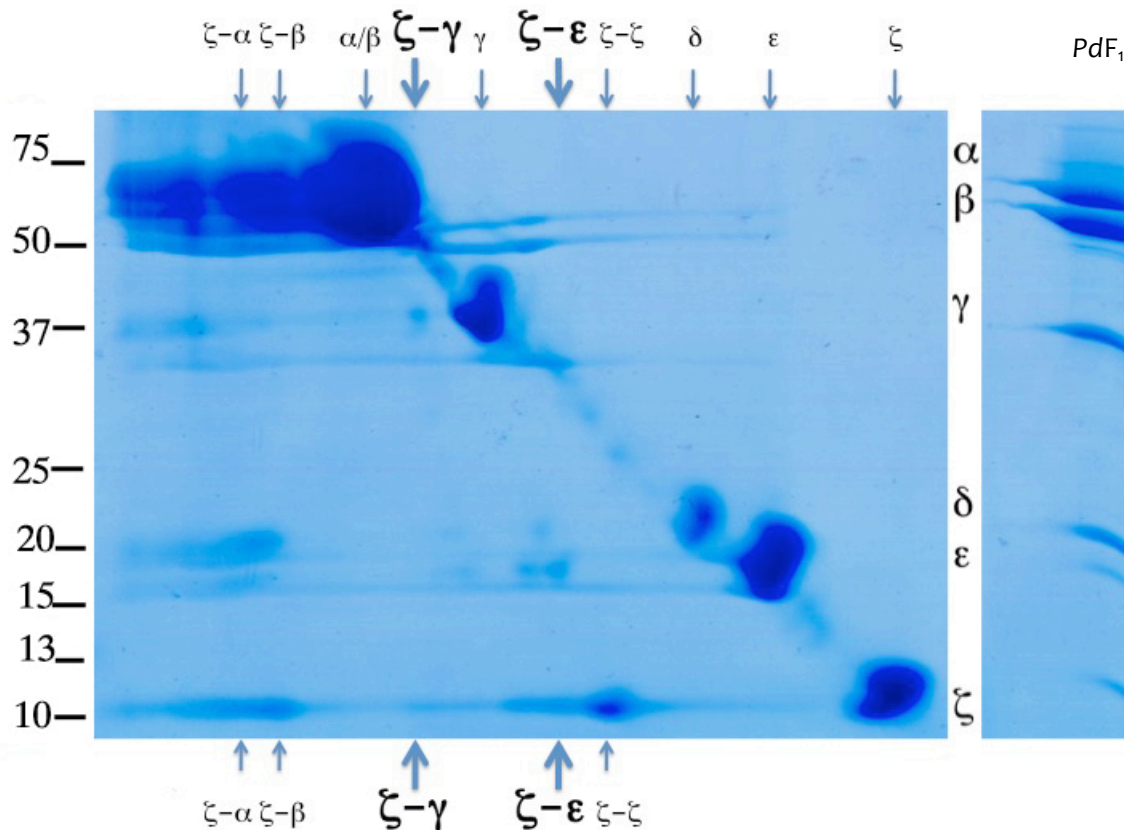


Figura 13. Entrecruzamiento reversible de la subunidad $Pd\zeta$ con subunidades del rotor y estator de la PdF_1 -ATPasa. Novecientos microgramos de PdF_1 pura fueron reconstituidos con subunidades $Pd\epsilon$ y $Pd\zeta$ recombinantes durante 30 min. El exceso de subunidades fue removido mediante 3 ciclos de dilución-concentración en un tubo centricon con corte de 100 KDa. La muestra resultante fue tiolada con 1 mM de 2-IT y entrecruzada con 120 μ M de $CuCl_2$, posteriormente fue cargada en un gel

desnaturalizante no reductor de acuerdo a Laemmli (119). Luego de la corrida de 15 h a 120 V a 4° C, el carril correspondiente a la F_1 entrecruzada fue cortado e incubado en condiciones reductoras en amortiguador del gel Von Jagow 1X con 10 mM de DTT y 5 % de β -mercaptoetanol durante 1 h, inmediatamente después fue cargado en un gel desnaturalizante Von Jagow y corrido durante 18 h a 120 V a 4° C. Finalizado el tiempo de corrida el gel fue teñido con azul de coomassie serva. En el extremo izquierdo del gel se cargaron estándares de peso molecular y en el extremo derecho se cargó PdF_1 sin entrecruzar como identificador de cada una de las subunidades. La porción central del gel muestra una diagonal donde se encuentran las subunidades no entrecruzadas y los aductos residuales no reducidos. Fuera de la diagonal se encuentran puntos de proteína resultado de la reducción de los entrecruzamientos ζ - α , ζ - β , ζ - γ , ζ - ϵ y un dímero de ζ .

Esta evidencia, en conjunto con el análisis WB anti- ζ y anti- ϵ (**Fig. 11**), confirma la interacción de la subunidad ζ con subunidades del rotor (γ/ϵ) y del estator (α/β) de la PdF_1 -ATPasa, de manera similar a la primera demostración de la obstrucción de la rotación, ejercida por la proteína inhibidora (IF_1) dentro de la F_1 -ATPasa mitocondrial(73)

III. Conservación evolutiva del mecanismo inhibitorio mediado por la subunidad ζ en las F_1F_0 -ATPasas de α -proteobacterias

El análisis de alineamiento de secuencia de la $Pd\zeta$, mediante BLAST y ClustalW mostró que la subunidad ζ no presenta similitud significativa con el inhibidor bacteriano (ϵ) ni con el mitocondrial (IF_1), pero está conservada dentro de las α -proteobacterias, ya que se encuentra como ORF o DUF1476 a lo largo de esta clase. Con el fin de analizar las relaciones evolutivas entre las subunidades ζ homólogas, Se construyó un cladograma de ζ a partir de 12 secuencias de la subunidad, mediante el método de neighbour joining; encontrando que entre los homólogos más cercanos a *P. denitrificans*, en concordancia con la evidencia experimental, se encuentran *R. sphaeroides* y *Jannaschia sp.* (**Fig. 14A**), organismos que brindaron la primera evidencia de la expresión de la subunidad ζ unida a la ATPasa en una α -proteobacteria distinta a *P. denitrificans* (1) y la primera estructura homóloga de la subunidad ζ (**2KZC**) respectivamente. Asimismo el examen detallado del alineamiento de las subunidades

ζ homólogas mostró la existencia de un mayor grado de conservación en la porción amino terminal de la subunidad con respecto a su porción carboxilo, lo cual subrayó la posible importancia de este dominio en el mecanismo inhibitorio ejercido por la subunidad ζ (**Fig. 14B**).

El análisis comparativo entre las secuencias de la subunidad ϵ bacteriana y la mitocondrial (denominada subunidad δ **Tabla 1**) reveló que éstas difieren entre sí (35), lo cual lleva a proponer que esta divergencia deriva de la pérdida de su función inhibitoria dentro de la ATPasa mitocondrial, la cual ha sido sustituida por la existencia de la subunidad accesoria IF_1 . Con el objetivo de conocer la similitudes que la subunidad ϵ de α -proteobacterias presenta con respecto a sus homólogas, realizamos un análisis filogenético de la subunidad construido mediante el método de máxima parsimonia, a partir de 150 secuencias de ϵ provenientes de ATPasas diversas. Encontramos que el árbol filogenético resultante se divide en tres ramas principales en las cuales se agrupan las secuencias mitocondriales (**Fig. 15A: rama verde**), las pertenecientes a α -proteobacterias (**Fig. 15A: rama azul**) y el resto de secuencias bacterianas (**Fig. 15A: rama roja**) respectivamente. Este patrón refleja fielmente la divergencia entre las subunidades mitocondriales y las bacterianas; además de revelar un fenómeno similar para la subunidad ϵ de α -proteobacteria, ya que al separarse de sus contraparte bacteriana y mitocondrial, refleja que ésta también ha perdido su capacidad inhibitoria y que ha sido remplazada por una nueva subunidad, diferente a la IF_1 , nombrada subunidad ζ .

Por su parte, la comparación detallada de las secuencias de las subunidades ϵ de α -proteobacterias ha señalado que de forma similar a sus contrapartes bacterianos y mitocondriales, ésta presenta una mayor divergencia en su porción carboxilo terminal y un alto grado de conservación en su fracción amino terminal (**Fig. 15B**), resaltando la importancia de este dominio en la asociación con las porciones F_1 y F_0 de la enzima.

Figura 14 . Evolución de la subunidad ζ de la ATP sintasa en las α-proteobacterias

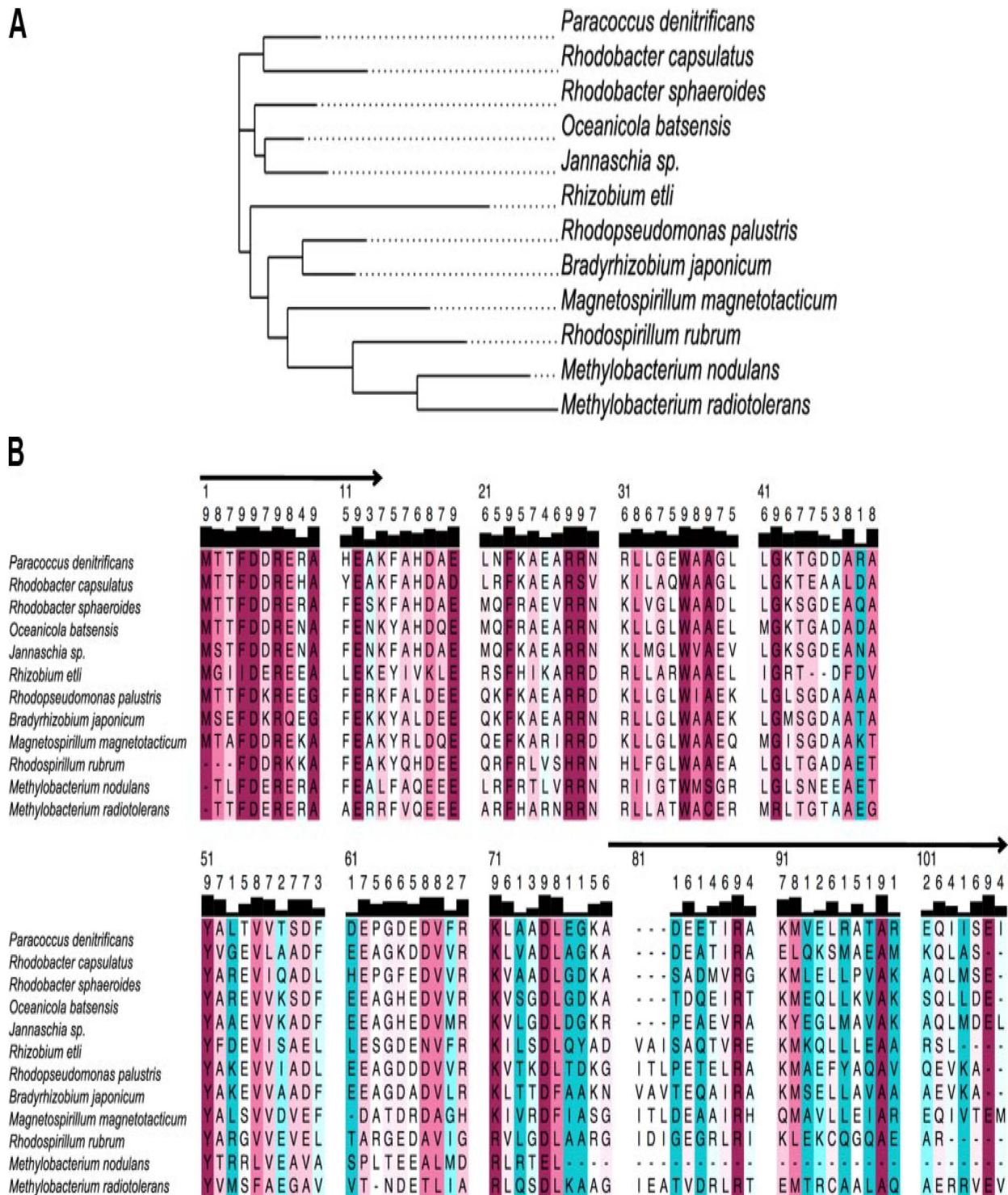
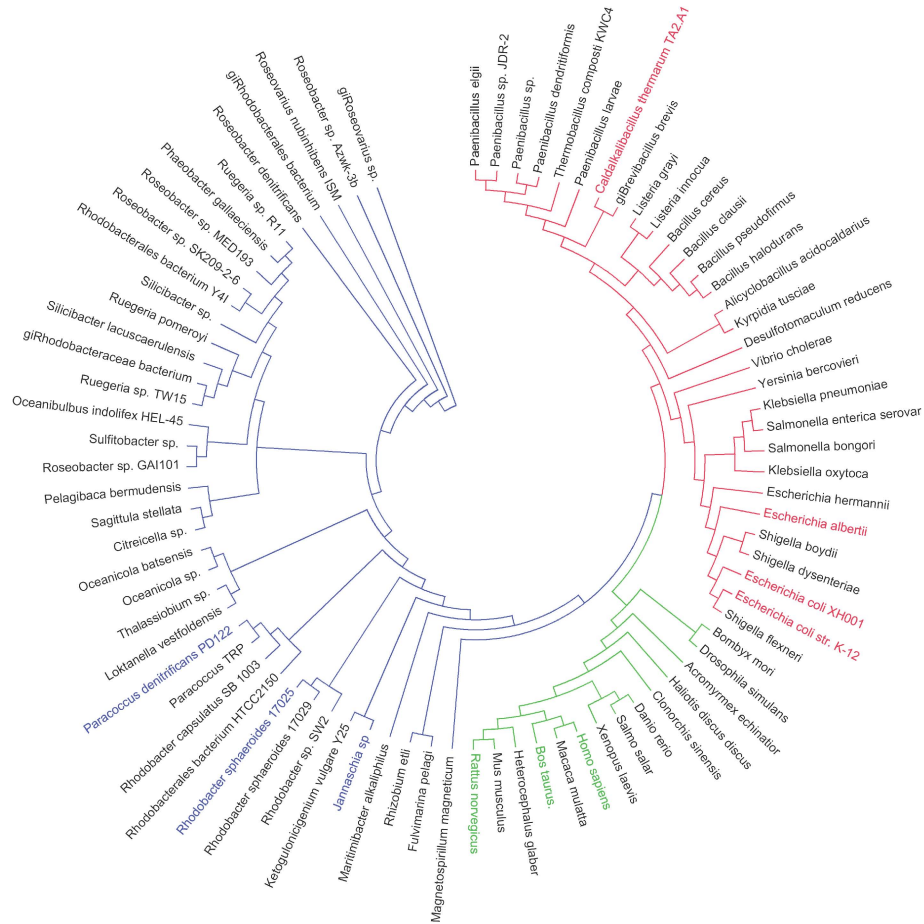


Figura 15 . Evolución de la subunidad ϵ en la ATP sintasa

A



B



Figura 14. Evolución de la subunidad ζ de la ATP sintasa en las α -proteobacterias. A: Reconstrucción filogenética de la subunidad ζ de 12 α -proteobacterias representativas realizada por el método de Neighbour joining. **B:** Alineación de 12 secuencias de aminoácidos representativas de la subunidad ζ de las α -proteobacterias, realizada mediante el programa ClustalW y comparada mediante el programa Consurf, los aminoácidos se colorearon según su grado de conservación (cian: variable, blanco: promedio, cereza: altamente conservado) y su puntaje de conservación se muestra en los gráficos de barra y los números sobre cada residuo, con una escala de 1 a 10 que va de poco conservado hasta totalmente conservado (120).

Figura 15 . Evolución de la subunidad ϵ en la ATP sintasa. A: Cladograma consenso de la subunidad ϵ , obtenido a partir de 100 secuencias de aminoácidos obtenidas aleatoriamente, la construcción del árbol se realizó mediante el programa ClustalW y el programa MEGA, el árbol se obtuvo mediante el método de máxima verosimilitud realizando la prueba de bootstrap con 10000 repeticiones. En color verde se muestran las ramas correspondientes a las subunidades mitocondriales (Vg. *Homo sapiens*, *Ratus norvegicus* y *Bos taurus*), en azul se colorearon las ramas de las subunidades de α -proteobacterias (Ej. *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *Jannaschia sp.*) y en rojo se presentan las subunidades eubacterianas (Vg. TA.2 y *E. coli*) **B:** Alineación de 9 secuencias de aminoácidos representativas de la subunidad ϵ de las α -proteobacterias, realizada mediante el programa ClustalW y comparada mediante el programa Consurf, la imagen presenta el mismo patrón que la imagen anterior.

IV. Identificación del dominio inhibitorio de la subunidad ζ

Como se mencionó anteriormente, la tripsinización parcial de las membranas invertidas de *Paracoccus denitrificans* (activadas con sulfito) genera un incremento en su actividad de ATPasa (114), fenómeno que había sido relacionado con el corte de las subunidades regulatorias en otras ATP sintasas (121, 122). En el caso de *P. denitrificans* no se había ahondado en la explicación de este fenómeno, sin embargo, con el hallazgo de la subunidad inhibitoria ζ (1), se planteó que ésta podría ser el blanco principal de tripsinólisis como resultado de un aumento en su exposición en respuesta a la activación por sulfito.

Con el fin de corroborar la identidad de la subunidad regulatoria y definir las porciones inhibitorias de ésta, realizamos curvas temporales de proteólisis de la PdF_1 pura en condiciones activadas (en presencia de sulfito 60 mM) y en condiciones control.

La actividad de ATPasa de las fracciones resultantes fue cuantificada mediante un ensayo acoplado a la oxidación del NADH, la determinación de los productos de proteólisis se realizó mediante geles desnaturalizantes, análisis de Western Blot anti subunidades ϵ , ζ y β y análisis de espectrometría de masas. Se observó que la tripsinización de la porción PdF_1 pura en presencia de sulfito conlleva a un aumento en la actividad de hidrólisis de aproximadamente el 30%; mientras que la tripsinización en condiciones basales promueve una disminución discreta en la actividad de ATPasa (**Fig. 16**).

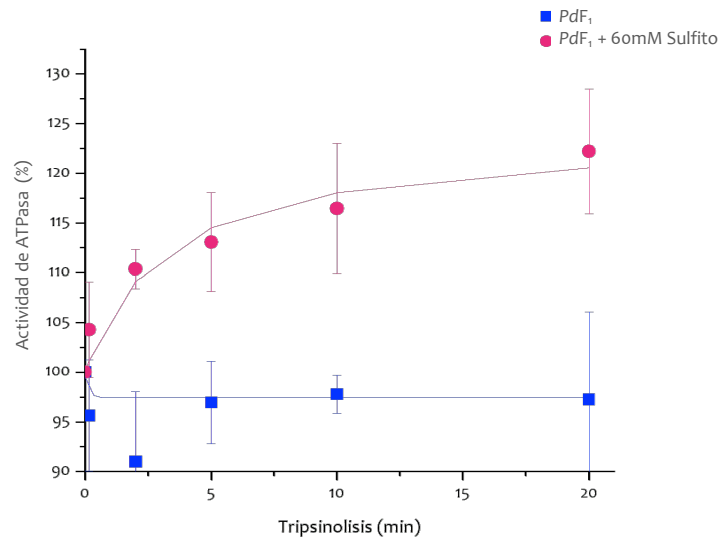


Figura 16. Activación de la PdF_1 -ATPasa por tripsina. Una solución de PdF_1 a 2 $\mu g/\mu l$ en amortiguador 250 mM de Sacarosa y 20 mM de Tris pH 8.0, se incubó con tripsina en una relación molar de 1:20 (tripsina : F_1), en presencia (•) o ausencia (■) de 60 mM de sulfito de sodio, durante 2, 5, 10 y 20 min a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de incubación, la reacción de proteólisis fue detenida mediante la adición de PMSF a una concentración final de 5 mM. Posteriormente su actividad hidrolítica fue cuantificada mediante el método espectrofotométrico utilizando el sistema acoplado

en presencia de 5 mM de sulfito a 37°C. La actividad de ATPasa de la PdF_1 previa a la tripsinización fue cuantificada mediante el mismo sistema y se estandarizó como el 100 % de actividad presente al tiempo cero de tripsinización.

El estudio mediante Western Blot mostró que la conformación existente en la condición basal presenta una clara exposición de la subunidad ϵ , ya que en tiempos cortos de proteólisis el contenido de esta subunidad se ve reducido notablemente. En contraste la cantidad de subunidad ζ y β se mantienen constantes a través del tiempo reflejando su poca exposición hacia el medio (**Fig. 17A**).

Por su parte, la activación por sulfito promueve un cambio conformacional en el que la subunidad ζ y β se exponen y la subunidad ϵ se oculta en la estructura de la F_1 , hecho que se refleja en la presencia de productos de proteólisis de ζ y β desde el inicio del ensayo, asociada a un contenido casi constante de la subunidad épsilon durante el experimento (**Fig. 17B**).

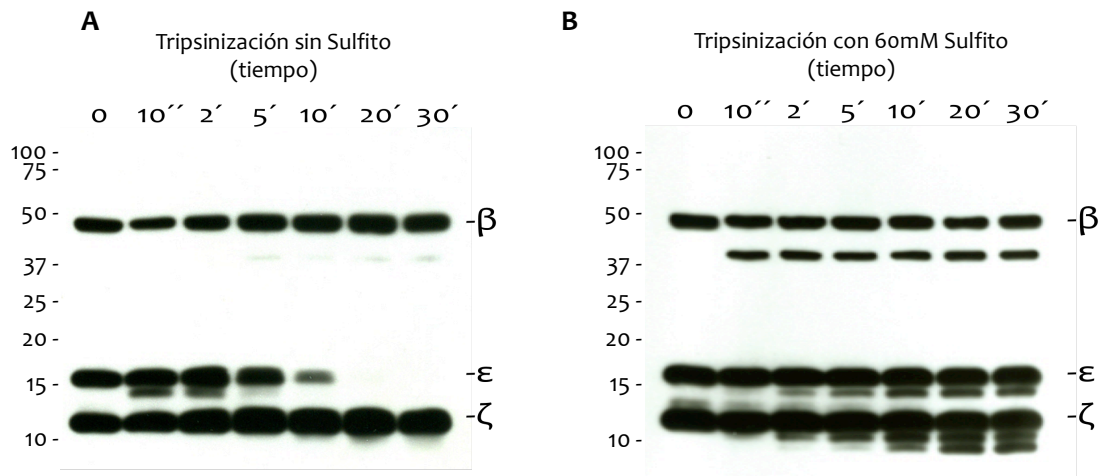


Figura 17. Identificación de los péptidos producto de la tripsinólisis limitada de la PdF_1 . Curvas temporales de tripsinización de PdF_1 a una relación 1:20 (Tripsina : F_1) fueron realizadas, en presencia o ausencia de 60 mM de sulfito; la reacción de proteólisis fue

detenida mediante la adición de PMSF 5 mM a los 10 s, 2 min, 5, 10, 20 y 30 min, respectivamente. Las fracciones fueron cargadas en geles desnaturalizantes Von Jagow con 15 % de acrilamida y posteriormente fueron transferidas a membrana de PVDF. Las membranas resultantes fueron divididas en dos porciones usando el marcador de 25 KDa como referencia, la porción superior fue retada contra el anticuerpo policlonal anti- β (1:25000) y la porción inferior fue incubada con los anticuerpos policlonales anti-Pd ζ (1:30000) y anti-Pd ϵ (1:30000); la señal fue detectada mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial ECL-plus de Amersham y placas fotográficas de Kodak. El panel derecho (**A**) muestra el patrón de tripsinización de la curva en ausencia de sulfito, mientras que el panel izquierdo (**B**) representa la tripsinólisis limitada en presencia de 60 mM de sulfito de sodio.

El análisis de espectrometría de masas a partir de las bandas producto de las proteólisis nos permitió realizar la identificación de los fragmentos proteolíticos obtenidos de ϵ y ζ ; encontrando que bajo las condiciones control (ausencia de sulfito), es posible determinar que el extremo carboxilo terminal de la subunidad ϵ es proteolizado, generando un fragmento de aproximadamente 11KDa que comprende los residuos M1-R103 (el cual no es reconocido por el anticuerpo) (**Fig. 18B**). Por el contrario, durante la activación con sulfito, el extremo carboxilo de ϵ se protege mientras que el extremo amino se expone, lo cual da lugar a un cambio en el patrón de tripsinización de esta subunidad produciendo un fragmento de 14 KDa que contiene al péptido E113 - H148 (**Fig. 18C**).

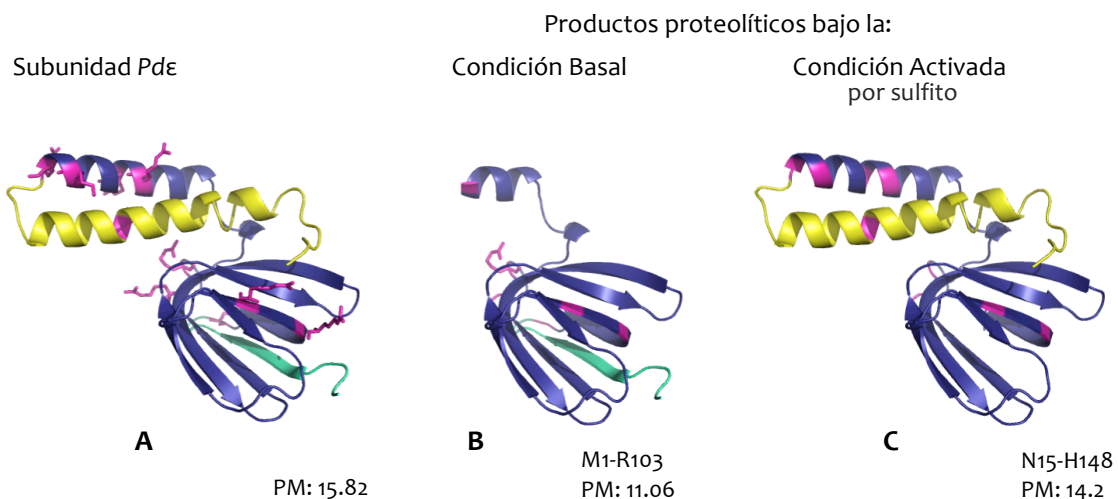


Figura 18. Patrón proteolítico de la subunidad ϵ dentro de la PdF1. A) Modelo de la subunidad Pde: El modelo se realizó mediante el programa SWISS-model utilizando el método de modelado por homología entre la subunidad ϵ de *P. denitrificans* con respecto a la estructura cristalográfica de su contraparte en *Escherichia coli* (1AQT), en amarillo se señala la porción carboxilo terminal de la subunidad y en cian se colorea su porción amino terminal; en rosa se presentan los residuos blanco de la tripsina (Arginina y lisina). Su peso molecular teórico es de 15.82 KDa. **B) Producto proteolítico de la subunidad ϵ en la condición basal:** Fragmento de la subunidad ϵ comprendido desde la metionina 1 hasta la arginina 103 con un peso molecular teórico de 11.06KDa. **C) Producto proteolítico de la subunidad ϵ durante las condición hidrolíticamente activa:** Fragmento de la subunidad ϵ comprendido desde la asparagina 15 hasta la histidina 148 con un peso molecular teórico de 14.2 KDa.

Asimismo, el análisis de péptidos de la subunidad ζ demostró que ésta se proteoliza en cantidades mínimas bajo condiciones control y únicamente a tiempos prolongados de tripsinización (**Fig. 19B**), mientras que en condiciones activadas con sulfito, ésta es cortada rápidamente generando dos péptidos principales que comprenden del residuo F15 al R86 y de F15 al K71 (**Fig. 19C**).

Los resultados corroboraron que la activación de la hidrólisis del ATP mediante la adición de sulfito, está acompañada de una degradación preferencial de la subunidad ζ , ratificando que esta subunidad es el inhibidor principal de la F_1F_0 -ATPasa de *P. denitrificans*. Sin embargo, debido a que el estudio de espectrometría de masas señaló que tanto los extremos amino como el carboxilo aumentaron su grado de exposición como resultado de la activación, fue imposible discernir si uno de ellos o ambos contenía el dominio inhibitorio de la subunidad.

Por otro lado, estudios de proteólisis limitada de la subunidad $Pd\zeta$ aislada mostraron que la remoción de 14 y 25 aminoácidos de su porción amino y carboxilo terminal respectivamente genera un fragmento estable sin capacidad inhibitoria (123), hecho que reforzó nuestros resultados, pero no esclareció la identidad del dominio inhibitorio.

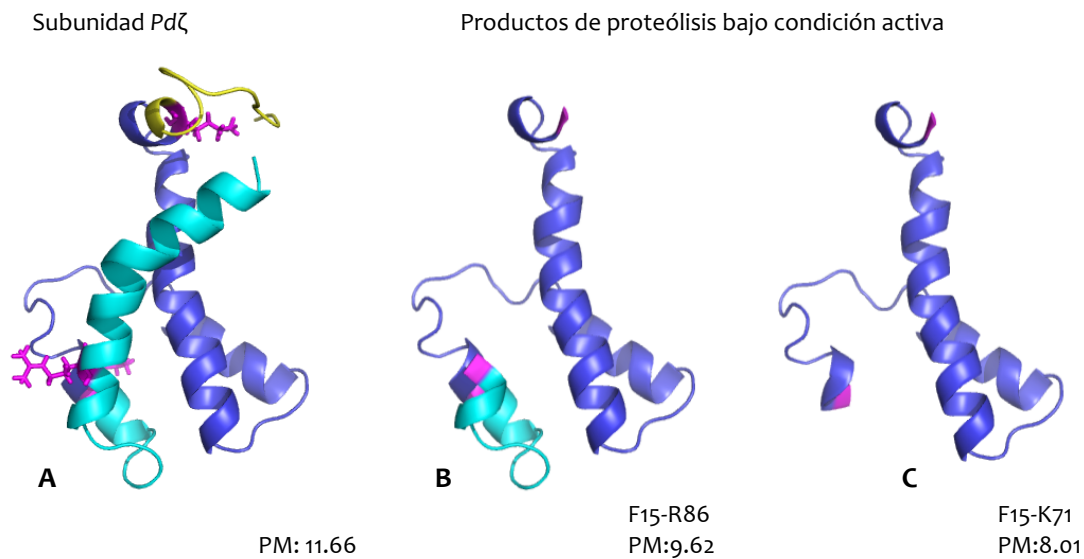


Figura 19. Patrón proteolítico de la subunidad ζ dentro de la PdF_1 . **A) Estructura en solución de la subunidad $Pd\zeta$:** La estructura fue resuelta mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (124) por el grupo del Dr. Kurt Wütrich (2LLO), en amarillo se señala la porción amino terminal de la subunidad y en cian se colorea su porción carboxilo terminal; en rosa se presentan los residuos blanco de la tripsina. Su peso molecular teórico es de 11.66 KDa. **Productos proteolíticos de la subunidad ζ dentro de la F_1 bajo condiciones activadas:** **B)** Fragmento de la subunidad ζ con un peso molecular teórico de 9.62 KDa, correspondiente a la secuencia comprendida entre la fenilalanina 15 y la arginina 86 **C)** Fragmento de la subunidad ζ desde la fenilalanina 15 hasta la lisina 71 con un peso molecular teórico de 8.01 KDa.

Con el objetivo de definir la porción inhibitoria de la subunidad ζ y considerando el alto grado de conservación del extremo amino terminal entre las subunidades ζ observado mediante el análisis de alineamientos globales múltiples (**Fig. 14**), así como la gran movilidad que esta porción reflejó en los estudios de NMR y de tripsinólisis limitada, decidimos realizar una mutante con una ablación de 14 aminoácidos en su porción amino terminal, la cual denominamos $Pd\zeta^{\Delta NT}$. Para ello, se realizó la amplificación del gen mutante a partir del plásmido Pt7-7 ligado a la subunidad $Pd\zeta^{WT}$ (pIPPD1), generando un producto de PCR o amplicón de 300pb de acuerdo con lo esperado (**Fig. 20A**).

Por su parte, el plásmido PT7-7 vacío fue digerido secuencialmente con la enzima *EcoR1* y con *HindIII*, obteniendo exitosamente una banda de aproximadamente 2470pb (**Fig. 20B**). Posteriormente, se realizó la ligación en el plásmido PT7-7 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y se procedió a transformar a la cepa DH5 α , con el fin de generar una gran cantidad de vector con inserto. Finalmente, se transformó la cepa BL21-codon plus, utilizada para la sobreexpresión de proteínas. La confirmación de la presencia del inserto en las transformantes BL21-codon plus se realizó mediante análisis de restricción con *EcoR1* y *HindIII* (**Fig. 20C**) y la verificación de la secuencia mediante secuenciación de DNA, encontrando que nuestra construcción no tenía alguna mutación inesperada.

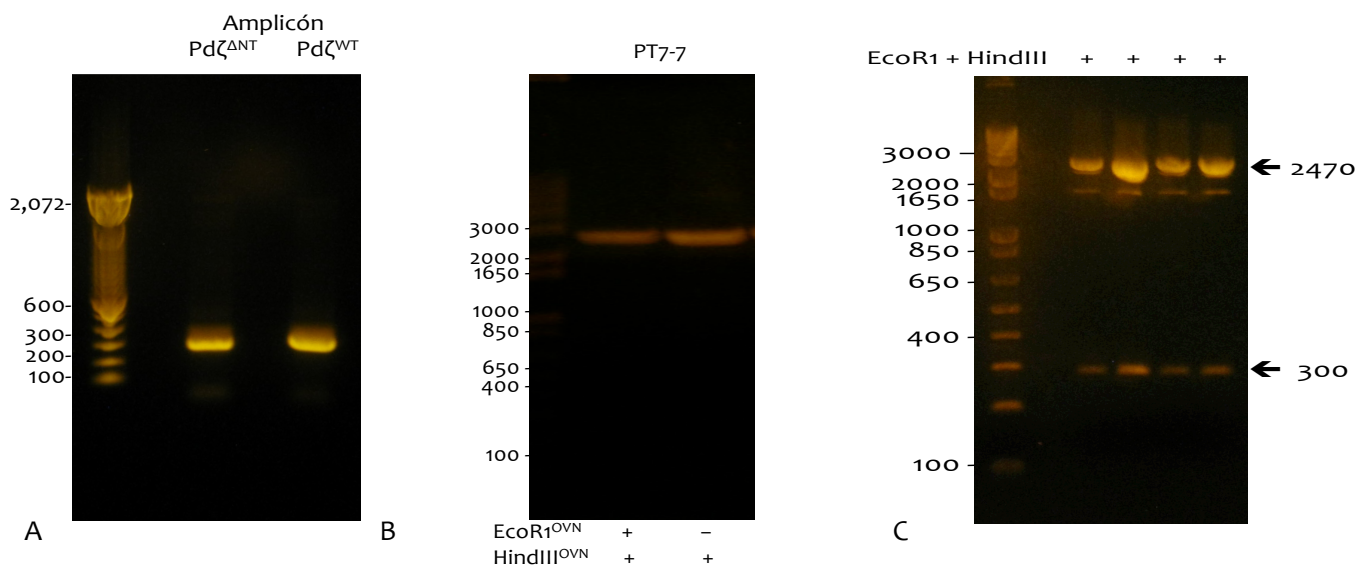


Figura 20. Generación de la mutante $Pd\zeta^{\Delta NT}$. **A)** Gel de agarosa con los productos de PCR generados a partir del plásmido pIPPD1 y los oligonucleótidos para $Pd\zeta^{\Delta NT}$ y $Pd\zeta^{WT}$; **B)** Gel de agarosa con el plásmido PT7-7 linearizado con $EcoR1$ durante 12 h (carril 1) y con el plásmido cortado con $EcoR1$ y $HindIII$ durante 12 h cada uno (carril 2) **C)** Verificación de la presencia del inserto en 4 cepas transformantes BL21-codon plus. Los plásmidos obtenidos de las cepas fueron doblemente digeridos por $EcoR1$ y $HindIII$ generando un fragmento de 2470pb del vector vacío y otro de 300pb correspondiente al inserto.

El protocolo de purificación de la construcción $Pd\zeta^{\Delta NT}$ fue similar al de su contraparte silvestre, en el cual se realizaron dos pasos de precipitación con sulfato de amonio, seguidos de una columna DEAE y finalizando con una columna de exclusión molecular Superdex 75. A este protocolo se le agregó una filtración por centricon de corte 30KDa como paso final de purificación de la proteína. La pureza de la proteína fue alta (**Fig. 21A**), por lo que se realizaron curvas de reconstitución de la PdF_1 pura con cantidades crecientes de $Pd\zeta^{\Delta NT}$, seguidas de la cuantificación de su actividad hidrolítica de ATP mediante el método de liberación de fosfato. Encontramos que la remoción de los primeros 14 aminoácidos de la porción amino terminal de la subunidad ocasionan la pérdida completa de su capacidad inhibitoria (**Fig. 21C**). De esta manera establecimos que en este segmento se localiza la porción inhibitoria de la subunidad.

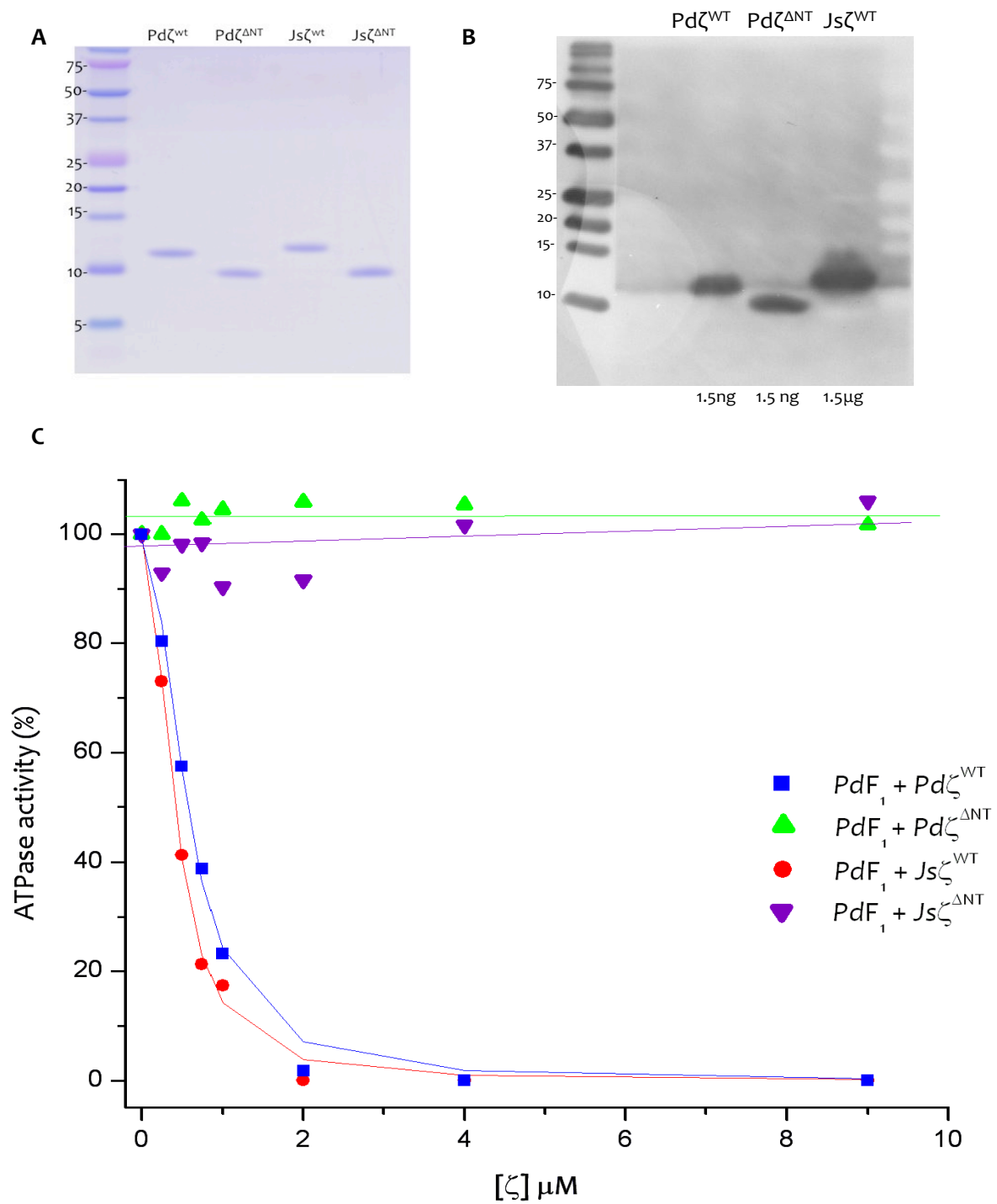


Figura 21. Capacidad inhibitoria de las subunidades $Pd\zeta^{WT}$, $Pd\zeta^{\Delta NT}$, $Js\zeta^{WT}$ y $Js\zeta^{\Delta NT}$. **A)** SDS-PAGE de las subunidades recombinantes puras, 2 μ g de las subunidades $Pd\zeta^{WT}$ (carril 2), $Pd\zeta^{\Delta NT}$ (carril 3), $Js\zeta^{WT}$ (carril 4) y $Js\zeta^{\Delta NT}$ (carril 5) fueron cargados a un gel desnaturante Von Jagow al 15 %, la pureza de las preparaciones fue mayor al 93 % según el análisis densitométrico de la tinción por azul de Coomassie ; **B)** Western Blot anti $Pd\zeta$ de las subunidades recombinantes, 1.5 ng de $Pd\zeta^{WT}$ y $Pd\zeta^{\Delta NT}$ y 1.5 μ g de $Js\zeta^{WT}$ se cargaron a un gel Von Jagow al 15%, posteriormente el gel fue transferido a membrana de PVDF e incubado durante 1.5 h con el anticuerpo anti $Pd\zeta$; la detección del anticuerpo se reveló por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL-plus (Amersham); **C)** Actividad hidrolítica de la PdF_1 reconstituida con cantidades crecientes de las distintas subunidades ζ recombinantes, 10 μ g de PdF_1 se pre-incubaron durante 30 min con cantidades crecientes de subunidad ζ en medio de reconstitución con 60 mM sulfito, posteriormente se añadió 10 mM de Mg^{2+} ATP y se permitió el desarrollo de la actividad hidrolítica durante 1 min a 37° C; la reacción se detuvo añadiendo 6 % de TCA y se cuantificó colorimétricamente mediante el método de liberación de fosfato. Las actividades fueron normalizadas y ajustadas a un modelo de inhibición de Hill modificado. El 100 % de actividad de ATPasa correspondió de 17-20 μ mol/min $\times$ mg y los valores de IC_{50} calculados fueron de $0.577 \pm 0.032 \mu$ M para la $Pd\zeta^{WT}$ and $0.415 \pm 0.018 \mu$ M para la $Js\zeta^{WT}$.

Debido a que la pérdida de la función inhibitoria de la subunidad trunca $Pd\zeta^{\Delta NT}$ podría asociarse a un plegamiento anómalo, decidimos corroborar su capacidad de interacción con la porción PdF_1 . Realizando ensayos de competencia de unión de esta subunidad con respecto a la ζ^{WT} sobre la PdF_1 , encontramos que la cinética de inhibición de la subunidad zeta silvestre se ve retrasada y parcialmente prevenida (6 % actividad residual) por la pre-incubación con $Pd\zeta^{\Delta NT}$ (trazo rojo), con respecto a la inhibición total observada en el trazo sin subunidad trunca (trazo verde) (**Fig. 22**) . Este resultado sugiere fuertemente la estructuración adecuada de la subunidad ζ mutante y un correcto reconocimiento de su sitio de unión.

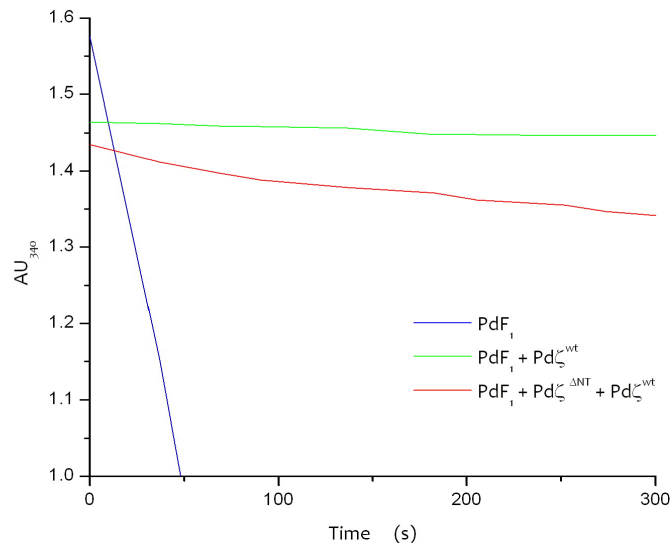


Figura 22. Competencia entre $Pd\zeta^{\Delta NT}$ y $Pd\zeta^{WT}$ durante la actividad hidrolítica de PdF_1 . Decaimiento de la absorbancia a 340nm asociado a la actividad de ATPasa de la PdF_1 (relacionado mediante el sistema enzimático acoplado) **Trazo azul:** Actividad de ATPasa control. **Trazo verde:** Actividad de ATPasa de la PdF_1 reconstituida con 10 μg de $Pd\zeta$ durante 1 min. **Trazo rojo:** ATPasa de PdF_1 pre-incubada con 20 μg de $Pd\zeta^{\Delta NT}$ durante 30 min previos a la reconstitución de 10 μg de $Pd\zeta$ durante 1 min. En cada caso 10 μg de PdF_1 fueron pre-incubados con las cantidades indicadas de subunidades ζ en 10 μl de amortiguador de reconstitución adicionado con 60 mM de sulfito de sodio, antes de medir su velocidad de ATPasa. La mezcla de reacción fue adicionada con 0.15 % de LDAO para activar la ATPasa y contiene 0.75 mM de sulfito residual, la temperatura de medición fue de 37° C. Las actividades de los trazos determinadas en el primer minuto fueron: control (azul) 11.11 $\mu mol/min/mg$; $PdF_1 + Pd\zeta^{wt}$ (verde) 0.065 $\mu mol/min/mg$ y $PdF_1 + Pd\zeta^{wt} + Pd\zeta^{\Delta NT}$ (rojo) 0.49 $\mu mol/min/mg$.

Conjuntamente corroboramos la capacidad de unión de la subunidad $Pd\zeta^{\Delta NT}$ a su sitio en la F_1 realizando un ensayo de cromatografía de exclusión molecular, en el cual la mezcla $PdF_1 + Pd\zeta^{\Delta NT}$ previamente reconstituida, fue analizada mediante su paso por la columna Superdex 200. Encontrándose que el patrón de elución seguido a 280nm exhibía la presencia de dos picos mayoritarios bien definidos (**Fig. 23A**), que al ser analizados mediante electroforesis desnaturalizante mostraron representar la población de $Pd\zeta^{\Delta NT}$ asociada a la PdF_1 y subunidad $Pd\zeta^{\Delta NT}$ libre (**Fig. 23B**). En conjunto, estos resultados confirman que la ablación de 14 aminoácidos del extremo amino de la subunidad ζ no afecta su estructura ni su capacidad de interactuar con su sitio de reconocimiento.

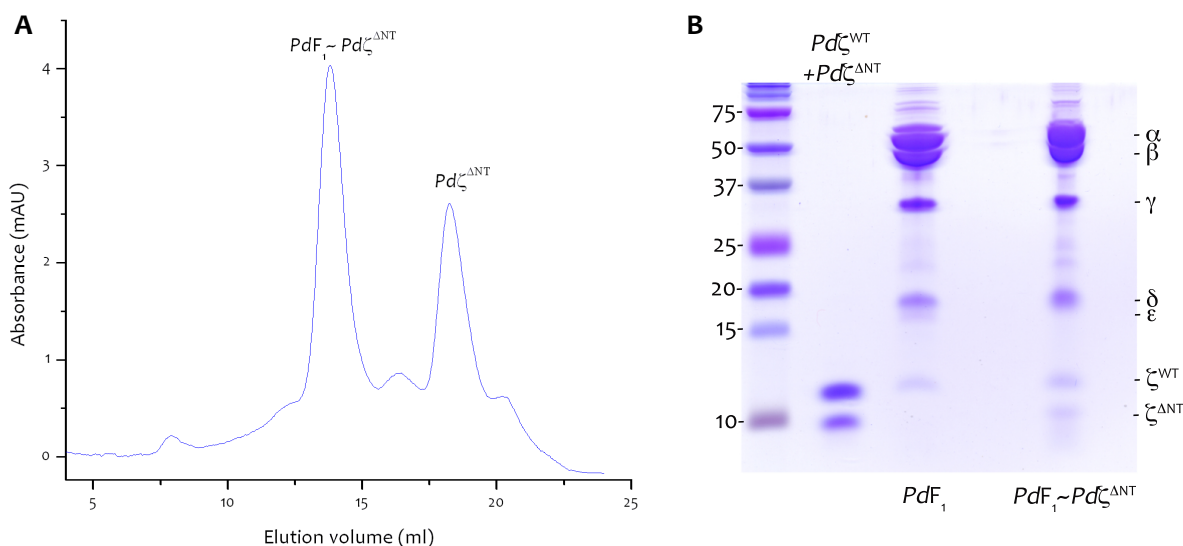


Figura 23. Reconstitución de la subunidad $Pd\zeta^{\Delta NT}$ en la porción PdF_1 . Quinientos microgramos de PdF_1 fueron incubados con un exceso (10 veces en molaridad) de subunidad $Pd\zeta^{\Delta NT}$ pura en amortiguador de sacarosa-Tris pH 8.0 durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de sulfito de sodio 60 mM, posteriormente la mezcla se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular. **A. Perfil de elución seguido por absorción a 280nm, de la columna Superdex 200:** El primer pico mayoritario de absorbancia, obtenido a los 14 minutos de la elución, corresponde a la porción PdF_1 unida con la subunidad $Pd\zeta^{\Delta NT}$ y el segundo pico alrededor de 18 min corresponde a la subunidad $Pd\zeta^{\Delta NT}$ libre. **B. Gel desnaturalizante** Carril 1: estándares de peso molecular, Carril 2: mezcla de las subunidades recombinantes $Pd\zeta^{WT}$ y $Pd\zeta^{\Delta NT}$, Carril 3: PdF_1 inicial, Carril 4: Fracción de elución correspondiente al min 14

V. Conservación de la función inhibitoria de la subunidad ζ en la clase de las α -proteobacterias

La regulación de la actividad hidrolítica de la ATP sintasa mediada por la subunidad ζ , parece no ser un suceso aislado y delimitado a la especie de *Paracoccus denitrificans*. Evidencia de esto es: la presencia del marco de lectura abierto en la clase de las α -proteobacterias (analizado en sección III de resultados); la expresión de la subunidad ζ como componente de la ATPasa en *Rhodobacter sphaeroides* (1); y la gran similitud

estructural entre las subunidades ζ de *P. denitrificans* (PDB id: 2LLO) y de *Jannaschia sp* (PDB id: 2KZC) . La posibilidad de que la subunidad ζ funcione como un inhibidor dentro de otras α -proteobacterias no había sido comprobada. Con este objetivo realizamos la clonación y purificación de la subunidad ζ de *Jannaschia sp* “ $Js\zeta^{WT}$ ” (**Fig. 21A**), (plásmido proporcionado por el grupo del Dr. Wütrich) corroborando su identidad mediante WB (**Fig. 21B**), para posteriormente comprobar su capacidad inhibitoria sobre la F_1 pura de *P. denitrificans*, encontrando que ésta es capaz de inhibir la actividad de ATPasa de la PdF_1 con un patrón similar al descrito por la subunidad propia del organismo (**Fig. 21C**).

Gracias al Dr. Wütrich también contábamos con el plásmido de la subunidad $Js\zeta^{\Delta NT}$, el cual contenía dos ablaciones, una de 19 residuos en el amino terminal y otra de 5 aminoácidos en el C-terminal. Esta proteína también fue purificada (**Fig. 21A**) y su capacidad inhibitoria también fue analizada, revelando que la ausencia de estos aminoácidos impide la función inhibitoria de la subunidad (**Fig. 21C**). De esta manera confirmamos la importancia del N-terminal de la subunidad zeta para su función inhibitoria.

VI. Determinación de la afinidad del sitio de unión a nucleótido de la $Pd\zeta$

Dado que la subunidad regulatoria bacteriana ϵ presenta la capacidad de unir ATP y éste juega un papel central en la regulación de su inhibición, consideramos que la subunidad ζ , al ser una subunidad reguladora bacteriana, también podría compartir esta capacidad. Asimismo, durante el análisis estructural de la subunidad, el grupo del Dr. Wütrich encontró que algunos residuos de la ζ sufrían modificaciones de sus corrimientos químicos como respuesta a la presencia de 10 mM de ATP o ADP (125), lo cual sugería fuertemente la existencia de un sitio de unión a nucleótido. Dado

estos resultados preliminares, realizamos estudios de calorimetría isotérmica de titulación de ATP sobre la subunidad $Pd\zeta^{WT}$, con el objetivo de definir la afinidad del sitio. Se encontró que los datos experimentales se ajustaron a un modelo de unión simple a ATP, el cual exhibía una afinidad de 11.4 mM, un ΔH de 1830 ± 32.5 cal/mol y ΔS de 42.5 cal/mol K (**Fig. 24**)

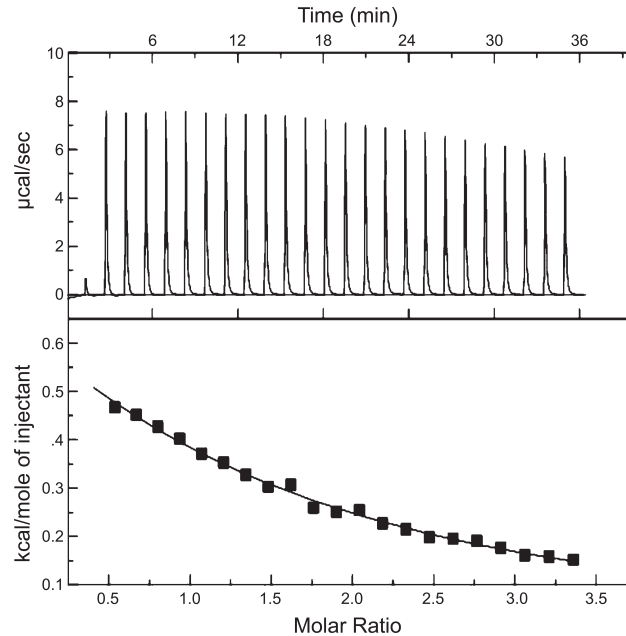


Figura 24. Calorimetría de titulación isotérmica de unión del ATP a la subunidad $Pd\zeta$. La subunidad $Pd\zeta$ desgasificada y pre-equilibrada a 25° C con una concentración de 4.77 mM (52.5 μg/μl) en amortiguador de Sacarosa-Tris pH 8.0 fue cargada en la celda del micro-calorímetro “Microcal ITC200”, una vez que el sistema se estabilizó en 25° C, la celda fue titulada automáticamente con 25 inyecciones de 1.5μl de una solución madre de ATP 82.14 mM. En el **panel superior** se muestran las espigas del calor resultado de la unión del nucleótido, las cuales fueron integradas manualmente y cuyo calor de dilución del ATP fue sustraído de los datos mediante un experimento paralelo con el mismo patrón de inyecciones pero en una celda en ausencia de $Pd\zeta$. En el **panel inferior** se muestra el ajuste de los datos a un modelo de unión no lineal de un solo sitio con el cual se obtuvo un valor de K_d de 11.4 mM

La confirmación de la interacción ζ -ATP, nos llevó a investigar si ésta realizaba algún tipo de regulación sobre la capacidad inhibitoria de la subunidad ζ , por lo que efectuamos la cuantificación de la actividad hidrolítica de la PdF_1 reconstituida con cantidades crecientes de $\text{Pd}\zeta^{\text{WT}}$ a distintas concentraciones de ATP. Encontramos que a bajas concentraciones, la inhibición mediada por ζ es muy eficiente pero que al aumentar la concentración de nucleótido disminuye su capacidad inhibitoria, hecho que se refleja en un aumento de los valores de estequiometría $\text{PdF}_1:\zeta$ necesarios para inhibir la mitad de la actividad (IC_{50}), además de la pérdida de su comportamiento como inhibidor total (**Fig. 25**) .

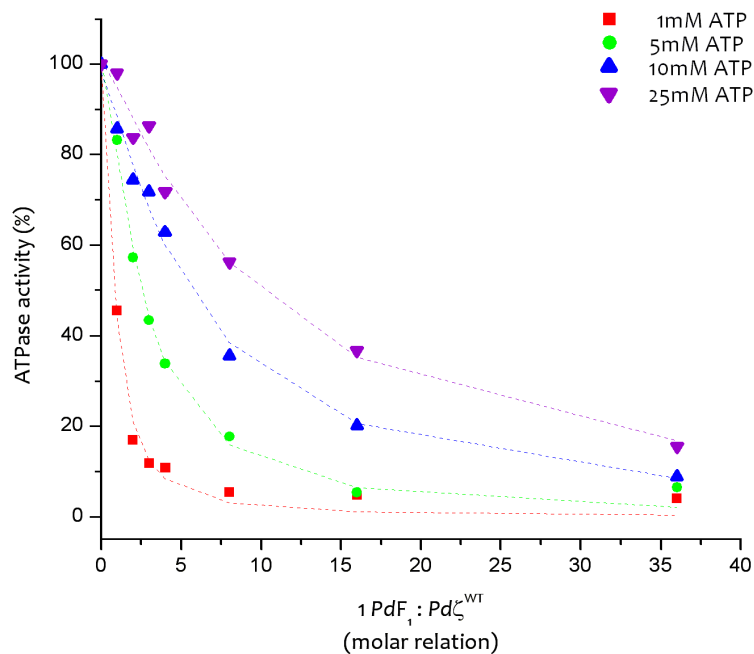


Figura 25 Modulación de la capacidad inhibitoria de la subunidad ζ por ATP. Curvas de inhibición de la subunidad $\text{Pd}\zeta$ a diferentes concentraciones de ATP. $5\mu\text{g}$ de PdF_1 se reconstituyeron con las cantidades indicadas de subunidad $\text{Pd}\zeta$ durante 30 min en $13\mu\text{l}$ de amortiguador Sacarosa-Tris pH 8.0 con diferentes cantidades de ATP (1 mM, 5 mM, 10 mM y 25 mM); posteriormente se cuantificó su actividad hidrolítica mediante el método acoplado utilizando mezclas de reacción con la concentración correspondiente de ATP constante (1 mM, 5 mM, 10 mM y 25 mM), además de un exceso de enzimas piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa, y del sustrato

fosfoenolpiruvato. Las actividades obtenidas se graficaron y se ajustaron a un modelo de inhibición de Hill modificado. La actividad al 100 % correspondiente a la curva con 1 mM de ATP fue 1.37 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$, a 5 mM fue 1.69 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$, a 10 mM fue 1.87 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ y a 25 mM fue 1.78 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$

Discusión

Paracoccus denitrificans es un alfa proteobacteria posiblemente emparentada con el ancestro que dio origen a las mitocondrias y representa un buen organismo modelo para estudiar la transformación evolutiva del mecanismo regulatorio de la ATP sintasa.

I. Cinética de inhibición de la Pd ζ sobre la PdF₁-ATPasa

En el del laboratorio se había descrito que la subunidad ζ de *P. denitrificans* era el inhibidor natural de la actividad de ATPasa de su F₁F₀-ATP sintasa (1), sin embargo la posible participación de la subunidad ϵ en este mecanismo inhibitorio debía ser esclarecida. La purificación del subcomplejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ nos brindó la posibilidad de estudiar los efectos directos que la reconstitución de las subunidades ϵ y ζ recombinantes tienen sobre su actividad de ATPasa, previniendo interferencias generadas por el contenido de las subunidades ϵ y ζ endógenas. Anteriormente se había reportado que la remoción del 30% de la subunidad ζ conlleva un aumento de 5 veces en la actividad de ATPasa basal (cuantificada en presencia de 0.15 % de LDAO) (123). Sin embargo, la depleción de las subunidades ϵ y ζ indujo una disminución en la actividad final de la enzima (de 20 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ a 12 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$), causada por la remoción de la subunidad ϵ .

La reconstitución del complejo PdF₁ y del subcomplejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ con las subunidades ϵ y ζ desplegaron patrones muy similares, ya que ambas presentaron una mejora sutil de

su actividad inicial como resultado de la adición de subunidad ϵ (o $\epsilon^{\Delta CT}$) (**Fig. 8 y 9, actividad a 0 μM de Pd ζ**) y exhibieron la inhibición mediada por ζ como un patrón hiperbólico total, que se ajustó de forma satisfactoria a un modelo de Hill (**Fig. 8 y 9**) el cual no fue alterado por la reconstitución de subunidad ϵ (ni $\epsilon^{\Delta CT}$) (**Fig. 8 y 9, trazos rojo y verde**). Sin embargo al ser reconstituidas, ambas proteínas dieron lugar a constantes cinéticas ligeramente diferentes, ya que la presencia de las subunidades endógenas aumentó los valores aparentes de α e IC_{50} , pues mientras la afinidad de la subunidad ζ hacia el complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ fue de 0.27 μM , la obtenida para el PdF₁ fue de 0.37 μM . Asimismo los valores de Hill calculados aumentaron de 1.3 a 2.0 para $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ y PdF₁ respectivamente. Aún cuando el último valor abrió la posibilidad de la existencia de una estequiometría de 2 ζ por cada F₁, es posible que los valores obtenidos para el subcomplejo que carece de ϵ y ζ endógenas sean más confiables. Aún es necesario obtener mayor información experimental sobre la estequiometría exacta de esta interacción, nuestros datos permiten proponer que la inhibición mediada por la subunidad ζ presenta una afinidad en el intervalo nanomolar. Este valor es comparable a los de K_i de unión de los inhibidores de la F₁-ATPasa bacteriana ($\epsilon \approx 10$ nM; (34)) y mitocondrial (IF₁ ≈ 0.4 μM ; (126, 127)). En conclusión, la subunidad ζ tiene una estequiometría de 1:1 (ζ/F_1) y además cuenta con un mecanismo inhibitorio independiente de la subunidad ϵ , ya que ésta no presenta capacidad inhibitoria per se y no afecta la afinidad de unión de la subunidad ζ exógena a la ATPasa, sumándose a los ejemplos de ATPasas como las de *Bos taurus* y *Bacillus subtilis* (128), en donde la subunidad ϵ ha perdido su función inhibitoria sobre la F-ATP sintasa.

II. Mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ

La caracterización del mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ se realizó mediante tres enfoques distintos; el primero basado en el uso de entrecruzadores químicos resolvió la posición de la subunidad Pd ζ dentro de la porción PdF₁ inhibida, mostrando que ésta es capaz de interactuar tanto con subunidades del estator (α/β) como con subunidades del rotor (γ y probablemente ϵ) (**Fig. 12 y 13**); el segundo, abordado mediante estudios de tripsinólisis limitada, manifestó que la transición entre el

estado de ATPasa activo e inhibido de la PdF_1 conlleva un cambio conformacional global de su estructura, en el cual la subunidad ζ oculta sus porciones amino y carboxilo terminales dentro de la enzima (**Fig. 17 y 19**); y finalmente el tercer enfoque localizó el dominio inhibitorio de la subunidad, ya que de forma congruente a los análisis de conservación de dominios (**Fig. 14B**) y los estudios de proteólisis limitada de la subunidad recombinante pura (123), la subunidades $Pd\zeta^{\Delta NT}$ y $Js\zeta^{\Delta NT}$ fueron incapaces de inhibir la actividad catalítica de la enzima (**Fig. 21**). Además, los dos fragmentos no perdieron sus estructuras nativas (**Fig. 22, 23 y estructura PDB id: 2KZC**), lo cual señaló a las porciones amino terminales de estas proteínas como las responsables de realizar la función inhibitoria. En conjunto, estos resultados nos permitieron proponer un mecanismo inhibitorio en el que la subunidad ζ inserta su porción amino terminal altamente móvil (**PDB id: 2LLO**) en una interfaz $\alpha/\beta/\gamma$ bloqueando la rotación de γ/ϵ y (o) los cambios conformacionales de α/β de la PdF_1 -ATPasa. Asimismo la liberación de la actividad hidrolítica se asocia a un re-arreglo conformacional de la subunidad ζ en el cual su región amino terminal cambia sus interacciones con la PdF_1 aumentando su grado de exposición al solvente.

Aun cuando el mecanismo propuesto para nuestra subunidad evoca a los realizados por las subunidades regulatorias ϵ e IF_1 (ya que estos interfieren con la rotación del cuello central y los cambios conformacionales de las subunidades α/β), es necesario resaltar que cada una de estas subunidades posee un mecanismo con particularidades propias y con interacciones a nivel molecular con la ATP sintasa diferentes (74, 85, 129, 130) (**Fig. 4 y 6**). Mientras que la subunidad ϵ forma parte del rotor y funciona como una trinquete interactuando principalmente con la subunidad γ , la proteína IF_1 pertenece al estator y muestra una mayor superficie de contacto con la interfaz α/β . Además, debemos recordar que la subunidad ζ cuenta con una secuencia (**Fig. 14A**) y estructura (**2LLO**) completamente distintas a las de sus contrapartes bacteriana y mitocondrial, lo cual sugiere que ésta lleva a cabo su mecanismo inhibitorio mediante contactos distintos a los descritos para estas subunidades, y que necesitan ser analizados mediante estudios de cristalografía de

rayos x. Asimismo, cabe recalcar las diferencias entre los dominios inhibitorios de las subunidades, pues mientras la subunidad ϵ e IF_1 inhiben gracias a sus estructuras helicoidales (74, 85, 129, 130) (carboxilo y amino terminal respectivamente), el dominio inhibitorio de la subunidad ζ reside en una porción de la proteína que no es capaz de adquirir estructura secundaria en solución (**Fig. 26**), reforzando las diferencias entre estos mecanismos. Finalmente, dado que la subunidad $Pd\zeta^{ANT}$ mantiene su estructura globular y es capaz de unirse a la PdF_1 -ATPasa sin ejercer inhibición alguna, podemos proponer que esta porción de la proteína puede funcionar como dominio de anclaje, lo cual ha sido propuesto también para la IF_1 (131), aunque con un dominio de anclaje diferente.

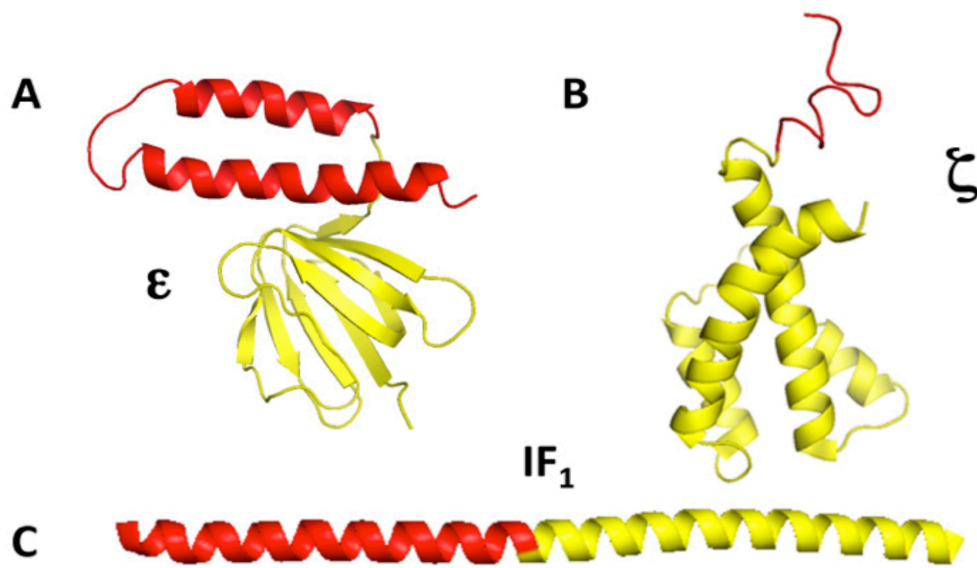


Fig. 26 Estructuras de las proteínas inhibitoras de la F_1 -ATPasa y sus dominios inhibitorios. **A)** Estructura de rayos X de la subunidad ϵ de *E. coli* (PDB_id 1AQT). **B)** Estructura a partir de NMR de la subunidad ζ en solución de *Paracoccus denitrificans* (PDB_id 2LLO) y **C)** Estructura de rayos X de la proteína inhibidora IF_1 de *Bos taurus* (PDB_id 1HF9). En todas las estructuras, el segmento rojo muestra los dominios inhibitorios, los cuales corresponden a 2 hélices del C-terminal de $E\epsilon$ (**A**), la región móvil N-terminal de $Pd\text{-}\zeta$ (**B**), y el N-terminal de la IF_1 de la F_1 -ATPasa mitocondrial (**C**).

III. Conservación del mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ

De acuerdo con la teoría endosimbiótica (132) y con análisis filogenéticos (133, 134), *P. denitrificans* y otras α -proteobacterias están emparentadas con el endosimbionte que dio origen a la mitocondria, lo cual sugirió que la subunidad ζ podría ser el predecesor evolutivo de la IF₁ mitocondrial. Aún cuando nuestro análisis filogenético mostró que no existe una relación evidente entre la secuencia de la subunidad ζ y la de inhibidor mitocondrial, cabe señalar que el dominio inhibitorio de ζ se puede alinear con el dominio inhibitorio de la IF₁ mitocondrial (120), lo cual podría indicar una relación evolutiva entre ambas proteínas o ser el resultado de convergencia funcional. Sin embargo, dado que la subunidad ζ se encuentra conservada exclusivamente en la clase de las alfa proteobacterias (**Fig. 14A**), creemos que esta subunidad no es el ancestro evolutivo del regulador mitocondrial, sino una proteína completamente nueva, con un mecanismo inhibitorio único específico del grupo de las α -proteobacterias. Otras evidencias previas reforzando esta hipótesis son que la estructura de Pd ζ (**PDB id: 2LL0**) es casi idéntica a la reportada para *Jannaschia sp.* (**PDB id: 2KZC**) y que su presencia como subunidad integral de la ATPasa está conservada en *Rhodobacter sphaeroides* (1).

Asimismo, la comparación entre las secuencias de subunidades ζ de diversos orígenes señaló que la porción amino inhibitoria presenta el mayor grado de conservación de la subunidad (**Fig. 14B**), evidenciado que éstas podrían ejercer un papel inhibitorio dentro de las ATPasa de sus organismos. Con esta premisa realizamos la purificación de la subunidad ζ recombinante de *Jannaschia sp.*, encontrando que ésta funciona como un fuerte inhibidor heterólogo de la PdF₁-ATPasa, exhibiendo valores similares de IC₅₀ a los reportados para Pd ζ , confirmando la conservación de la función inhibitoria en una α -proteobacteria distinta.

IV. Regulación de la capacidad inhibitoria de la subunidad Pd ζ

El análisis detallado de la estructura primaria de la subunidad Pd ζ ha mostrado que las secuencias regulatorias de la función inhibitoria mitocondrial y bacteriana no están presentes en ella, ya que ésta no contiene el par de histidinas regulatorias de la IF₁ que favorece la inhibición de la ATPasa a pH < 7, ni el motivo de unión a ATP de la subunidad ϵ (I(L)DXXRA) (52) que controla su transición conformacional inhibitoria / no inhibitoria (49, 54). Consecuentemente, Pd ζ presenta un pH de inhibición óptimo diferente al de la IF₁, que ronda alrededor de pH= 8.0. Sin embargo, nuestro trabajo experimental demostró que Pd ζ es capaz de acoplar un nucleótido en su estructura mediante un motivo de unión desconocido, el cual exhibe una K_d de 11 mM (**Fig. 24**) que se encuentra en el intervalo de las afinidades descritas para las ϵ bacterianas (*E. coli* K_d $\approx$ 22 mM (52) y *Bacillus sp.* PS3 K_d=200 μ M (51) y modula la capacidad inhibitoria de la subunidad reconstituida en PdF₁ (**Fig. 25**).

Hasta el momento, la relevancia fisiológica de este sitio de unión no ha sido esclarecida, sin embargo, antecedentes funcionales han señalado los efectos regulatorios que el ATP y ADP tienen sobre la ATP sintasa de *P. denitrificans*, pues han mostrado que la actividad continua de PdF₁F₀-ATPasa de partículas sub-bacterianas requiere de ADP en el medio (135, 136), mientras que su actividad sintética es inhibida por ATP (111, 137). Además, han señalado la existencia de un cambio conformacional de la subunidad ζ en presencia de ADP (**PDB id: 2MDZ**). En conjunto, estos resultados han incrementado la importancia del sitio de nucleótido y promueven una mayor investigación al respecto.

En resumen, nuestra investigación ha brindado información importante sobre un nuevo mecanismo regulatorio del nanomotor F₁F₀-ATPasa específico de la clase α -

proteobacteria, cuya resolución no solo es importante para comprender la regulación de la ATP sintasa de *P. denitrificans* y las características que le permiten sintetizar a gran velocidad e hidrolizar lentamente, sino también para entender la evolución de los mecanismos regulatorios de las ATP sintasas en general. Hasta el momento hemos podido describir algunas características de este sistema, sin embargo mayor información a nivel atómico y molecular es necesaria para su completa comprensión.

Conclusiones

- ✓ La subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* es un inhibidor fuerte de la actividad de ATPasa y funciona de forma independiente a la subunidad $Pd\epsilon$.
- ✓ El mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ implica la interferencia con el giro del cuello central, de forma reminiscente al mecanismo de la subunidad ϵ bacteriana y la IF_1 mitocondrial, pero con una estructura terciaria completamente diferente.
- ✓ La capacidad inhibitoria de la subunidad ζ se ha preservado en la α -proteobacteria *Jannaschia sp.*, sugiriendo que ζ funciona como el inhibidor natural de las F_1F_0 -ATPasas en la familia de las α -proteobacterias.
- ✓ Los 14 residuos presentes en el N-terminal de la primera hélice de la subunidad ζ fueron identificados como parte del dominio inhibitorio de la subunidad.
- ✓ La subunidad ζ aparenta ser un sensor a la concentración de ATP, de igual forma que la subunidad ϵ bacteriana.

Materiales y Métodos

I. Determinación de proteína por el método de Lowry

La concentración de proteína se midió por el método de Lowry (138) y cuando era necesario eliminar interferencias se realizó el método de Lowry modificado por precipitación con TCA (139). Se cuantificó la absorbancia de la curva estándar y de las muestras a una longitud de onda de 660 nm y se Interpolaron los valores de absorbancia de las muestras (determinadas por duplicado o triplicado) con respecto a los de la curva para obtener su concentración.

II. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

i. Schagger, H. y Von Jagow G. (140)

Este tipo de electroforesis es muy eficiente en la resolución de proteínas de bajo peso molecular, ya que la subunidad ζ tiene un peso aproximado de 11.6 KDa y las mutantes utilizadas durante el proyecto se diferencian entre ellas por 1 o 2 KDa, decidimos que ésta técnica nos brindaría certidumbre en la definición de estas proteínas.

Estas electroforesis se realizaron en cámaras mini-Protean Tetra cell de Biorad, usando el amortiguador de corrida para cátodo (Tris 0.1 M, tricina 0.1 M y SDS 0.1 % pH 8.25) y amortiguador de ánodo (Tris-HCl 0.2 M pH 8.93); los geles se corrieron a 100V hasta que el frente de corrida alcanzó la porción separadora y posteriormente se aumento a 120 V durante aproximadamente 1.5 h.

ii. Laemmli, U. K. (119) no reductora

Este tipo de electroforesis se utilizó como primera dimensión para resolver los productos de entrecruzamiento de la PdF₁, dado que usamos un gradiente lineal de la concentración de acrilamida en el gel separador pudimos resolver con una mayor resolución el intervalo completo de pesos moleculares para lo cual se realizó en un gradiente lineal del 12 al 22 % de acrilamida/bis de acuerdo a nuestros propios antecedentes (83).

**iii. Electroforesis en 2 dimensiones (no reductora -- reductora)
(73)**

Esta técnica permitió la identificación de las subunidades que conforman los entrecruzamientos. El protocolo se basa en la electroforesis de una muestra entrecruzada, de manera reversible, en una primera dimensión no reductora la cual mantiene la integridad de los productos entrecruzados permitiendo que éstos migren únicamente de acuerdo a su peso molecular; seguida de una segunda dimensión en condiciones reductoras la cual separa a las subunidades que componen los aductos y les permite migrar libres.

Como se ha explicado en la sección anterior, la primera dimensión de la electroforesis en dos dimensiones se desarrolló de acuerdo al protocolo de Laemmli (119), utilizando 1mg de PdF₁ entrecruzada incubada a 33°C durante 10 min en amortiguador de muestra Laemmli libre de agentes reductores; posteriormente, el carril resultante fue cortado del gel e incubado durante 0.5 h en amortiguador de gel Von Jagow tris 1M, SDS 0.1% pH 8.45, 10 mM DTT y 5% β-mercaptoetanol, con el fin de reducir los enlaces disulfuro formados entre las subunidades entrecruzadas. Inmediatamente

después, el carril fue lavado 3 veces por 10 min con tris 1 M y SDS 0.1 % pH 8.45 para eliminar los residuos de DTT y β -mercaptoetanol y fue colocado en la parte superior de un gel Von Jagow de 16% de acrilamida. Una vez que la electroforesis fue concluida, el gel se tiñó con azul de Coomassie o plata de acuerdo a protocolos establecidos (83).

III. Ensayo de hidrólisis de ATP

i. Liberación de fosfatos (141)

Este protocolo fue utilizado para determinar la actividad de hidrólisis de la porción F₁ de la ATP sintasa de *P. denitrificans* y se basa en la formación de fosfomolibdato generado a partir del fosfato libre proveniente de la hidrólisis del ATP. El compuesto reducido exhibe un color azul característico, el cual puede ser cuantificado a una longitud de onda de 660 nm.

Las muestras a cuantificar correspondieron a PdF₁ a una concentración de 0.1 μ g/ μ l reconstituidas como se explicará posteriormente. La actividad de hidrólisis fue iniciada mediante la adición del sustrato, 10 mM de MgATP pH 7.4 y se incubó durante 1 min a 37° C. La actividad fue detenida mediante la precipitación de la proteína añadiendo 6 % de ácido tricloroacético e incubando durante 10 min en hielo; con el fin de separar el fosfato libre de la proteína precipitada se realizó una centrifugación de las muestras durante 15 min a 11000 x g. El sobrenadante fue añadido a 2.6 ml de agua milli-Q y se mantuvo a temperatura ambiente para su tratamiento subsecuente.

Por otra parte, la curva patrón se realizó añadiendo 0, 100, 250, 500 y 750 nmoles de ácido fosfórico en 2.52 ml de agua milli-Q a la cual se le añadió 2 % de TCA .

Posteriormente, tanto a las muestras problema como a la curva patrón se les añadieron 500 μ l de una solución de molibdato de amonio 3.3 % en ácido sulfúrico 3.75 N y se incubaron durante 10 min. Después se adicionaron 200 μ l de una solución

10 % de FeSO_4 en 1:50 de ácido sulfúrico y se incubaron durante 30 min. Finalmente todas las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro usando celdas de plástico a una longitud de onda de 660 nm.

El cálculo de número de moles de Pi se realizó mediante la interpolación de los valores de absorbancia de las muestras con respecto a la curva patrón y la actividad fue reportada como $\mu\text{molas} / \text{min} \times \text{mg}$ de proteína

ii. Espectrofotométrico (142)

La actividad hidrolítica de las muestras de PdF_1 también fue cuantificada mediante una técnica espectrofotométrica, la cual se basa en la determinación indirecta de la velocidad de hidrólisis del ATP mediante su acoplamiento a la oxidación del NADH; lo que se logra acoplando la reacción de la ATPasa con la de las enzimas piruvato cinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH); La mezcla de reacción debe contener ATP, fosfoenolpiruvato (PEP) y NADH; de esta forma cada ADP generado por la actividad hidrolítica de la ATP sintasa es regenerado a ATP por la actividad de la piruvato cinasa, y el piruvato producido es transformado a lactato con la subsecuente oxidación de un NADH.

Dado que la actividad hidrolítica de la PdF_1 es muy baja, decidimos utilizar al sulfito, ya que se ha descrito que éste es un oxianión activador (143); sin embargo al realizar curvas de la actividad de las enzimas acoplantes a distintas concentraciones de sulfito observamos que éste tiene efectos inhibitorios sobre su actividad, por lo tanto determinamos que agregando un exceso de 3 veces la cantidad de piruvato cinasa, 5 de lactato deshidrogenasa y un máximo de 2 mM de sulfito nos permitió mantener acoplado al sistema, obteniendo una activación sustancial de la actividad hidrolítica.

La mezcla de reacción utilizada fue sacarosa 250 mM, Tris-acetato 50 mM, cloruro de magnesio 3 mM, acetato de potasio 30 mM, NADH 200 μ M, piruvato cinasa 0.03 μ g/ μ l (12 U/ml), lactato deshidrogenasa 0.05 μ g/ μ l (20 U/ml), fosfoenolpiruvato 1.5 mM y ATP 3 mM. La detección a 340 nm se realizó en el espectro usando celdas de plástico.

El experimento de competencia de los inhibidores truncos ($Pd\zeta^{\Delta NT}$ y $Js\zeta^{\Delta NT}$) contra los inhibidores completos ($Pd\zeta^{WT}$ y $Js\zeta^{WT}$), se realizó pre-incubando 10 μ g de PdF_1 con 20 μ g de $\zeta^{\Delta NT}$ durante 0.5 h en sacarosa 250 mM, tris 20mM pH 8 y sulfito 60 mM; posteriormente se añadieron 10 μ g de ζ^{WT} y después de un minuto la cuantificación de hidrólisis fue iniciada agregando la enzima a una celda con 1ml de mezcla de reacción con 0.15 % de LDAO a 37° C. Para este experimento se utilizaron como controles la actividad de la PdF_1 inhibida, para la cual 10 μ g de PdF_1 se pre-incubaron durante un minuto con 10 μ g de ζ^{WT} en presencia de 60 mM sulfito antes de iniciar la reacción de actividad. Para evaluar la actividad basal de la PdF_1 se usaron 10 μ g de PdF_1 con 60 mM de sulfito los cuales se añadieron directamente a la celda de reacción.

Por su parte, el efecto del ATP sobre la capacidad inhibitoria de la subunidad $Pd\zeta^{WT}$ se ensayó realizando la reconstitución de cantidades crecientes de $Pd\zeta^{WT}$ en la PdF_1 (relaciones molares $PdF_1 : Pd\zeta^{WT}$ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:36) a tres diferentes concentraciones de ATP que fueron 1 mM , 10 mM y 25 mM; estas reconstituciones se realizaron en amortiguador 250 mM sacarosa, 20 mM tris pH 8.0, en presencia de sulfito 60 mM durante media hora a temperatura ambiente, posteriormente se cuantificó su actividad hidrolítica añadiendo cada muestra a 1ml de mezcla de reacción con una concentración de ATP equivalente a la usada en la reconstitución. Para este experimento la concentración de Mg^{2+} en la mezcla de reacción se mantuvo equimolar a la concentración de ATP y la concentración de PEP se incrementó a 4 mM.

IV. Obtención de anticuerpo policlonal anti-Pdε

Para producir los anticuerpos de suero de conejo, se utilizó una conejo hembra de 8 semanas de edad la cual fue sangrada para colectar el suero pre-inmune.

Posteriormente se llevó a cabo un esquema de inmunización que comprendió 4 inoculaciones cada 3 semanas, en la primera inoculación se inyectaron 100 µg de subunidad Pdε pura en 500 µl de PBS estéril con 500 µl de adyuvante completo de Freud. Las inoculaciones posteriores se realizaron con 150µg de subunidad pura, remplazando el adyuvante completo por adyuvante incompleto. Al finalizar el periodo de inmunización el conejo fue sangrado; la sangre obtenida fue separada mediante la centrifugación a 1500 rpm durante 20 min y una segunda centrifugación del sobrenadante a 6000 rpm durante 15 min. El suero obtenido fue alicuotado y congelado a -70° C.

V. Técnica de Western Blot

Las proteínas fueron transferidas utilizando la cámara húmeda (Mini-TransBlot Cell y TransBlot Cell de Bio-Rad) a membrana de PVDF de 0.2 µm (immobilon P-SQ de Millipore) usando un amortiguador de CAPS 10 mM con 10 % de metanol pH 11.0. Los geles desnaturalizantes fueron equilibrados en el amortiguador de CAPS 10 min previos a su transferencia, mientras que la membrana fue hidratada durante 10 min con metanol absoluto y posteriormente equilibrada en el amortiguador utilizado. La transferencia se llevó a cabo utilizando un amperaje constante de 100 mA durante 2 h a 4°C (1.6 mA por cm²).

Posteriormente, la membrana fue bloqueada con una solución 5 % de leche descremada en PBS-T (amortiguador salino con 0.1 % de Tween-20) durante 2 h con

agitación constante a temperatura ambiente; después, se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti- β de *E. coli*, anti-Pd ϵ o anti Pd ζ a una dilución de 1: 25000, 1:30000 y 1:30000 respectivamente, en 5 % de leche en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con 20 ml de PBS-T en agitación constante y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón para β o anti-conejo para ϵ y ζ a una dilución de 1:35000 y 1:20000 respectivamente en leche-PBS-T. Finalmente, se realizaron 2 lavados con PBS-T y uno con PBS. El revelado se realizó mediante detección de quimioluminiscencia con el sistema ECL-plus en placas fotográficas (Biomax-Light Film, KODAK).

VI. Acoplamiento del anticuerpo anti anti-Pd ϵ y anti-Pd ζ a esferas de agarosa proteína G

Se utilizaron esferas de agarosa acopladas a proteína G recombinante (Invitrogen), las esferas se lavaron 3 veces con PBS para eliminar la solución conservadora (etanol 60 %) centrifugando a 3000 rpm durante 5 min.

Los anticuerpos policlonales anti Pd ζ o anti Pd ϵ fueron acoplados covalentemente a las esferas de proteína-G agarosa como se ha descrito anteriormente y se comprobó el acoplamiento de los anticuerpos por electroforesis desnaturizante (144). Las esferas fueron lavadas con PBS para su utilización y reutilización posterior, y conservadas a 4° C en presencia de azida de sodio como preservativo.

VII. Amplificación, clonación y sobre-expresión de la subunidad Pd ζ ^{Δ NT}, Js ζ ^{WT} y Js ζ ^{Δ NT}

La construcción de la subunidad Pd ζ con la ablación de los primeros 14 aminoácidos del amino terminal, nombrada Pd ζ ^{Δ NT}, se realizó mediante la amplificación del gen por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como templado el plásmido

pIPPD1 (1) y los oligonucleótidos ZetaDeltaNTFWD 5' - TATATTGAATTCATGTTGCGCCATGATGCGG - 3' y PdzCTerm 5'- TATACTAAGCTTTCAGATCTCGCTGATGATCTG - 3' flanqueados con los sitios de restricción para EcoR1 y HindIII respectivamente; el producto de PCR, con un tamaño esperado de 300 pares de bases, fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa al 1% y purificado a partir del gel mediante el sistema comercial (QIAquick de la marca QIAgen); el fragmento puro fue ligado al plásmido PT7-7 y transformado en células DH5- α . La construcción (pDNTPDZ1) fue verificada mediante análisis de restricción y secuenciación directa, confirmando la secuencia completa y la ausencia de mutaciones. Con el plásmido puro, aislado de las células DH5- α usando el sistema comercial (SV minipreps de Promega), se transformaron células *E. coli cepa* BL21 codón plus y se realizaron pruebas de sobreexpresión a distintas temperaturas, tiempos de crecimiento y concentración de inductor.

Los plásmidos pSpeedET con las construcciones $Js\zeta^{WT}$ y $Js\zeta^{\Delta NT}$ nos fueron donados amablemente por el Profesor Kurt Wüthrich del Scripps Research Institute, CA, USA. Ambas construcciones contenían una cadena de 6 histidinas en el amino terminal y un sitio de reconocimiento a la proteasa TEV entre las histidinas y la metionina inicial. La construcción $Js\zeta^{WT}$ contiene la secuencia completa de la proteína, mientras que la construcción $Js\zeta^{\Delta NT}$ tiene una ablación de 19 residuos de su N-terminal y 5 residuos de su C-terminal. Usando los plásmidos se transformaron células *E. coli cepa* BL21-codon plus y se seleccionaron mediante la resistencia a kanamicina (50 μ g/ml) que éstos les confieren; con las células transformadas se realizaron pruebas de sobreexpresión y cultivos concentrados que se congelaron para su subsecuente utilización.

VIII. Purificación de la porción F1 de *Paracoccus denitrificans* a partir de membranas

i. Preparación de membranas invertidas (PSB) de *P. denitrificans*

Las células de *P. denitrificans* cultivadas aeróbicamente en presencia de succinato como se ha descrito con anterioridad (123) fueron resuspendidas en 2.4 L de amortiguador con sacarosa 0.5 M, Tris 10 mM pH 7.5 complementado con 5 mM de EDTA, inmediatamente se añadieron 0.33 µg/ml de lisozima; la mezcla se incubó durante 3 h a 37°C con agitación suave. La incubación con lisozima permite la disgregación de la pared celular y por tanto la obtención de protoplastos, los cuales fueron separados del resto mediante su centrifugación a 10000 rpms durante 15 min (rotor SLA-1500). La pastilla de protoplastos fue posteriormente lisada mediante choque osmótico, resuspendiéndola en 90ml de amortiguador tris-acetato 0.1 M y ATP 10 mM pH 7.5 y diluyéndola hasta 900ml con benzamidina 5 mM y PMSF 1 mM.

Con el fin de eliminar los ácidos nucleicos se añadieron 5 mM de MgCl₂ y 5 mg de DNasa I y se incubó durante 20 min a 30°C, la fase membranal fue separada del resto centrifugando durante una h a 13000 rpms (rotor SS-34); la pastilla roja resultante (rica en citocromos) fue resuspendida en el volumen mínimo posible de amortiguador A⁺ (glicerol 10 %, sacarosa 50 mM, Tris- HCl 20 mM, EDTA 1 mM, ATP 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 5 mM y 4 tabletas de mezcla de inhibidores de proteasas y guardada a -70° C hasta su utilización.

ii. Purificación de la Pdf1 mediante cromatografía.

Las membranas invertidas de *P. denitrificans* fueron diluidas hasta una concentración de 10mg/ml de proteína en el amortiguador A⁺, posteriormente se añadió una cantidad de cloroformo igual a la mitad del volumen total de las membranas y se agitó vigorosamente durante 2 min. La mezcla fue centrifugada durante 15 min a 15000 rpms a 15° C en el rotor SS-34 de Sorvall, posteriormente la fracción hidrosoluble fue colectada y centrifugada nuevamente 45000 rpms durante 1 h en el rotor 60Ti. El sobrenadante fue cargado a una columna de intercambio aniónico

HiTrap Q HP (Q sefarosa) de 1 ml marca GE, equilibrada con amortiguador A⁺; la columna fue lavada con el amortiguador mencionado hasta obtener una línea base libre de proteína y la elución se realizó utilizando un gradiente discontinuo de fosfato de potasio de 0 a 100 mM, 100 a 120 mM, 120 a 250 mM , 250 a 500 mM y de 500 a 1 M. La porción enriquecida en PdF₁ se eluyó principalmente en el paso de 120 a 250 mM de sal y su presencia se confirmó midiendo su actividad hidrolítica mediante el ensayo espectrofotométrico. Las fracciones con mayor actividad se concentraron hasta el mínimo volumen posible utilizando centricon de poro de 10KDa. La proteína concentrada se guardó a -70°C adicionándole 10 % de glicerol y 2X de inhibidores de proteasa (complete EDTA free de Roche).

La muestra concentrada se cargó en la columna de exclusión molecular Superdex 200 equilibrada en amortiguador A⁺ sin sal y se eluyó a un flujo de 0.5ml/min, registrando su absorbancia a 280nm; la composición de las fracciones se analizó mediante su patrón de corrimiento en geles Von Jagow y aquellas fracciones ricas en PdF₁ se concentraron en un centricon de poro de 10KDa. El concentrado se cargó en la columna de afinidad DEAH(145) (Diethyl amino-hexil) y se eluyó mediante un gradiente discontinuo de fosfato de potasio de 0-100 mM y 100 – 300 mM. La pureza de las fracciones se analizó mediante geles y la determinación de su actividad hidrolítica. Las fracciones con PdF₁ pura fueron concentradas y guardadas a -70° C hasta su uso.

IX. Purificación del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$

El complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ se purificó a partir de la porción PdF₁ pura utilizando una columna de inmutioafinidad para remover las subunidad ϵ y ζ endógenas. La PdF₁ previamente incubada durante 15 min a temperatura ambiente en amortiguador A (sacarosa 250 mM, Tris 10 mM, Glicerol 10 %, EDTA 1 mM, PAB 2.5 mM, ATP 0.2 mM pH7.0) y sulfito de sodio 30 mM se cargó a una columna de 5 ml de agarosa proteína G acoplada a anticuerpo anti Pd ϵ y Pd ζ ; posteriormente se realizó un lavado con 2 volúmenes de

columna del mismo amortiguador y éste se fraccionó cada medio mililitro; la composición de las fracciones fue analizada mediante geles Von Jagow, y de acuerdo a su pureza se seleccionaron y concentraron en centricon de 100 KDa de corte. Por su parte las subunidades ϵ y ζ retenidas en la columna se eluyeron con 10 ml de amortiguador de glicina 0.1 M pH 2.0 y la columna se regeneró lavando con 2 volúmenes de columna de glicina 0.1 M pH 7.0 y 2 volúmenes de columna de PBS. Finalmente la columna fue almacenada a 4° C en amortiguador PBS adicionado con 5 mM de azida de sodio.

X. Purificación de las subunidades $Pd\zeta^{WT}$ y $Pd\zeta^{ANT}$.

Una asada de cultivo concentrado se sembró en 5ml de medio LB adicionado con ampicilina (150 μ g/ml) y se incubó durante 12 h a 37°C con agitación constante de 160 rpms, transcurrido este tiempo el cultivo se transfirió a 1 L de medio 2XYT (para $Pd\zeta^{WT}$) o medio Terrific Broth (Para $Pd\zeta^{ANT}$) con 150 μ g/ml de ampicilina y se incubó a 37° C hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 600 nm, inmediatamente después se añadió 0.4 mM de IPTG y se mantuvo a 37° C durante 3 horas más. La pastilla celular fue obtenida centrifugando a 10000 rpms en el rotor SLA-1500, durante 15 min a 4°C y se congeló a -70° C durante toda la noche.

El paquete celular fue descongelado, resuspendido en amortiguador B (20 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 0.001 % PMSF pH 7.0) y sonicado 10 veces durante 10 s, en un baño de agua hielo, con descansos de 1.5 min entre cada sonicación; posteriormente se agregó 10 mM $MgCl_2$ y 5 mg DNasa I y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla se centrifugó a 14000 rpms en el rotor SS-34, durante 15 min y el sobrenadante fue recuperado; a éste se le adicionó 10 mM de EDTA y se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 50 % a 4° C durante 20 min, posteriormente se centrifugó a 14000 rpms durante 10 min (rotor SS-34) y el sobrenadante se precipitó

nuevamente con sulfato de amonio 30 % para alcanzar una concentración final de 80 %. La mezcla fue centrifugada a 14000 rpms durante 10 min (rotor SS-34) y la pastilla de proteína fue resuspendida en amortiguador B.

La proteína fue desalada usando un centricon de poro de 3 KDa y se cargó a la columna de intercambio aniónico (DEAE Sefarosa CL-6B de Pharmacia); se eluyó con un gradiente de 20 – 300 mM de KH_2PO_4 y la composición de las fracciones fue analizada mediante geles Von Jagow, escogiendo las de mayor pureza y concentrándolas. Las fracciones concentradas entraron a la columna de exclusión molecular (Superdex 75 de GE) y las fracciones resultantes fueron analizadas electroforéticamente; aquellas con la mayor pureza fueron concentradas y guardadas a -20°C hasta su uso.

XI. Purificación de la subunidad ϵ^{WT} de *Paracoccus denitrificans*

Una asada de cultivo concentrado se sembró en 5 ml de medio LB con ampicilina y se incubó durante 12 h a 37°C con agitación de 160 rpms, el cultivo final se transfirió a 1 L de medio 2XYT con ampicilina y se incubó a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 600 nm, inmediatamente se añadió 0.4 mM de IPTG y se mantuvo a 37°C durante 3 h. La pastilla celular obtenida de la centrifugación a 10000 rpms (rotor SLA-1500), durante 15 min a 4°C , fue lavada con amortiguador de tris-sal y guardada a -70°C para facilitar su lisis.

El paquete celular resuspendido en amortiguador B, fue sonificado 10 veces durante 10 s, en un baño de agua hielo, con descansos de 1.5 min entre cada sonicación; posteriormente se le agregó 10 mM MgCl_2 y 5 mg DNasa I y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 14000 rpms durante 15 min (Rotor SS-34) y el sobrenadante fue recuperado; a éste se le adicionó 10 mM de EDTA y se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 15 % a 4°C durante 20 min;

posteriormente se centrifugó a 14000 rpms por 10 min (Rotor SS-34) y el sobrenadante se precipitó nuevamente con sulfato de amonio 25% para alcanzar una concentración de 40%. La mezcla fue centrifugada nuevamente a 14'000 rpms durante 10min (Rotor SS-34) y la pastilla de proteína fue resuspendida en amortiguador B.

La proteína fue desalada mediante diálisis contra amortiguador B, usando una membrana con corte de 3.5 KDa, durante toda la noche. La muestra se cargó a la columna de intercambio aniónico (DEAE Sefarosa CL-6B de Pharmacia) y se eluyó con un gradiente de 20 – 700 mM de KH_2PO_4 . La composición de las fracciones fue analizada mediante geles Von Jagow, escogiendo las de mayor pureza y concentrándolas en centricon de 10 KDa. Las fracciones concentradas entraron a la columna de exclusión molecular (Superdex 75 de GE) y las fracciones con subunidad ϵ pura fueron concentradas y guardadas a -70°C hasta su uso.

XII. Purificación de las subunidades $\text{Pde}^{\Delta\text{CT}}$, $\text{Js}\zeta^{\text{WT}}$ y $\text{Js}\zeta^{\Delta\text{NT}}$

Tubos de 5 ml de medio LB con ampicilina (para $\text{Pde}^{\Delta\text{CT}}$) o kanamicina (para $\text{Js}\zeta^{\text{WT}}$ y $\text{Js}\zeta^{\Delta\text{NT}}$), fueron inoculados con las diferentes cepas e incubados durante 12 h a 37°C con agitación constante; transcurrido el tiempo fueron trasladados a 1 L de medio Terrific Broth con el antibiótico correspondiente e incubados hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 600 nm, en ese momento se les añadió 0.4 mM de IPTG y se incubaron durante 3 h a 37°C , finalizado este periodo se centrifugaron a 10000 rpms durante 15 minutos (Rotor SLA-1500) y la pastilla celular fue lavada con amortiguador tris-sal.

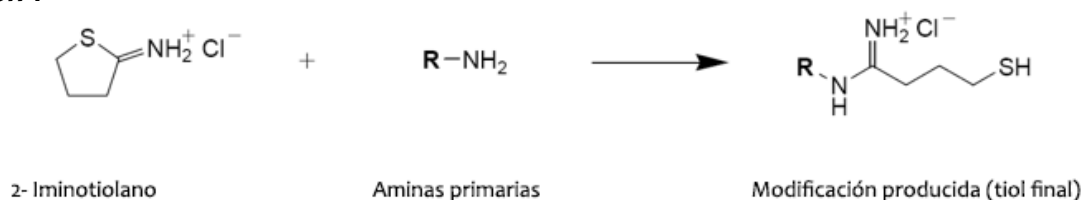
Las células fueron resuspendidas en el amortiguador C (10 mM imidazol, fosfato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 300 mM pH 8) y sonicadas, posteriormente fueron

centrifugadas a 45000 rpms en el rotor 60Ti, la muestra resultante entró a la columna de níquel (HisTrap HP Sefarosa de GE) y se eluyó con un gradiente de 20 a 500 mM de imidazol, las fracciones se analizaron electroforéticamente y se concentraron. La subunidades recombinantes puras se cambiaron a amortiguador de corte (Tris 50 mM, EDTA 0.5 mM, DTT 2 mM pH 8.0) y se incubaron durante 18 h a 30°C con la proteasa del virus de tabaco (TEV) a una relación (1:20); transcurrido el tiempo se cambiaron a amortiguador C y se cargaron de nuevo a la columna de níquel donde se colectó un lavado con 20 mM de imidazol en fracciones de 1 ml, las fracciones se escogieron de acuerdo a su pureza mediante geles Von Jagow, se concentraron y se almacenaron a -70° C hasta su uso.

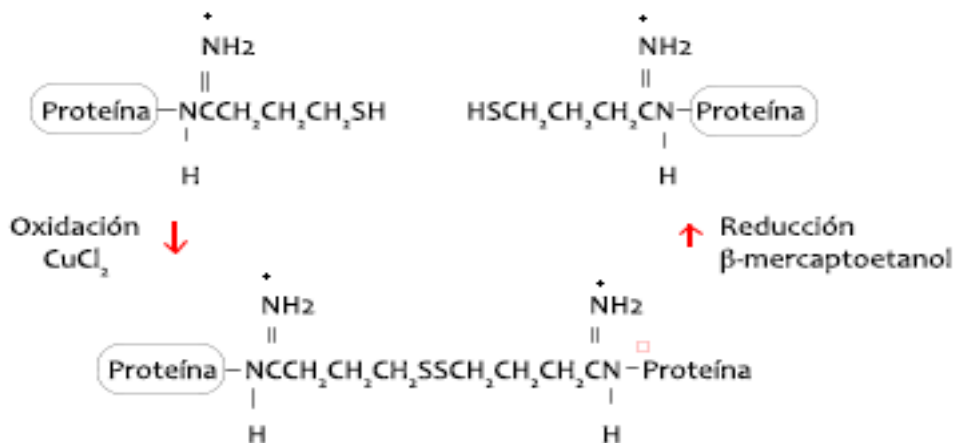
XIII. Entrecruzamiento químico de la PdF₁

La porción PdF₁ fue entrecruzada utilizando el reactivo 2-iminotiolano (2-IT) de Sigma, el cual es un compuesto tiolante que reacciona con las aminas primarias presentes en los residuos de lisina y en el aminoácido 1 del amino terminal, generando un grupo amidina seguido de una cadena alifática que finaliza con un grupo sulfhidrilo (**Reacción 1**). Una vez añadidos los grupos tioles éstos pueden ser oxidados mediante la adición de H₂O₂ o CuCl₂, generando un puente disulfuro con un sulfhidrilo próximo, dando lugar a la formación de entrecruzamientos con una distancia de 14 Å, reversibles por agentes reductores como el DTT y el β-mercaptoetanol (**Reacción 2**).

Reacción 1



Reacción 2



El entrecruzamiento de la PdF_1 se realizó incubando a la enzima a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con 1 mM de 2-IT en un amortiguador con fosfato de potasio 20 mM, EDTA 1 mM y 10 % glicerol pH 8.0 durante 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual la reacción de tiolación se detuvo mediante la filtración de la PdF_1 tiolada en columnas de “Penefsky” (Sephadex G-50 fine) equilibradas con fosfato de potasio 20 mM y glicerol 10 % pH 8.0. El entrecruzamiento de los tioles vecinos, se efectuó agregando a la muestra 120 μM de CuCl_2 e incubándola 30 min a temperatura ambiente. Para finalizar la oxidación, el Cu^{2+} fue quelado añadiendo 10 mM de EDTA y 25X de inhibidores de proteasas (Complete Protease Cocktail EDTA-free de Roche) para garantizar la integridad de las subunidades. Finalmente, la muestra fue concentrada hasta el mínimo volumen posible utilizando los filtros centricon de Millipore con un poro de 10 KDa, incubada a 37° C durante 5 min y cargada a en geles-SDS no reductores.

XIV. Calorimetría de titulación isotérmica

La subunidad $Pd\zeta$ pura fue pre-equilibrada a 25° C a una concentración de 60 mg/ml en amortiguador de reconstitución (Sacarosa 250 mM, tris 20 mM y glicerol 5 % pH 8.0) en el calorímetro MicroCal modelo iTC200. Una vez que el sistema se estabilizó, la celda calorimétrica se tituló automáticamente con 25 inyecciones de una solución de ATP 82.14 mM. El calor de los picos fue integrado manualmente para evitar cualquier error en la detección automática de los picos. El calor de dilución generado por la adición de ATP fue calculado en un experimento paralelo en el cual se realizó el mismo patrón de inyecciones de ATP sobre una celda que solo contenía el amortiguador de reconstitución. Se realizó la sustracción del calor de dilución al calor experimental, el calor resultante o calor de unión del ATP fue ajustado a un modelo no lineal de sitio único mediante el software Origin 7.5 obteniendo de esta forma los parámetros termodinámicos de la unión.

XV. Proteólisis limitada de la PdF_1

Cuarenta microgramos de PdF_1 en amortiguador sacarosa-Tris pH 8.0 (a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fueron incubados a temperatura ambiente, en presencia o ausencia de sulfito 60 mM, con tripsina en una relación molar 1 : 20 (tripsina : PdF_1), durante 2, 5, 10 y 20 min, finalizado el tiempo de tripsinólisis, la proteasa fue detenida agregando 5 mM de PMSF. Finalmente 5 μg fueron utilizados para la determinación de su actividad hidrolítica mediante el método espectrofotométrico, 10 μg fueron utilizados para el ensayo de Western Blot con anticuerpos anti- β , anti- ϵ y anti- ζ ; y 15 μg corridos en un gel de poliacrilamida Von Jagow al 15 % para su detección mediante espectrometría de masas.

XVI. Reconstitución de $Pd\zeta$ y $Pd\epsilon$ en PdF_1 y $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$

Noventa y cinco microlitros de una solución 0.105 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PdF_1 o $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ en amortiguador de Sacarosa 250 mM, Tris 20 mM pH 8.0 fueron reconstituidos durante media hora a temperatura ambiente con 5 μl de distintas soluciones madre de $Pd\zeta$ y $Pd\epsilon$ para obtener la relación molar deseada, en presencia de 60 mM de sulfito de sodio. La concentración final molar de la PdF_1 o $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ fue de aproximadamente 0.26 μM y las concentraciones de $Pd\epsilon$ y $Pd\zeta$ variaron de 0 hasta 13.4 μM y 9 μM respectivamente.

XVII. Ensayos de competencia entre las mutantes de $Pd\zeta$

La actividad hidrolítica de 3 muestras de PdF_1 fue cuantificada mediante el método espectrofotométrico . **1)** Control: 10 μg PdF_1 sin subunidad ζ reconstituida, **2)** PdF_1 + $Pd\zeta^{\text{WT}}$: 10 μg de PdF_1 reconstituidos con 10 μg de $Pd\zeta^{\text{WT}}$ y **3)** PdF_1 + $Pd\zeta^{\text{WT}}$ + $Pd\zeta^{\Delta\text{NT}}$: 10 μg de PdF_1 pre-incubados durante 10 min con 10 μg de $Pd\zeta^{\text{WT}}$ y posteriormente reconstituidos con 20 μg de $Pd\zeta^{\Delta\text{NT}}$. Para todas las reconstituciones se utilizó amortiguador de reconstitución con 60 mM de sulfito de sodio. El volumen de reacción fue de 1 ml y la reacción fue iniciada agregando la ATPasa a la celda de reacción. La temperatura de reacción fue de 37° C en presencia de 0.15 % de LDAO y 0.75 mM de sulfito de sodio.

XVIII. Construcción del árbol filogenético de las subunidades ϵ

Cien secuencias de las subunidades ϵ (δ de mitocondria), obtenidas a partir de la base de datos de proteínas del NCBI, fueron alineadas mediante el servidor de alineamiento múltiples de secuencias ClustalW (146), posteriormente el alineamiento fue curado manualmente mediante el programa BioEdit 7.2 (147), para finalmente realizar un árbol filogenético de acuerdo al método de máxima verosimilitud con una prueba de bootstrap de 10000 repeticiones mediante el programa Molecular evolutionay genetic analysis MEGA 6.0 (148)

XIX. Ajuste de los gráficos de inhibición enzimática.

El ajuste de los patrones de inhibición se realizó mediante el programa Origin 7.5, de acuerdo a Halfman C.J. y Marcust F. (149) según un modelo de Hill modificado para el uso de altas concentraciones de proteína y de inhibidor, que se describe con la siguiente ecuación (**Ec. 2**)

(Ecuación 2)

$$1 - v / V_0 = \frac{([I] / k_{1/2})^a}{1 + ([I] / k_{1/2})^a}$$

Referencias

1. Morales-Ríos E, de la Rosa-Morales F, Mendoza-Hernández G, Rodríguez-Zavala J, Celis H, Zarco-Zavala M, et al. A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1FO ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB Journal* 2010;24(2):599-608.
2. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1966;41(3):445-502.
3. John EW. ATP Synthesis by Rotary Catalysis (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*. 1998;37.
4. Abrahams J, Leslie A, Lutter R, Walker J. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 1994;370(6491):621-8.
5. Boyer P. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*. 1997;66:717-49.
6. Ferguson S. ATP synthase: what dictates the size of a ring? *Current Biology : CB*. 2000;10(21):8.
7. Watt I, Montgomery M, Runswick M, Leslie A, Walker J. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(39):16823-7.
8. Stock D, Leslie A, Walker J. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*. 1999;286(5445):1700-5.
9. Jiang W, Hermolin J, Fillingame R. The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):4966-71.
10. Gibbons C, Montgomery M, Leslie A, Walker J. The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Structural Biology*. 2000;7(11):1055-61.
11. Fillingame R, Angevine C, Dmitriev O. Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *FEBS Letters*. 2003;555(1):29-34.
12. Walker J, Dickson V. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1757(5-6):286-96.
13. Jagendorf A, Uribe E. ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966;55(1):170-7.
14. Vik S, Antonio B. A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(48):30364-9.
15. Dmitriev O, Altendorf K, Fillingame R. Reconstitution of the Fo complex of *Escherichia coli* ATP synthase from isolated subunits. Varying the number of essential carboxylates by co-incorporation of wild-type and mutant subunit c after purification in organic solvent. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 1995;233(2):478-83.
16. Symersky J, Pagadala V, Osowski D, Krah A, Meier T, Faraldo-Gómez J, et al. Structure of the c(10) ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012;19(5):485.
17. Lightowlers R, Howitt S, Hatch L, Gibson F, Cox G. The proton pore in the *Escherichia coli* F0F1-ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the a-subunit. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1987;894(3):399-406.

18. Cain B, Simoni R. Proton translocation by the F₁F₀ATPase of *Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the a subunit. The Journal of Biological Chemistry. 1989;264(6):3292-300.
19. Angevine C, Herold K, Vincent O, Fillingame R. Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5. The Journal of Biological Chemistry. 2007;282(12):9001-7.
20. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. Nature. 1998;391(6666):510-3.
21. Okuno D, Iino R, Noji H. Rotation and structure of F_oF₁-ATP synthase. Journal of Biochemistry. 2011;149(6):655-64.
22. Dimroth P, von Ballmoos C, Meier T. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. EMBO Reports. 2006;7(3):276-82.
23. Fillingame R, Steed P. Half channels mediating H⁽⁺⁾ transport and the mechanism of gating in the F_o sector of *Escherichia coli* F₁F_o ATP synthase. Biochimica et Biophysica Acta. 2014.
24. Ishmukhametov R, Hornung T, Spetzler D, Frasch W. Direct observation of stepped proteolipid ring rotation in *E. coli* F₀F₁-ATP synthase. The EMBO Journal. 2010;29(23):3911-23.
25. Düser M, Zarrabi N, Cipriano D, Ernst S, Glick G, Dunn S, et al. 36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in F_oF₁-ATP synthase. The EMBO Journal. 2009;28(18):2689-96.
26. Tsunoda S, Aggeler R, Yoshida M, Capaldi R. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₁F_o ATP synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(3):898-902.
27. Sambongi Y, Iko Y, Tanabe M, Omote H, Iwamoto-Kihara A, Ueda I, et al. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. Science. 1999;286(5445):1722-4.
28. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. Nature. 1997;386(6622):299-302.
29. Noji H, Yoshida M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276(3):1665-8.
30. Kayalar C, Rosing J, Boyer P. An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions. The Journal of Biological Chemistry. 1977;252(8):2486-91.
31. Trejo J, Zavala M, Ríos E. Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F₁F_o ATP sintasa de las α - proteobacterias en *Paracoccus denitrificans* Mensaje Bioquímico. 2012;36.
32. Weber J. Structural biology: Toward the ATP synthase mechanism. Nature Chemical Biology. 2010;6(11):794-5.
33. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry, Fourth Edition. W H Freeman & Co. 2004.
34. Sternweis P, Smith J. Characterization of the inhibitory (epsilon) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. Biochemistry. 1980;19(3):526-31.
35. Feniouk B, Suzuki T, Yoshida M. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of F₀F₁-ATP synthase. Biochimica et Biophysica Acta. 2006;1757(5-6):326-38.
36. Rodgers A, Wilce M. Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. Nature Structural Biology. 2000;7(11):1051-4.

37. Kato-Yamada Y, Noji H, Yasuda R, Kinoshita K, Yoshida M. Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(31):19375-7.
38. Sternweis P. The epsilon subunit of *Escherichia coli* coupling factor 1 is required for its binding to the cytoplasmic membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(9):3123-8.
39. Yoshida M, Okamoto H, Sone N, Hirata H, Kagawa Y. Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(3):936-40.
40. Skakoon E, Dunn S. Orientation of the epsilon subunit in *Escherichia coli* ATP synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;302(1):279-84.
41. Wilkens S, Capaldi R. Solution structure of the epsilon subunit of the F1-ATPase from *Escherichia coli* and interactions of this subunit with beta subunits in the complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26645-51.
42. Uhlin U, Cox G, Guss J. Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure* 1997;5(9):1219-30.
43. Wilkens S, Dahlquist F, McIntosh L, Donaldson L, Capaldi R. Structural features of the epsilon subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy. *Nature Structural Biology*. 1995;2(11):961-7.
44. Kuki M, Noumi T, Maeda M, Amemura A, Futai M. Functional domains of epsilon subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (F0F1). *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(33):17437-42.
45. Aggeler R, Capaldi R. Nucleotide-dependent movement of the epsilon subunit between alpha and beta subunits in the *Escherichia coli* F1F0-type ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(23):13888-91.
46. Kato-Yamada Y, Yoshida M, Hisabori T. Movement of the helical domain of the epsilon subunit is required for the activation of thermophilic F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(46):35746-50.
47. 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(48):40130-4.
48. Saita E-i, Iino R, Suzuki T, Feniouk B, Kinoshita K, Yoshida M. Activation and stiffness of the inhibited states of F1-ATPase probed by single-molecule manipulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(15):11411-7.
49. Cingolani G, Duncan T. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011;18(6):701-7.
50. Suzuki T, Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk B, Yoshida M. Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F(o)F(1)-ATP Synthase by epsilon-subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(19):16807-13.
51. Kato-Yamada Y, Yoshida M. Isolated epsilon subunit of thermophilic F1-ATPase binds ATP. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(38):36013-6.
52. Yagi H, Kajiwarra N, Tanaka H, Tsukihara T, Kato-Yamada Y, Yoshida M, et al. Structures of the thermophilic F1-ATPase epsilon subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(27):11233-8.
53. Suzuki T, Murakami T, Iino R, Suzuki J, Ono S, Shirakihara Y, et al. F0F1-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(47):46840-6.

54. Kato S, Yoshida M, Kato-Yamada Y. Role of the epsilon subunit of thermophilic F₁-ATPase as a sensor for ATP. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(52):37618-23.
55. Kato-Yamada Y. Isolated epsilon subunit of *Bacillus subtilis* F₁-ATPase binds ATP. *FEBS Letters*. 2005;579(30):6875-8.
56. Hara K, Kato-Yamada Y, Kikuchi Y, Hisabori T, Yoshida M. The role of the betaDELSEED motif of F₁-ATPase: propagation of the inhibitory effect of the epsilon subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(26):23969-73.
57. Feniouk B, Yoshida M. Regulatory mechanisms of proton-translocating F₀F₁ (1)-ATP synthase. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2008;45:279-308.
58. Hisabori T, Konno H, Ichimura H, Strotmann H, Bald D. Molecular devices of chloroplast F₁-ATP synthase for the regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1555(1-3):140-6.
59. Nalin C, McCarty R. Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(11):7275-80.
60. Miki J, Maeda M, Mukohata Y, Futai M. The gamma-subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts. Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence. *FEBS Letters*. 1988;232(1):221-6.
61. Samra H, Gao F, He F, Hoang E, Chen Z, Gegenheimer P, et al. Structural analysis of the regulatory dithiol-containing domain of the chloroplast ATP synthase gamma subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(41):31041-9.
62. Richter M. Gamma-epsilon interactions regulate the chloroplast ATP synthase. *Photosynthesis Research*. 2004;79(3):319-29.
63. Richter M, Samra H, He F, Giessel A, Kuczera K. Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2005;37(6):467-73.
64. Richter M. Gamma-epsilon interactions regulate the chloroplast ATP synthase. *Photosynthesis Research*. 2004;79(3):319-29.
65. Bald D, Noji H, Yoshida M, Hirono-Hara Y, Hisabori T. Redox regulation of the rotation of F₁-ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(43):39505-7.
66. John DM, Peter Mitchell, Peter Schurmann. Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts: The role of the thioredoxin system. *FEBS Letters*. 1980;112(2):173-7.
67. Kramer DM, Crofts AR. Activation of the chloroplast ATPase measured by the electrochromic change in leaves of intact plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1989;976(1):28-41.
68. Pullman M, Monroy G. A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1963;238:3762-9.
69. Jackson P, Harris D. Binding of mitochondrial ATPase from ox heart to its naturally occurring inhibitor protein: localization by antibody binding. *Bioscience Reports*. 1983;3(10):921-6.
70. Beltrán C, Tuena de Gómez-Puyou M, Darszon A, Gómez-Puyou A. Simultaneous synthesis and hydrolysis of ATP regulated by the inhibitor protein in submitochondrial particles. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 1986;160(1):163-8.
71. Cabezón E, Runswick M, Leslie A, Walker J. The structure of bovine IF₁, the regulatory subunit of mitochondrial F₁-ATPase. *The EMBO Journal*. 2001;20(24):6990-6.
72. Power J, Cross R, Harris D. Interaction of F₁-ATPase, from ox heart mitochondria with its naturally occurring inhibitor protein. *Studies using radio-iodinated inhibitor protein*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983;724(1):128-41.

73. Minauro-Sanmiguel F, Bravo C, García J. Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2002;34(6):433-43.
74. Gledhill J, Montgomery M, Leslie A, Walker J. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(40):15671-6.
75. Green D, Grover G. The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1458(2-3):343-55.
76. Georges D, Gómez-Puyou A, Gómez-Puyou MTd. Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as detected by antibodies against the inhibitor protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1981;100.
77. Klaus S, Peter LP. Proton-adenosinetriphosphatase complex of rat liver mitochondria: effect of energy state on its interaction with the adenosine triphosphatase inhibitory peptide. *Biochemistry*. 1981;20.
78. Panchenko M, Vinogradov A. Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Letters*. 1985;184(2):226-30.
79. Rouslin W. Protonic inhibition of the mitochondrial oligomycin-sensitive adenosine 5'-triphosphatase in ischemic and autolyzing cardiac muscle. Possible mechanism for the mitigation of ATP hydrolysis under nonenergizing conditions. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(16):9657-61.
80. Rouslin W, Broge C. Regulation of mitochondrial matrix pH and adenosine 5'-triphosphatase activity during ischemia in slow heart-rate hearts. Role of Pi/H⁺ symport. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(26):15224-9.
81. Cabezon E, Butler P, Runswick M, Walker J. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(33):25460-4.
82. García J, Morales-Ríos E, Cortés-Hernandez P, Rodríguez-Zavala J. The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry*. 2006;45(42):12695-703.
83. Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García J. Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(35):12356-8.
84. Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski M, Abramov A, et al. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metabolism*. 2008;8(1):13-25.
85. Robinson G, Bason J, Montgomery M, Fearnley I, Mueller D, Leslie A, et al. The structure of F₁-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF₁. *Open Biology*. 2013;3(2):120164.
86. T.-H N, H. G S. Taxonomic Study of *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1983;33.
87. Beijerinck MW, Minkman DCJ. Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1910;25:30-63.
88. Kluyver A, Verhoeven W. Studies on true dissimilatory nitrate reduction. II. The mechanism of denitrification. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1954;20(3):241-62.

89. Baker S, Ferguson S, Ludwig B, Page M, Richter O, van Spanning R. Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 1998;62(4):1046-78.
90. Stouthamer A. Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1991;23(2):163-85.
91. John P, Whatley F. The bioenergetics of *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1977;463(2):129-53.
92. Ohkubo S, Iwasaki H, Hori H, Osawa S. Evolutionary relationship of denitrifying bacteria as deduced from 5S rRNA sequences. *Journal of Biochemistry*. 1986;100(5):1261-7.
93. Ludwig W, Mittenhuber G, Friedrich C. Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993;43(2):363-7.
94. Katayama Y, Hiraishi A, Kuraishi H. *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* (Reading, England). 1995;141 (Pt 6):1469-77.
95. Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen G, Woese C. Mitochondrial origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(13):4443-7.
96. Gray MW. Mitochondrial Evolution. *Science*. 1999;283.
97. Gray M. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9).
98. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theoret Biol*. 1967;14:225 - 74.
99. Whatley J, John P, Whatley F. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1979;204(1155):165-87.
100. Yagi T. Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986;250(2):302-11.
101. Pennoyer J, Ohnishi T, Trumpower B. Purification and properties of succinate-ubiquinone oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1988;935(2):195-207.
102. Berry E, Trumpower B. Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(4):2458-67.
103. Ludwig B, Schatz G. A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa3) from *Paracoccus denitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(1):196-200.
104. Ferguson S, John P, Lloyd W, Radda G, Whatley F. The ATPase as an irreversible component in electron transport linked ATP synthesis. *FEBS Letters*. 1976;62(3):272-5.
105. John P, Whatley F. *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*. 1975;254(5500):495-8.
106. John P, Hamilton W. Respiratory control in membrane particles from *Micrococcus denitrificans*. *FEBS Letters*. 1970;10(4):246-8.
107. Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1955;217(1):383-93.
108. Yip C-y, Harbour M, Jayawardena K, Fearnley I, Sazanov L. Evolution of respiratory complex I: "supernumerary" subunits are present in the alpha-proteobacterial enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(7):5023-33.
109. Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. 1995;376(6542):660-9.

110. Zharova T, Vinogradov A. Proton-translocating ATP-synthase of *Paracoccus denitrificans*: ATP-hydrolytic activity. *Biochemistry Biokhimiia*. 2003;68(10):1101-8.
111. Pérez J, Ferguson S. Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP synthesis at the active site(s) of F₀F₁-ATPase. *Biochemistry*. 1990;29(46):10503-18.
112. Ogilvie I, Capaldi R. Mutation of the mitochondrially encoded ATPase 6 gene modeled in the ATP synthase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 1999;453(1-2):179-82.
113. Nieuwenhuis F, van der Drift J, Voet A, Van Dam K. Evidence for a naturally occurring ATPase-inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1974;368(3):461-3.
114. Pacheco-Moisés F, García J, Rodríguez-Zavala J, Moreno-Sánchez R. Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATPase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 2000;267(4):993-1000.
115. Harris D, John P, Radda G. Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase, and their role in oxidative phosphorylation. I. The *Paracoccus denitrificans* system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1977;459(3):546-59.
116. de la Rosa-Morales MF. Composición de subunidades y mecanismo de regulación de la F₁F_o-ATPasa de *Paracoccus denitrificans*. Tesis de Maestría, Ciencias Biológicas, UNAM. 2005.
117. Zarco-Zavala M, Morales-Ríos E, Serrano P, Wüthrich K, Mendoza-Hernández G, Ramírez-Silva L, et al. Corrigendum to "The ζ subunit of the α -proteobacterial F₁F_o-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: A novel control mechanism of the central rotor". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2013;1827(1):60.
118. Dunn S. Removal of the epsilon subunit from *Escherichia coli* F₁-ATPase using monoclonal anti-epsilon antibody affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*. 1986;159(1):35-42.
119. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *bacteriophage T4*. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
120. Zarco-Zavala M, Morales-Ríos E, Mendoza-Hernández G, Ramírez-Silva L, Pérez-Hernández G, García-Trejo J. The ζ subunit of the F₁F_o-ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB Journal* 2014;28(5):2146-57.
121. Bragg P, Hou C. Ligand-induced conformational changes in the *Escherichia coli* F₁ adenosine triphosphatase probed by trypsin digestion. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1987;894(2):127-37.
122. Mendel-Hartvig J, Capaldi R. Catalytic site nucleotide and inorganic phosphate dependence of the conformation of the epsilon subunit in *Escherichia coli* adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*. 1991;30(5):1278-84.
123. Morales-Ríos E. Clonación, sobre-expresión, purificación y caracterización de las subunidades epsilon y de 11KDa presentes en la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* Tesis Doctoral, Ciencias Bioquímicas, UNAM. 2011.
124. Serrano P, Pedrini B, Mohanty B, Geralt M, Herrmann T, Wüthrich K. The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution. *Journal of Biomolecular NMR*. 2012;53(4):341-54.
125. Serrano P, Geralt M, Mohanty B, Wüthrich K. NMR structures of α -proteobacterial ATPase-regulating ζ -subunits. *Journal of Molecular Biology*. 2014.
126. Schwerzmann K, Hüllihen J, Pedersen PL. Proton adenosine triphosphatase complex of rat liver mitochondria. Interaction with the ATPase inhibitor peptide covalently labeled with N-hydroxysuccinimidyl-p-azidobenzoate. *J Biol Chem*. 1982;257(16):9555-60.

127. Van Heeke G, Deforce L, Schnizer RA, Shaw R, Couton JM, Shaw G, et al. Recombinant bovine heart mitochondrial F1-ATPase inhibitor protein: Overproduction in *Escherichia coli*, purification, and structural studies. *Biochemistry*. 1993;32(38):10140-9.
128. Mizumoto J, Kikuchi Y, Nakanishi Y-H, Mouri N, Cai A, Ohta T, et al. ϵ subunit of *Bacillus subtilis* F1-ATPase relieves MgADP inhibition. *PloS One*. 2013;8(8).
129. Cabezón E, Montgomery M, Leslie A, Walker J. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature structural biology*. 2003;10(9):744-50.
130. Bason JV, Runswick MJ, Fearnley IM, Walker JE. Binding of the inhibitor protein IF(1) to bovine F(1)-ATPase. *Journal of Molecular Biology*. 2011;406(3):443-53.
131. Zanolini F, Raho G, Gaballo A, Papa S. Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2004;36(5):447-57.
132. Margulis L. *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.
133. Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(13):4578-86.
134. Gupta RS. Protein Signatures Distinctive of Alpha Proteobacteria and Its Subgroups and a Model for α -Proteobacterial Evolution. *Critical Reviews in Microbiology*. 2005;31(2):101-35.
135. Zharova T, Vinogradov A. Requirement of medium ADP for the steady-state hydrolysis of ATP by the proton-translocating *Paracoccus denitrificans* FoF1-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1757(5-6):304-10.
136. Zharova T, Vinogradov A. Energy-dependent transformation of F0F1-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12319-24.
137. Pérez J, Ferguson S. 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*. 1990;29(46):10518-26.
138. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-75.
139. Peterson G. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*. 1977;83(2):346-56.
140. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 1987;166(2):368-79.
141. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*. 1925;66(2):375-400.
142. Stiggall D, Galante Y, Hatefi Y. Preparation and properties of complex V. *Methods in Enzymology*. 1979;55:308.
143. Pacheco-Moisés F, Minauro-Sanmiguel F, Bravo C, García J. Sulfite inhibits the F1F0-ATP synthase and activates the F1F0-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2002;34(4):269-78.
144. Aggeler R, Coons J, Taylor SW, Ghosh SS, Garcia JJ, Capaldi RA, et al. A functionally active human F1F0 ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(37):33906-12.
145. Tüena De Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1977;182(1):82-6.
146. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007;23(21):2947-8.

147. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium*. 1999;41:95-8.
148. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(12):2725-9.
149. Halfman C, Marcus F. A method for determining kinetic parameters at high enzyme concentrations. *The Biochemical Journal*. 1982;203(1):339-42.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbabio

Corrigendum

Corrigendum to “The ζ subunit of the α -proteobacterial F_1F_0 -ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: A novel control mechanism of the central rotor” [Biochim. Biophys. Acta 1817S (2012) S27–S28]

M. Zarco-Zavala^a, E. Morales-Ríos^a, P. Serrano-Navarro^b, K. Wüthrich^b, G. Mendoza-Hernández^c, L. Ramírez-Silva^c, J.J. García-Trejo^{a,*}

^a Department of Biology, Chemistry Faculty, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico

^b Joint Center for Structural Genomics and Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

^c Medicine Faculty, UNAM, Mexico

The abstract which originally appeared should be replaced with the following:

The ζ subunit [1] is a novel inhibitory element of the *Paracoccus denitrificans* F_1 (PdF₁)-ATPase and related α -proteobacteria, which works as a noncompetitive inhibitor of the sulfite-activated PdF₁-ATPase, with an IC₅₀ of 220 nM when reconstituted into a PdF₁ construct lacking the endogenous ζ and ϵ subunits. In contrast, the ϵ subunit of the PdF₁-ATPase was unable to inhibit the sulfite-activated PdF₁-ATPase, thus confirming that ζ rather than ϵ plays a central role in the inhibition of the α -proteobacterial F_1 -ATPase. The ζ subunit inhibitory region was determined by limited proteolysis and functional inhibitory reconstitution experiments. Further analyses showed that during PdF₁-ATPase activation by sulfite, the ζ subunit exposes its N- and C-termini. This contrasts with the ϵ subunit, which buries its C-terminal domain in the F_1 domain. The ζ subunit can also be reversibly cross-linked with rotor (γ , ϵ) and stator (α , β) subunits of the PdF₁-ATPase, as was previously also found for the IF₁ inhibitor of the mitochondrial F_1 -ATPase [2]. The present data thus suggest that the

mechanism of regulation by the ζ subunit involves the control of the intrinsic gyration of the central stalk of the α -proteobacterial F_1F_0 -ATPase, similar to the inhibitory mechanisms by the ϵ and IF₁ subunits in eubacterial and mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) synthases. The three-dimensional structure of the *P. denitrificans* ζ subunit determined by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has a four-helix bundle architecture (PDB ID: 2LL0), which is different from the structures of the aforementioned ϵ and IF₁ subunits. The present data thus indicate that a novel mechanism, with a new structural basis, contributes to regulation of the intrinsic gyration of the bacterial F_1F_0 nanomotor.

References

- [1] E. Morales-Ríos, F. de la Rosa-Morales, G. Mendoza-Hernández, J.S. Rodríguez-Zavala, H. Celis, M. Zarco-Zavala, J.J. García-Trejo, FASEB J. 24 (2010) 599–608.
- [2] F. Minauro-Sanmiguel, C. Bravo, J.J. García, J. Bioenerg. Biomembr. 34 (2002) 433–443.

PII of original article: S0005-2728(12)00214-9.

* Corresponding author.

E-mail address: jgarte@unam.mx (J.J. García-Trejo).

The ζ subunit of the F_1F_O -ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure

Mariel Zarco-Zavala,* Edgar Morales-Ríos,[‡] Guillermo Mendoza-Hernández,[†] Leticia Ramírez-Silva,[†] Gerardo Pérez-Hernández,[§] and José J. García-Trejo*,¹

*Departamento de Biología, Facultad de Química, and [†]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México; [‡]Medical Research Council, Mitochondrial Research Unit, Cambridge, UK; and [§]Universidad Autónoma Metropolitana de México, Tlalpan, México

ABSTRACT The ζ subunit is a novel natural inhibitor of the α -proteobacterial F_1F_O -ATPase described originally in *Paracoccus denitrificans*. To characterize the mechanism by which this subunit inhibits the F_1F_O nanomotor, the ζ subunit of *Paracoccus denitrificans* (Pd- ζ) was analyzed by the combination of kinetic, biochemical, bioinformatic, proteomic, and structural approaches. The ζ subunit causes full inhibition of the sulfite-activated PdF₁-ATPase with an apparent IC₅₀ of 270 nM by a mechanism independent of the ϵ subunit. The inhibitory region of the ζ subunit resides in the first 14 N-terminal residues of the protein, which protrude from the 4- α -helix bundle structure of the isolated ζ subunit, as resolved by NMR. Cross-linking experiments show that the ζ subunit interacts with rotor (γ) and stator (α , β) subunits of the F_1 -ATPase, indicating that the ζ subunit hinders rotation of the central stalk. In addition, a putatively regulatory nucleotide-binding site was found in the ζ subunit by isothermal titration calorimetry. Together, the data show that the ζ subunit controls the rotation of F_1F_O -ATPase by a mechanism reminiscent of, but different from, those described for mitochondrial IF₁ and bacterial ϵ subunits where the 4- α -helix bundle of ζ seems to work as an anchoring domain that orients the N-terminal inhibitory domain to hinder rotation of the central stalk.—Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Mendoza-

Hernández, G., Ramírez-Silva, L., Pérez-Hernández, G., García-Trejo, J. J. The ζ subunit of the F_1F_O -ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB J.* 28, 2146–2157 (2014). www.fasebj.org

Key Words: *Paracoccus denitrificans* • regulation

F_1F_O -ATP SYNTHASES ARE energy-transducing enzymes that produce ATP from ADP and inorganic phosphate (P_i) using the energy from electrochemical proton/sodium gradients across the plasma membrane of bacteria or the inner membranes of mitochondria and chloroplasts. Mechanistically, these enzymes consist of 2 nanomotors, coupled by rotary motion: an ion channel (F_O) and an ATP-synthesizing catalytic head (F_1). The operation of the enzyme is reversible; the direction of rotation depends on the direction of the reaction. During ATP synthesis, driven by transmembrane ion flow, rotation is clockwise (viewed from the F_O ion channel toward the F_1 catalytic head), while during ATPase-driven ion pumping, rotation is counterclockwise. To prevent the wasteful F_1 -ATPase activity, the F_1F_O nanomotors of mitochondria, chloroplasts, and eubacteria are tightly controlled through mechanisms that involve various supernumerary subunits or regulatory domains (reviewed in refs. 1, 2). For instance, in mitochondria, the IF₁ inhibitor protein (3) prevents the backward F_1 -ATPase activity during collapse of the proton gradient by stalling rotor gyration (4) and blocking the conformational changes of the α/β catalytic interfaces (2, 4), whereas in chloroplasts, an internal disulfide bridge of the γ subunit prevents the counterclockwise rotation in the ATPase direction (3).

Abbreviations: 1D, 1-dimensional; 2D, 2-dimensional; 2-IT, 2-iminothiolane; β -Me, β -mercaptoethanol; Δ NT, N-terminal deletion; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; CD, circular dichroism; DEAE, diethylaminoethyl; DEAH, diethyl aminoethyl; DSP, dithio-bis-succinimidylpropionate; DTT, dithiothreitol; DUF, domain of unknown function; IC₅₀, half-maximal inhibitory concentration; ITC, isothermal titration calorimetry; Js- ζ , ζ subunit of *Jannaschia* species; LDAO, lauryldimethylamine oxide; NMR, nuclear magnetic resonance; ORF, open reading frame; Pd- ϵ , ϵ subunit of *Paracoccus denitrificans*; Pd- ζ , ζ subunit of *Paracoccus denitrificans*; PdF₁, *Paracoccus denitrificans* F_1 ; P_i , inorganic phosphate; PK/LDH, pyruvate kinase/lactate dehydrogenase; Rs- ζ , ζ subunit of *Rhodobacter sphaeroides*; TCA, trichloroacetic acid; TEV, tobacco etch virus; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; WB, Western blot; WT, wild type

¹ Correspondence: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química, Departamento de Biología, Circuito Escolar, s/n, Laboratorio 206, Edificio F, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, México, DF. E-mail: jjgartre@unam.mx

doi: 10.1096/fj.13-241430

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

In eubacteria, the canonical inhibitor of the F_1 -ATPase turnover is the ϵ subunit (5), which works as a ratchet to preferentially inhibit the counterclockwise rotation during ATPase turnover (6), with some evidence that it also controls the ATP synthase activity (7, 8).

In contrast to the progress toward understanding the control of the ATP synthase nanomotor in mitochondria, chloroplasts, and eubacteria, the regulatory mechanism of the F_1F_0 nanomotor of α -proteobacteria was unknown until our recent isolation of the F_1 -ATPase and F_1F_0 -ATP synthase complexes from *Paracoccus denitrificans* (9), where we found a novel regulatory protein of 11 kDa. This subunit was named ζ , since it follows ϵ in decreasing size and operates as a novel strong inhibitor of the *P. denitrificans* F_1 (PdF_1)-ATPase activity. Interestingly, ζ is not related in sequence to the canonical F_1 -ATPase inhibitors from eubacteria (ϵ) or mitochondria (IF_1). The gene encoding ζ had been identified as a hypothetical protein or domain of unknown function (DUF; DUF1476) in all α -proteobacteria (9). Moreover, a homologous ζ subunit was found associated with the ATP synthase of *Rhodobacter sphaeroides* (9), suggesting that this subunit may work as a novel inhibitor of the F_1 -ATPase nanomotor all along the α -proteobacterial family.

Here we describe further functional and structural studies to resolve this novel inhibitory mechanism of the ζ subunit of the ATP synthase of *P. denitrificans*. These studies include the reconstitution of the recombinant ζ subunit into the PdF_1 -ATPase, combined with cross-linking, bioinformatic, proteomic, and structural approaches. Taken together, the data resolve key features of this novel control mechanism of α -proteobacterial F_1 -ATPases exerted by the ζ subunit and correlate these features with the newly resolved tertiary structure of the isolated ζ protein in solution.

MATERIALS AND METHODS

Strains

P. denitrificans (strain PD1222) was grown aerobically in the presence of succinate. Subbacterial particles (SBPs) prepared by sonication of inside-out membranes and the soluble PdF_1 -ATPase were obtained as described before (9). The *Escherichia coli* strain BL21 was used to overexpress the ζ and ϵ subunits of *P. denitrificans* ($Pd\text{-}\zeta$ and $Pd\text{-}\epsilon$, respectively) using the plasmids pIPPD1 and pEPPD1, respectively, constructed previously to clone the *P. denitrificans* ζ and ϵ genes (9).

Purification of PdF_1 -ATPase, $Pd\text{-}\zeta$, and $Pd\text{-}\epsilon$

The PdF_1 -ATPase and recombinant $Pd\text{-}\epsilon$ and $Pd\text{-}\zeta$ subunits were purified to homogeneity as described before (9). Additional modifications to the original purification protocol include a HiTrap Q Sepharose high-performance (QHP) column (5 ml; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) preceding the Superdex 200 gel filtration to desalt the PdF_1 -ATPase, followed by diethyl aminohexyl (DEAH) as affinity column at the final step used as reported before (9). This third chromatographic step improved the purity of the preparation (see

Supplemental Fig. S1A). The $Pd\text{-}\zeta$ subunit was purified essentially as before (9), but the protein was eluted with a smaller KCl gradient (0–0.3 M) from diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose followed by a Superdex 75 gel filtration step. For the purification of $Pd\text{-}\epsilon$, the initial ammonium sulfate precipitation was at 15% saturation (instead of 50% as used before; ref. 9) to collect the supernatant, followed by additional 25% $(NH_4)_2SO_4$ to reach 40% saturation to precipitate the protein and resuspend the pellet containing the enriched $Pd\text{-}\epsilon$. The protein was desalted by overnight dialysis against 20 mM phosphate (pH 8.0) followed by a DEAE Sepharose column, eluting the protein with a 0–0.7 M KCl gradient followed by Superdex 75, as reported before (9).

Preparation of the $PdF_1\text{-}\epsilon\text{-}\zeta$ ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta$) complex

Removal of the endogenous ζ and/or ϵ subunits from PdF_1 was carried out by immunoaffinity chromatography using protein-G agarose coupled to anti- ζ or anti- ϵ antibodies as described by Dunn (10). Briefly, the PdF_1 -ATPase was preincubated in buffer A (250 mM sucrose, 10 mM Tris, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 2.5 mM PAB, 0.2 mM ATP, and 30 mM sodium sulfite at pH 7.0) for 15 min before loading it into a 5 ml column of protein-G agarose coupled to anti- ζ and/or anti- ϵ antibodies and pre-equilibrated in buffer A. When the ζ was removed (without removing ϵ), a single protein-G-anti- ζ agarose column was used, and when both subunits were removed, 2 consecutive columns (anti- ζ and anti- ϵ) were coupled. Subunit composition of the eluted proteins was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the fractions with reduced amounts of ζ or ϵ subunits relative to δ or γ (as judged from densitometry analyses) were concentrated in Centricon filters of 100 kDa cutoff. The immunoaffinity columns were washed by elution of bound ζ or ϵ subunits (or residual PdF_1) with 2 vol of 2 M glycine (pH 3.0) and extensive washing with PBS.

Determination of the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the $Pd\text{-}\zeta$ in PdF_1 -ATPase

The PdF_1 -ATPase preparations were preincubated for 20 min at room temperature in reconstitution buffer containing 250 mM sucrose, 60 mM sodium sulfite, and 20 mM Tris (pH 8.0) with different amounts of $Pd\text{-}\zeta$ and/or $Pd\text{-}\epsilon$ (see Fig. 1). The ATPase activity was determined spectrophotometrically by the amount of P_i released from ATP as described before (9). The PdF_1 -ATPase activities were obtained from the initial linear rates of P_i release (1–2 min) to avoid accumulation of the inhibitory Mg^{2+} -ADP product (9). Alternatively, in order to use another F_1 -ATPase activator different to sulfite, real-time monitoring of the PdF_1 -ATPase and PdF_1F_0 -ATPase reactions were carried out by enzyme-coupled pyruvate kinase/lactate dehydrogenase (PK/LDH) ATPase assays as described before (11) in the presence of 0.15% lauryldimethylamine oxide (LDAO). The IC_{50} of the ζ subunit was determined by nonlinear fitting of the ATPase activity data to a Hill equation, $1 - v/V_0 = ([I]/IC_{50})^\alpha / [1 + ([I]/IC_{50})^\alpha]$, using Origin 7.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA), where V_0 is the initial catalytic rate without inhibitor, IC_{50} is the apparent inhibitor concentration that decreases the catalytic rate to $V_0/2$, and α is the Hill coefficient. The IC_{50} obtained is “apparent” since it depends on the enzyme concentration, which in this work is in the same range as that of the inhibitor; therefore, a significant fraction of the latter is bound to the enzyme (see Figs. 1 and 3). Curve fitting with this Hill equation has been used properly before to estimate K_i values under these relatively high enzyme concentrations (12); thus, instead of an exact K_i , we estimated the apparent

IC₅₀ by curve fitting with this kinetic model. It is worth noting that this Hill equation provided the best curve fitting since simpler noncompetitive kinetic models, which are valid under relatively smaller enzyme concentrations, produced fittings with higher standard errors.

Cross-linking of the PdF₁-ATPase with 2-iminothiolane (2-IT) and dithio-bis-succinimidylpropionate (DSP)

2-IT and DSP are dithiothreitol (DTT) or β -mercaptoethanol (β -Me) reversible and homobifunctional lysine cross-linkers of 14 and 12 Å cross-linking distance, respectively. Their reversibility is due to an internal disulfide bond suitable for resolution of cross-linked proteins by nonreducing-reducing 2-dimensional (2D)-SDS-PAGE. Cross-linking reactions were started by adding the indicated concentrations of 2-IT or DSP to the PdF₁-ATPase (diluted to 1–2 mg protein/ml) at room temperature in a buffer containing 20 mM phosphate and 10% glycerol at pH 8.0. For 2-IT cross-linking, the PdF₁-ATPase was thiolated with 1 mM 2-IT by 1 h in 20 mM phosphate buffer containing 1 mM EDTA at pH 8.0. The reaction was arrested by filtration through centrifuge Sephadex-G50 columns to remove excess cross-linker and EDTA. To oxidize neighboring thiols, 120 μ M CuCl₂ was added and incubated for 30 min at room temperature. Afterward, thiol oxidation was arrested by removal of Cu²⁺ with 10 mM EDTA together with the addition of protease inhibitors (Complete Protease Cocktail EDTA-free; Roche, Indianapolis, IN, USA). The DSP cross-linker contains an internal disulfide; thus, a single cross-linking reaction was carried out as described before with mitochondrial F₁-ATPase (4) but without further oxidation with Cu²⁺. The DSP cross-linking was arrested with 20 mM L-lysine after 30 min of cross-linking reaction and by filtration through centrifuge Sephadex-G50 columns. Finally, the cross-linked PdF₁-ATPase was concentrated in Amicon filters (10-kDa cutoff; Millipore, Billerica, MA, USA) and loaded into nonreducing 1D-SDS-PAGE followed by reducing 2D-SDS-PAGE, as described before (4) and detailed below. In some cases the nonreducing 1D-SDS-PAGE was transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with antibodies anti- ϵ or anti- ζ as described before (9).

2D-SDS-PAGE

The cross-linked subunits of the PdF₁-ATPase were first resolved by a nonreducing 1D (12–22%) SDS-PAGE according to Laemmli (13) or Schägger and Von-Jagow (14). The lane containing the resolved cross-linked PdF₁ bands was excised and preincubated in 5% β -Me plus 10 mM DTT to reduce the disulfides formed between cross-linked proteins. Afterward, the lane was loaded horizontally on top of a 2D (16%) SDS-PAGE according to Laemmli (13) or Schägger and von Jagow (15) flanked by standard lanes. Once electrophoresis was completed, the 2D gel was subjected to Coomassie blue or Silver staining as described before (4).

Subunit ζ constructs

Construction of the N-terminal truncated (Δ NT) Pd- ζ^{Δ NT subunit lacking the first 14 N-terminal residues of Pd- ζ was carried out by PCR amplification of the Pd- ζ gene as described before for the cloning of the wild-type (WT) Pd- ζ^{WT} (9) using the pIPPD1 plasmid carrying the WT- ζ gene (9) to amplify the truncated Pd- ζ^{Δ NT with the forward oligonucleotide ζ^{Δ NTFWD 5'-TATATTGAATTCATGTTCCGCCCATGATGCGG-3' together with the original reverse primer used before (Pd ζ Cterm) to amplify the Pd- ζ^{WT} (9). The first oligonucleotide introduced an *Eco*RI site used together with

the *Hind*III site of Pd ζ Cterm for cloning of the amplified Pd- ζ^{Δ NT gene into pT77. The construct (pDNTPDZ1) was verified by double digest with *Eco*RI/*Hind*III and by automated sequencing showing the exact DNA sequence of the Pd- ζ^{WT} gene but lacking the first 14 residues. The designed Pd- ζ^{Δ NT protein starts at its N-terminal side with a Met residue before the Phe-15 of the Pd- ζ^{WT} gene. The N-terminal truncated ζ subunit of *Jannaschia* species (Js- ζ^{Δ NT; PDB_id 2KZC) and the full Js- ζ proteins were kindly provided by Dr. Pedro Serrano and Prof. Kurt Wüthrich (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Both Js- ζ proteins contain a His tag at the N-terminal side that was removed by tobacco etch virus (TEV) protease proteolysis before carrying out the functional PdF₁-ATPase inhibitory assays (see Supplemental Fig. S1C). The Js- ζ^{Δ NT protein lacks 19 residues from the N-terminal side of the protein and 5 residues from the C-terminal end.

Other procedures

Circular dichroism (CD) measurements were carried out using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco, Inc., Easton, MD, USA) in 0.1-cm pathlength quartz cuvettes (far-UV CD) at 25°C. The spectra shown are the average of 3 consecutive scans. Deconvolution and secondary structure calculation were carried out with the software CDNN (16). Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements were carried out in an isothermal titration calorimeter (MicroCal model iTC200; MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). Curve fitting to a single ATP binding site model was carried out with Origin 7.5. Protein sequences after limited proteolysis of the Pd- ζ subunit were obtained by liquid chromatography/electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) as described before (17). Protein concentration was determined by the method of Lowry (18), modified by trichloroacetic acid (TCA) precipitation (19) as described previously (9), to avoid errors derived from interfering substances. Protein concentrations present during CD or ITC experiments were confirmed by Lowry-TCA determinations of the protein solutions recovered from the CD cuvettes or from the ITC cell after carrying out the respective determinations. Initial protein alignments were carried out by Basic Local Alignment Search Tool [BLAST; U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA; <http://www.nlm.nih.gov/blast/>] analyses and by ClustalW (<http://www.clustal.org>). Final alignments and phylogenetic trees were constructed with Consurf (Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; <http://consurf.tau.ac.il/>) and Chimera (University of California, San Francisco, CA, USA; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

RESULTS

Kinetic inhibitory mechanism of Pd- ζ on the PdF₁-ATPase

Previously (9), we showed that the novel 11-kDa Pd- ζ subunit found in the F₁F₀-ATP synthase of *P. denitrificans* works as a strong inhibitor of the PdF₁-ATPase activity. To estimate the IC₅₀ of Pd- ζ , the recombinant ζ and ϵ subunits were prepared and reconstituted to the PdF₁ complex from which the endogenous ϵ and ζ subunits had been previously removed by immunoaffinity chromatography. Binding of the ζ subunit alone (no recombinant ϵ subunit present) showed a strong decay of the ATPase activity in response to increasing concentrations of Pd- ζ that was well fitted to a kinetic

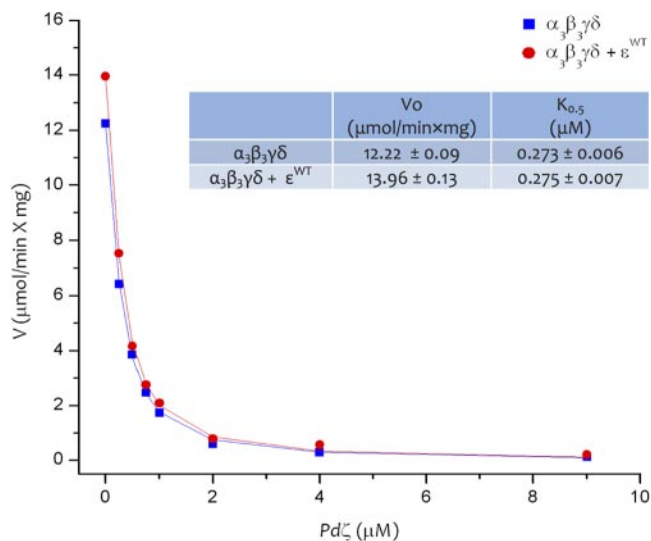


Figure 1. Inhibition of PdF₁-ATPase by increasing concentrations of the Pd- ζ subunit. PdF₁-ATPase lacking the endogenous Pd- ϵ and Pd- ζ ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ complex; 10 μg) was preincubated for 30 min with the indicated concentrations of the isolated recombinant Pd- ζ in a total volume of 100 μl in reconstitution buffer containing 60 mM sodium sulfite before starting the ATPase reaction. Afterward, the PdF₁-ATPase-catalyzed reaction was started by addition of 10 mM of Mg^{2+} -ATP. The reaction was arrested after 2 min of reaction by adding 6% TCA, and the amount of P_i released was determined colorimetrically by the P_i release assay (see Materials and Methods). The control experiment (squares) was carried out with the $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ subcomplex lacking both the endogenous Pd- ϵ and Pd- ζ , and a parallel experiment (circles) was preceded by reconstitution of 10-fold stoichiometric excess of recombinant Pd- ϵ before preincubation with the indicated amounts of Pd- ζ . Trace shows the fitting to a noncompetitive kinetic model to estimate the concentration of inhibitor (Pd- ζ) necessary to achieve 50% of total inhibition. Inset: initial velocities in the absence of Pd- ζ , and estimated values of IC_{50} .

Hill model (Fig. 1 and Materials and Methods). This result confirms that Pd- ζ works as a potent total inhibitor of the PdF₁-ATPase even in conditions of maximal catalytic turnover, as exerted by sulfite. The Hill coefficient obtained with the $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ complex was 1.3 with or without reconstitution of ϵ subunit (Fig. 1), suggesting a single high-affinity site for the ζ subunit in the PdF₁-ATPase with an apparent $\text{IC}_{50} \approx 270$ nM. Furthermore, the apparent IC_{50} of Pd- ζ is essentially the same in the presence or absence of exogenous Pd- ϵ (Fig. 1), under conditions where exogenous ϵ binds efficiently to the PdF₁-ATPase (9). In summary, ϵ does not inhibit the PdF₁-ATPase and does not modify the affinity of exogenous Pd- ζ to inhibit the PdF₁-ATPase. It seems, therefore, that ζ substitutes ϵ as the inhibitory subunit in the F₁-ATPase of *P. denitrificans*. Accordingly, it is expected that removal of the ζ subunit from the PdF₁ should increase its ATPase catalytic rate. Therefore, the ζ subunit was specifically removed by anti- ζ immunoaffinity chromatography (see Materials and Methods). As expected from the observed inhibitory role of ζ , removal of $\sim 30\%$ of the endogenous Pd- ζ (as estimated by densitometry of Coomassie-stained SDS-PAGE) in-

creased ~ 5 -fold the PdF₁-ATPase turnover, from 0.88 to $4.50 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ in the presence of 0.15% of LDAO. Although the latter is a less potent ATPase activator than sulfite, this result also shows that the inhibitory effect of Pd- ζ occurs irrespective of the F₁-ATPase activator used. Furthermore, removal of both subunits (ϵ and ζ) to obtain the $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ complex (see Materials and Methods) decreased to about half the sulfite-activated PdF₁-ATPase activity from 20 – $25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (see Fig. 3) to $12 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Fig. 1). Therefore, removal of ϵ seems to decrease the PdF₁-ATPase and therefore counteract the increase in PdF₁-ATPase activity induced by removal of ζ . In concordance with this, reconstitution of ϵ into PdF₁ restored partially the sulfite-activated catalytic turnover (see, for instance, the red point at 0 concentration of Pd- ζ in Fig. 1). Taken together, these data confirm that Pd- ϵ does not work as an intrinsic inhibitor of the PdF₁-ATPase; therefore, the ζ subunit has the key inhibitory role in the F₁-ATPase of *P. denitrificans*, and probably in related α -proteobacteria.

Evolution of the inhibitory ζ subunit of the F₁F₀-ATPase in α -proteobacteria

BLAST and ClustalW alignments of the ζ subunit showed no significant similarity with bacterial (ϵ) or mitochondrial (IF₁) F₁-ATPase inhibitors, implying that ζ provides a novel control mechanism of the bacterial F₁F₀-nanomotor. However, alignment of the first 14 N-terminal residues of the ζ subunit with the IF₁ family showed some similarity with the inhibitory domain of the IF₁ protein (ref. 20 and Supplemental Fig. S4). It is worth noting that the ζ subunit was found as an open reading frame (ORF) or DUF1476 all along the α -proteobacterial family (Fig. 2) and has been found bound to the native ATP synthase of the closely related α -proteobacterium *R. sphaeroides* (9). Therefore, to determine the evolutionary relationships among homologous ζ subunits, a phylogenetic tree of the ζ subunit was constructed by the maximal likelihood method after multiple sequence alignment with 100 representative sequences of the ζ ORFs found along the α -proteobacterial family (DUF1476); from these, 12 representative protein sequences were chosen and are shown for clarity (Fig. 2A). In concordance with robust protein phylogenetic trees of the α -proteobacteria (21, 22), the best-scored phylogenetic tree showed that the homologous ζ subunits closest to that of *P. denitrificans* include *R. sphaeroides* and *Jannaschia* species (Fig. 2A). This result is in agreement with the previous observation that the ζ subunit of *R. sphaeroides* (Rs- ζ) is bound to the F₁F₀-ATP synthase of this bacterium (9). The close relationship between Pd- ζ and Js- ζ was therefore studied at the structural and functional levels as shown below. Since no ORFs or DUFs of the ζ subunit were found outside the α -proteobacterial family, the ζ subunit emerges as a regulatory subunit exclusive of the α -proteobacterial F₁F₀-ATP synthase. Furthermore, alignment of the representative ζ subunit ORFs from

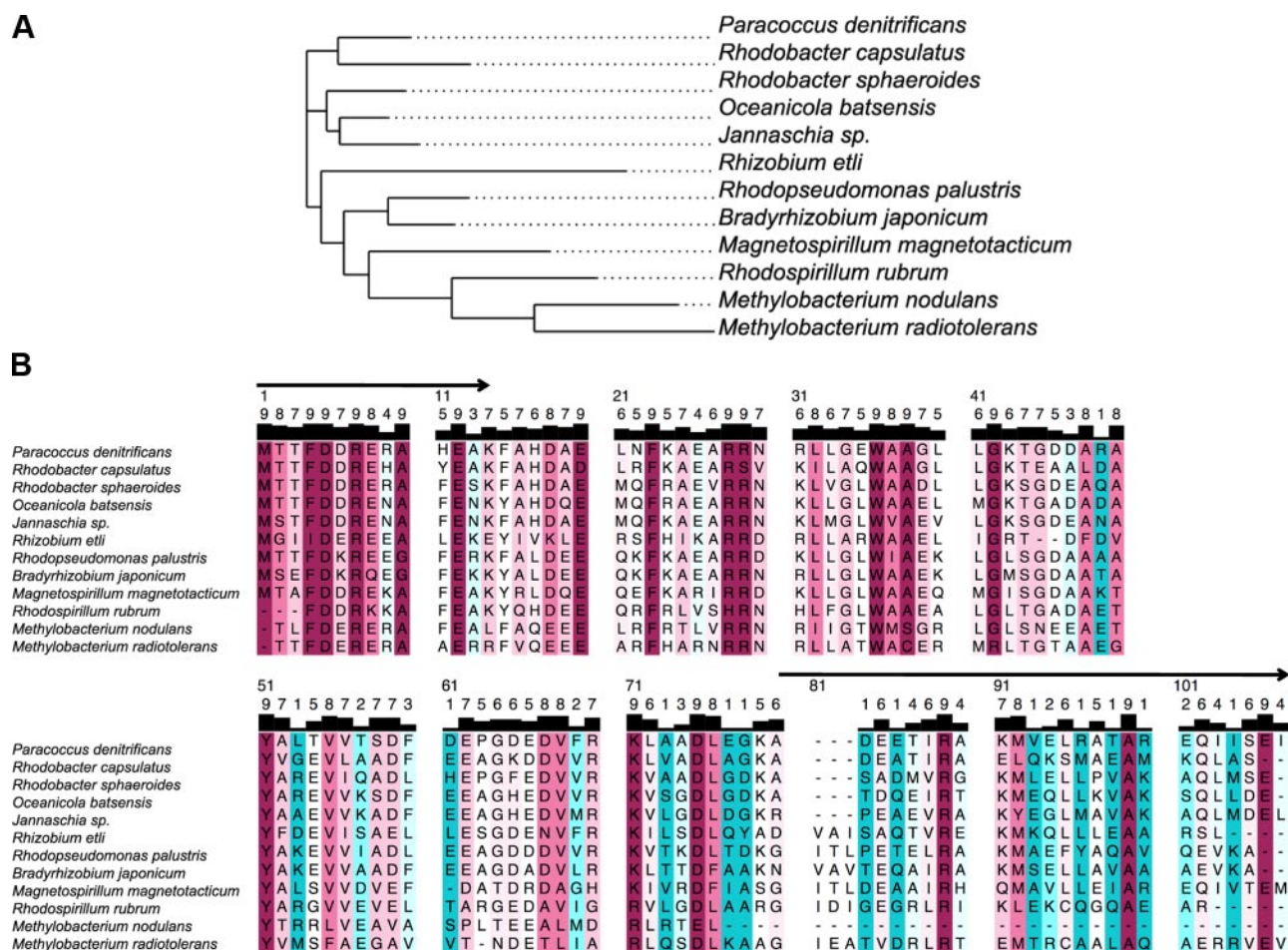


Figure 2. Evolution of the ζ subunit of the ATP synthase in α -proteobacteria. **A)** Chladrogram of the gene sequence of Pd- ζ in α -proteobacteria. ORF of the conserved Pd- ζ gene in α -proteobacteria was downloaded from BLAST. The gene appeared as a DUF in all α -proteobacteria, from which 100 representative sequences were aligned with ClustalW, and a chladrogram was constructed with neighbor joining analysis, from which a small phylogenetic tree was constructed with Consurf and Chimera by maximal likelihood with 12 representative protein sequences showing the proximity of the ζ subunits of *R. sphaeroides*, *Jannaschia* species and *P. denitrificans* (PD1222). Essentially the same tree is obtained with the minimal parsimony method. **B)** Protein sequence alignment generated with Consurf with 12 ζ subunit representatives from species shown in **A** and numbered according to the Pd- ζ sequence. Amino acids are colored according to conservation, following Consurf conventions (color codes indicated: blue, variable; white, average; and cherry red, highly conserved). Conservation scores are shown in bars and numbers [scale 1 (less conserved) to 10 (totally conserved)] at top of each residue.

α -proteobacteria showed that the highly conserved residues (pink to cherry red in Fig. 2B) cluster on the N-terminal domain, whereas the C-terminal side has a lower density of conserved residues (blue in Fig. 2B), suggesting that the N-terminal side contains important functional domains, as described below.

Identification of the inhibitory domain of the ζ subunit

As a first approach to identify the inhibitory domain of the ζ subunit, the recombinant protein was subjected to limited proteolysis with trypsin, which removed 14 and 25 residues from the N- and C-terminal extremes, respectively, as found by tandem mass spectrometry analyses (Fig. 2B, arrows, and Materials and Methods). The purified proteolytic Pd- ζ^{15-79} fragment showed no inhibition of the PdF₁-ATPase activity at a concentration as high as 10 μ M, *i.e.*, concentrations that resulted

in full inhibition of the PdF₁-ATPase when the Pd- ζ^{WT} subunit was reconstituted into PdF₁ (Fig. 1). This fragment, however, binds to the enzyme since it prevented the inhibition exerted by the WT Pd- ζ when reconstituted in sub-bacterial particles. These results indicated that the inhibitory domain of the Pd- ζ subunit lies either in the first N-terminal 14 residues or in the last 25 residues near the C terminus. The proteolytic accessibility of the N and C termini indicates that both extremes of the protein are exposed and most likely highly mobile, whereas the central Pd- ζ^{15-79} domain seems resistant to the protease treatment, suggesting that it should have a rigid folded structure that competes with Pd- ζ^{WT} for binding to the PdF₁-ATPase. These features were confirmed by the Pd- ζ conformers resolved by nuclear magnetic resonance (NMR), which show a highly mobile N-terminal domain and a more rigid globular central domain (Pedro Serrano and Kurt

Wüthrich, personal communication, 2012; see Supplemental Movie S1). Although at this point the inhibitory domain of the ζ subunit could be either in the C- or N-terminal extremes, the following observations pointed to the N-terminal side of Pd- ζ as the inhibitory domain: the higher conservation of the ζ N terminus (Fig. 2B), the limited but significant similarity of the first 14 N-terminal residues with the inhibitory domain of IF₁ (see Supplemental Fig. S4), and the higher mobility of the N-terminal side observed in the ζ conformers (Supplemental Movie S1). Therefore, we hypothesized that the first 14 N-terminal residues of Pd- ζ contain the inhibitory domain; to assess this, these residues were removed genetically in a Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct (see Materials and Methods). The recombinant Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct was overexpressed in *E. coli* and purified as described for the Pd- ζ^{WT} to ~93% purity (see Materials and Methods and Supplemental Fig. S1C). The Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ was reconstituted into the PdF₁-ATPase, and the inhibitory activity was measured. As shown in Fig. 3, removal of the first 14 N-terminal residues of Pd- ζ in the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct completely abolished the inhibitory capacity of the protein at

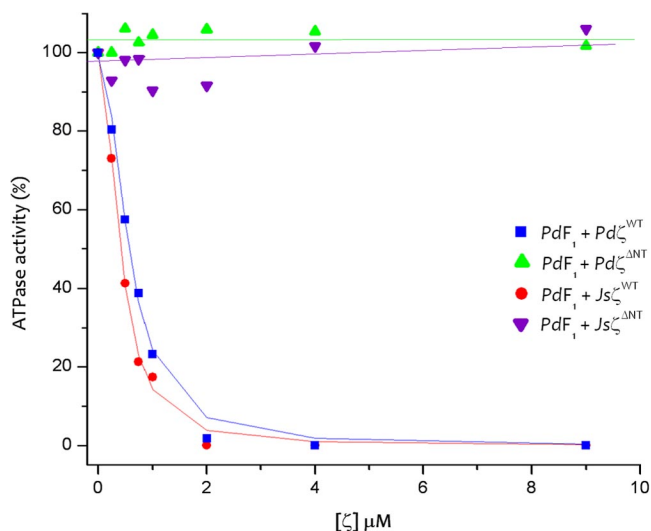


Figure 3. N-terminal domain of the Pd- ζ subunit is the inhibitory region of the protein, and this inhibitory function is conserved in Js- ζ . PdF₁-ATPase (10 μg) was preincubated for 30 min with the indicated concentrations of the recombinant Pd- ζ^{WT} , Pd- $\zeta^{\Delta NT}$, Js- ζ^{WT} , and Js- $\zeta^{\Delta NT}$ proteins in a total volume of 90 μl in reconstitution buffer before starting the ATPase reaction. Afterward, the PdF₁-ATPase-catalyzed reaction was started by adding 10 μl of Mg^{2+} -ATP to the premixed PdF₁ and the respective ζ subunits to obtain a final concentration of 10 mM Mg^{2+} -ATP in a reaction mixture containing 60 mM sodium sulfite (see Materials and Methods). The reaction was arrested after 1 min of reaction by adding 6% TCA, and the amount of P_i released was determined colorimetrically by the P_i assay (see Materials and Methods). Trace shows the fitting to a Hill kinetic model. Maximum (100%) control activity corresponded to 17–20 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ for Js- $\zeta^{\Delta NT}$, Js- ζ^{WT} Pd- ζ^{WT} , and Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ titration curves with IC₅₀ values of $0.57 \pm 0.03 \mu\text{M}$ for Pd- ζ^{WT} and $0.41 \pm 0.02 \mu\text{M}$ for Js- ζ^{WT} . Data points are averages of 3 independent experiments for each curve and had an SD of 10% (omitted for clarity).

concentrations as high as 9 μM , *i.e.*, concentrations that result in saturation of the Pd- ζ^{WT} and completely block PdF₁-ATPase activity (Figs. 1 and 3). These data indicate that the N-terminal side of the Pd- ζ subunit contains the inhibitory domain of the protein. To confirm that the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct keeps its native folding, a binding assay to PdF₁ was carried out by reconstitution of a 10-fold excess of Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ (mol/mol of PdF₁) followed by gel filtration through Superdex 200. The elution profile of this reconstitution assay showed 2 elution peaks; the first consisted of the PdF₁~Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ reconstituted complex (containing endogenous Pd- ζ and exogenously added Pd- $\zeta^{\Delta NT}$), and the second contained the free Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ (see Supplemental Fig. S2). Furthermore, the previous reconstitution of Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ into PdF₁ delayed the onset of inhibition exerted by the Pd- ζ^{WT} added during coupled ATPase assays, indicating that the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct binds competitively to the same binding site of the Pd- ζ^{WT} subunit of the PdF₁-ATPase. Remarkably, these results show that the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct keeps its native folded structure that binds to the PdF₁-ATPase and suggest that the globular domain of Pd- ζ works as an anchoring domain of this inhibitory protein, whereas the N terminus harbors the inhibitory domain of the protein.

Conservation of the inhibitory function of the ζ subunit in the α -proteobacterial family

To confirm the inhibitory role of the ζ subunit in other α -proteobacteria, we looked to isolate the homologous ζ subunit from another member of this bacterial class. Coincidentally, the NMR structure of a homologous ζ protein was reported in the NCBI BLAST server (PDB id 2KZC). This protein was a member of the DUF1476 family in *Jannaschia* species, another α -proteobacterium closely related to *P. denitrificans* (Fig. 2). This structure was uploaded by the group of Kurt Wüthrich, who kindly provided the full Js- ζ subunit. The Js- ζ subunit was reconstituted into the PdF₁-ATPase in the same conditions used for the Pd- ζ^{WT} (Fig. 1). As shown in Fig. 3, the Js- ζ protein also worked as a strong inhibitor of the PdF₁-ATPase, with apparent IC₅₀ (0.41 μM) and Hill coefficient ($\alpha=2$) very similar to those of the Pd- ζ^{WT} (0.57 μM and $\alpha=2$). These IC₅₀ and α values obtained with the whole PdF₁-ATPase (Fig. 3) are higher than those obtained with the PdF₁- ϵ - ζ (Fig. 1), most likely because in the $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ complex, the exogenous recombinant ζ binds more efficiently in the absence of the endogenous ζ and ϵ than in the PdF₁-ATPase. Most important, the titration curve of Js- ζ *vs.* PdF₁-ATPase activity superimposed with that of Pd- ζ (Fig. 3), reflecting the high similarity (85.6%) and identity (58.6%) between Js- ζ and Pd- ζ (see Supplemental Fig. S5). Although further studies with other α -proteobacteria more distant to *P. denitrificans* are ongoing to reinforce this conclusion, these results strongly suggest that the ζ subunit works as a potent F₁F₀-ATPase inhibitor all along the α -proteobacteria class.

In addition to the PdF₁-ATPase inhibition by the

complete Js- ζ , functional reconstitution studies were also carried out with the truncated Js- $\zeta^{\Delta NT}$ protein originally resolved by NMR (PDB_id 2KZC), which lacks the first N-terminal 19 residues (and the last 5 C-terminal ones). As expected from the lack of inhibitory function of the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct (Fig. 3), this truncated protein was also unable to inhibit the PdF₁-ATPase activity (Fig. 3). Furthermore, since the Js- $\zeta^{\Delta NT}$ subunit folds nearly identically with a 4- α -helix bundle as the WT Pd- ζ (P. Serrano and K. Wüthrich, personal communication, 2012; see PDB_id 2KZC), it can be inferred that the removal of 19 N-terminal residues from Js- ζ (or the 14 N-terminal residues from Pd- ζ) does not affect its overall folding, since the central 4- α -helix bundle remains properly folded. In summary, the loss of inhibitory PdF₁-ATPase function of the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ and the Js- $\zeta^{\Delta NT}$ truncated proteins does not result from defective folding but from the removal of their respective inhibitory N-terminal domains. This conclusion is better ascertained from the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct, since it lacks the first 14 N-terminal residues, whereas the Js- $\zeta^{\Delta NT}$ construct lacks 19 residues from N terminus and also 5 residues from the C-terminal side.

Structure of the isolated ζ subunit of α -proteobacterial ATP synthase

To understand the structure-function relationships inherent to this novel control mechanism of the α -proteobacterial F₁-ATPase, the secondary structure of the isolated ζ subunit was first analyzed by CD. These analyses showed that the Pd- ζ^{WT} subunit is an all- α -helix protein with an α -helix content > 90% at pH 6.0 and pH 8.0 (Supplemental Fig. S6). Subsequently, in collaboration with Kurt Wüthrich, the NMR structure of the recombinant Pd- ζ was resolved. The structure (PDB_id 2LL0) was part of a preliminary report (23) that will be described in detail elsewhere (P. Serrano and K. Wüthrich, personal communication, 2012). The NMR structure of the isolated Pd- ζ exhibits a novel 4- α -helix bundle tertiary structure, different from that of the known F₁-ATPase inhibitors, *i.e.*, bacterial ϵ and mitochondrial IF₁, which are $\alpha + \beta$ and extended α -helix proteins, respectively (see Fig. 6). The N and C termini of ζ converge in the tertiary structure of the protein, where the N-terminal side protrudes from the globular 4- α -helix central domain (see Fig. 6B). The NMR structure of Pd- ζ was resolved at pH 6.0 and not at pH 8.0 (the optimal inhibitory pH of Pd- ζ) to avoid the extensive proton exchange with the solvent, which hinders the resolution of several NMR peaks. To confirm that the secondary structure of Pd- ζ is preserved at pH 6.0, CD spectra of Pd- ζ were obtained at both pH values, resulting in ellipticity traces that superimposed almost identically (Supplemental Fig. S6), indicating a similar secondary structure of the Pd- ζ subunit at both pH values.

Cross-linking of Pd- ζ with neighboring subunits of the rotor and the stator of the PdF₁-ATPase

To determine the locus of the ζ subunit in the quaternary structure of the PdF₁-ATPase, the endogenous

Pd- ζ subunit was cross-linked with neighboring subunits in the PdF₁-ATPase with 2-IT. This cross-linker produced Pd- ζ adducts of ~26, 41, and 65–70 kDa (Fig. 4). The sizes of these adducts suggested the following cross-linking products: ζ - ϵ (11+16=27 kDa), ζ - γ (11+30=41 kDa), ζ - α (11+50=61 kDa), and ζ - β (11+55=66 kDa) (Fig. 4A, right panel). To confirm the identity of

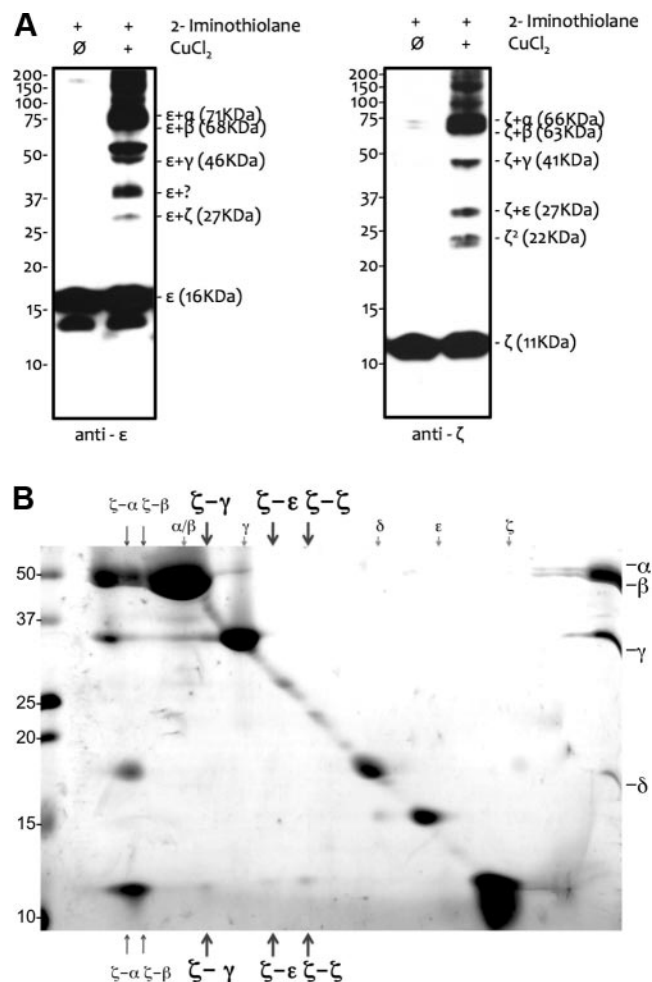


Figure 4. Reversible cross-linking of Pd- ζ and Pd- ϵ with rotor and stator subunits of the PdF₁-ATPase. **A)** Top: 20 μ g of the PdF₁-ATPase containing its endogenous Pd- ϵ and Pd- ζ were thiolated on accessible lysine residues with 1 mM 2-IT; afterward, reversible disulfide cross-linking was induced by incubation with 120 μ M CuCl₂ where indicated. WB anti- ϵ (left) and anti- ζ (right) of control (first lanes) and cross-linked enzymes (right lanes) were carried out as described in Materials and Methods. Major cross-linking products obtained were ϵ - α , ϵ - β , ϵ - γ , ζ - α , ζ - β , and ζ - γ adducts. Smaller products included a low-yield ϵ - ζ adduct. **B)** Identities of these adducts are confirmed as follows: 900 μ g of PdF₁-ATPase cross-linked with 1 mM 2-IT as in **A** were overloaded on a nonreducing 1D-SDS-PAGE according to Laemmli (13). Afterward, the entire lane containing the cross-linked PdF₁-ATPase was reduced with 5% β -Me and 10 mM DTT for 0.5 h before loading it into a 2D-SDS-PAGE according to Schagger and Von Jagow (14). Smaller spots aligned vertically under the major spots aligned diagonally (arrows) indicate cross-linked subunits, which are identified with the right (PdF₁-ATPase) and left (MWS) standard lanes. Major cross-linking products resolved are ζ - α , ζ - β , and ζ - γ as observed in **A**. Positions of ζ - ϵ and ζ - ζ cross-linking adducts are also indicated.

these cross-linking products, Western blot (WB) analyses with anti- ζ and anti- ϵ antibodies were carried out. The 27-kDa adduct had cross-reactivity with both antibodies (Fig. 4A), thus confirming the cross-linking between ζ and ϵ . The putative ζ - γ adduct of ~ 41 kDa and other cross-linking products were resolved as vertically aligned spots in a reducing 2D-SDS-PAGE. The final 2D gel showed clearly all the Pd- ζ cross-linking products previously observed by WB (compare Fig. 4A, B). The observed ζ cross-linking subunits are (Fig. 4B, left to right) ζ - α , ζ - β , and ζ - γ (Fig. 4B, dark arrows); a low yield ζ - ϵ ; and a ζ - ζ cross-linking that may result from dimeric Pd- ζ , as observed before with mitochondrial IF₁ (4). The presence of a ζ - ζ dimer is also suggested by gel filtration of the isolated Pd- ζ , which eluted as 2 peaks from Superdex 75. To discard the possibility that the observed Pd- ζ cross-linkings resulted from nonspecific thiol oxidation by Cu²⁺, similar cross-linking experiments were carried out with DSP, a similar cross-linker that already contains an internal disulfide, and therefore thiol oxidation with Cu²⁺ was not necessary. Cross-linking with DSP showed ζ - γ (11+30=41 kDa), ζ - α (11+50=61 kDa), and ζ - β (11+55=66 kDa) adducts (see Supplemental Fig. S2) similar to those observed with 2-IT (Fig. 4A), with the exception of ζ - ϵ and ζ - ζ . These results show that the observed ζ -cross-linkings (ζ - α , ζ - β , and ζ - γ) do not result from nonspecific thiol oxidation but from actual cross-linking interactions between the latter PdF₁ subunits. Furthermore, the relatively low ζ - γ cross-linking yields obtained with 2-IT and DSP (Fig. 4 and Supplemental Fig. S2) were increased by previous reconstitution of excess ζ subunit into PdF₁ followed by gel filtration through Superdex 200 to remove the free recombinant subunit before cross-linking. In sum, the cross-linking data show that the ζ subunit interacts with rotor (γ) and stator (α , β) subunits of the PdF₁-ATPase, strongly suggesting that the ζ subunit interferes with rotation of the central rotor, a result reminiscent of those observed with mitochondrial IF₁ and bacterial ϵ as derived from cross-linking (4, 6) and crystallographic studies (24–28).

Nucleotide binding to the ζ subunit of *P. denitrificans*

The eubacterial ϵ subunit binds ATP (29), and it was of interest to examine whether this is also the case for Pd- ζ . The first evidence of nucleotide binding to Pd- ζ was obtained by NMR experiments of Pd- ζ carried out in the presence of ATP or ADP (P. Serrano and K. Wüthrich, personal communication, 2013). Therefore, we estimated the binding affinity of ATP to Pd- ζ by ITC. The isothermal titration of ATP into the isolated ζ subunit was fitted to a single binding site with a K_d of 11.4 mM (Fig. 5). Similar calorimetric experiments also showed the binding of ADP to Pd- ζ but with a lower affinity (not determined). Given the low affinity of the nucleotide binding site observed, the protein concentration of ζ was relatively high (60 mg/ml), and to avoid excessive heat of dilution of the protein, the nucleotide

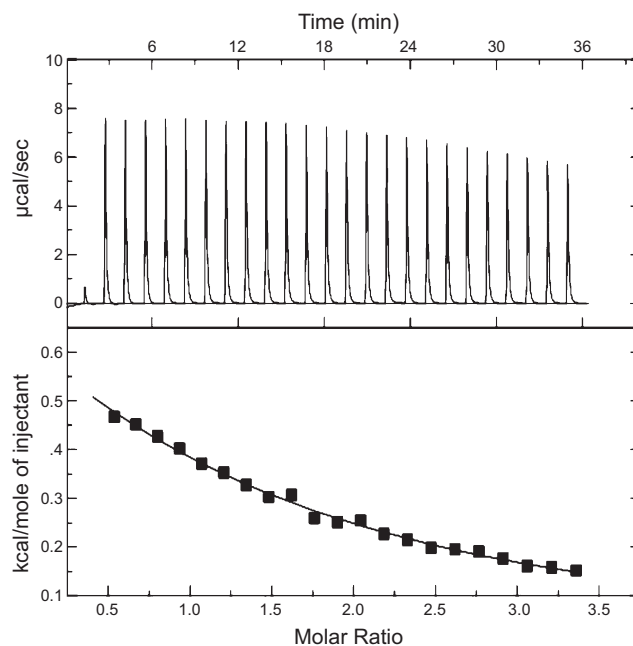


Figure 5. Calorimetric isothermic titration of ATP binding to Pd- ζ . Pd- ζ subunit was preequilibrated at 25°C at a concentration of 60 mg/ml in reconstitution buffer (see Materials and Methods). Once the system was stabilized, the calorimeter cell was automatically titrated with the indicated injections from an ATP stock solution of 82.14 mM in the injection syringe. Heat peaks of the injections were integrated manually to avoid errors in automatic peak detection, and dilution heat of the ATP stock was subtracted from a parallel experiment with the same injection program but in the absence of Pd- ζ in the calorimeter cell. After dilution heat of the nucleotide was subtracted, heat of ATP binding was fitted to a nonlinear single binding site, as shown by black trace. Dissociation constant obtained was 11.4 mM.

was injected into the cell containing the protein, and the heat of dilution of the nucleotide (determined with control injections without the protein in the cell) was subtracted from the trace containing the ζ subunit to obtain a good curve fitting (Fig. 5). To confirm the binding of nucleotides into the isolated Pd- ζ subunits, the structure of the Pd- ζ protein was resolved by NMR in the presence of ADP (P. Serrano and K. Wüthrich, personal communication, 2013), and the resulting structure (PDB_id 2MDZ) was different from that of the isolated Pd- ζ (PDB_id 2LL0). Although the detailed differences between the isolated apoPd- ζ and the ADP-bound Pd- ζ structures will be presented in detail elsewhere (P. Serrano and K. Wüthrich, personal communication, 2013), the overall results confirm the existence of a low-affinity nucleotide binding site in the Pd- ζ subunit.

DISCUSSION

Kinetic inhibitory mechanism of Pd- ζ on the PdF₁-ATPase

Previously, we found that the ζ subunit was a potent inhibitor of the PdF₁-ATP synthase (9); however, the

putative participation of the ϵ subunit in this inhibitory mechanism remained to be clarified. Here, by working with an $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ complex lacking the endogenous ϵ and ζ subunits (PdF₁- ζ - ϵ), it was possible to assess the functional effects of recombinant ϵ and ζ by separate or joint reconstitution of both subunits into the PdF₁- ζ - ϵ complex. As expected from the inhibitory role of ζ , removal of this subunit increased severalfold the steady-state PdF₁-ATPase activity. Furthermore, the PdF₁- ζ - ϵ ATPase activity decreased to 0 in response to increasing ζ concentrations, with a decay well fitted to a Hill equation and $\alpha = 1.3$, suggesting a single inhibitory binding site with apparent $IC_{50} \approx 0.27$ mM. Furthermore, when the ζ subunit was reconstituted into the PdF₁-ATPase containing the endogenous ϵ and ζ subunits, the Hill coefficient raised from $\alpha = 1.3$ in the $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ complex to $\alpha = 2$, and the apparent IC_{50} increased ~ 2 -fold (compare Figs. 1 and 3, respectively). Although these results might suggest a ζ /PdF₁ stoichiometry >1 , it is possible that the presence of the endogenous ζ and ϵ subunits in the PdF₁ have raised the α and apparent IC_{50} values. Thus, although further reconstitution and binding assays are necessary (and in course) to determine more accurately the ζ /PdF₁ stoichiometry and K_i values, the present data suggest that the ζ subunit binds to a single binding site of high affinity to exert full inhibition the PdF₁-ATPase. By comparison, the K_i values of eubacterial ϵ (≈ 10 nM; ref. 5) and mitochondrial IF₁ (≈ 0.4 μ M; refs. 30, 31) were determined under similar relatively high enzyme concentrations; thus, the apparent IC_{50} of PdF₁ for the ζ subunit of ≈ 0.27 μ M resulted in the same range. Remarkably, the ϵ subunit did not exert inhibition of the PdF₁-ATPase either directly or indirectly, *i.e.*, as a factor promoting the binding of the ζ subunit (Fig. 1). Furthermore, removal of ϵ decreased the PdF₁-ATPase activity, and the latter improved partially after ϵ reconstitution (Fig. 1). Since ϵ has been described as the canonical inhibitor of bacterial F₁-ATPases, it is of relevance to find here that this subunit does not work as such intrinsic inhibitor in *P. denitrificans*, suggesting that the ζ subunit substitutes ϵ as the natural F₁-ATPase inhibitor in the whole α -proteobacteria class. Similar to the noninhibitory properties of Pd- ϵ , the homologous subunit of *Bacillus subtilis* was recently described as F₁-ATPase activator rather than inhibitor, acting by relieving the intrinsic inactivation of the enzyme exerted by endogenous Mg²⁺-ADP (32). Thus, the lack of inhibitory function of the ϵ may not be exclusive of α -proteobacteria but this may be extended to gram-positive bacteria.

Conservation of the primary sequence and inhibitory function of the ζ subunit in the α -proteobacterial family

According to the endosymbiotic theory (33) and robust phylogenetic analyses (21, 22), *P. denitrificans* and other α -proteobacteria are closely related to the protoendosymbiont from which mitochondria emerged. This sug-

gested that ζ could be an evolutive predecessor of mitochondrial IF₁. However, the overall sequence of ζ does not align with mitochondrial IF₁ or ϵ subunits, suggesting that the limited similarity of its N-terminal inhibitory domain with that of IF₁ (Supplemental Fig. S4) is a case of structural evolutive convergence. This N-terminal inhibitory domain of ζ is highly conserved along α -proteobacteria (Fig. 2), whereas its C-terminal side is rather variable, indicating the functional relevance of the N-terminal domain. Coincidentally, some of the ζ homologues closer to that of *P. denitrificans* were found in *R. sphaeroides* and *Jannaschia* species (Fig. 2). Accordingly, given the similarity between Pd- ζ and Rs- ζ , it was possible to immunodetect the homologous ζ subunit of *R. sphaeroides* as an integral ATP synthase subunit (9). However, the putative inhibitory function of other ζ subunits homologous to that of *P. denitrificans* remained to be demonstrated. Therefore, the observation that the ζ subunit from *Jannaschia* species worked as a strong inhibitor of the Pd-F₁ ATPase with a similar IC_{50} compared with that of Pd- ζ (Fig. 3) confirmed that the inhibitory function of the ζ subunit is conserved in other α -proteobacteria. On the other hand, the central globular and C-terminal portions of the ζ subunit are different in primary and tertiary structure to mitochondrial IF₁ and bacterial ϵ , and consequently, some of their functional properties differ as well. For instance, the conserved regulatory histidine pairs (34, 35) of IF₁ that enhance F₁-ATPase inhibition at pH <7 are absent in the ζ subunit and consequently, the optimal pH of Pd- ζ is different ($\sim$ pH 8). On the other hand, the ATP binding motif of ϵ [I(L)DXXRA; ref. 36] is absent in the ζ subunit although the latter binds ATP with relatively low affinity (Fig. 5); thus, the ζ subunit possesses a new ATP binding motif that remains to be defined. In summary, the data show that the ζ subunit is highly conserved along α -proteobacteria as a novel F₁-ATPase inhibitor and differs in primary and tertiary structure to the canonical ϵ and IF₁ inhibitors of eubacteria and mitochondria, respectively.

N-terminal inhibitory domain, cross-linking, and structure of the ζ subunit

As predicted from domain conservation (Fig. 2) and limited proteolysis of ζ , the Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ construct is unable to inhibit the rotary PdF₁-ATPase turnover (Fig. 3), although it preserves its 4- α -helix globular structure (PDB_id 2KZC) and it binds to the PdF₁ (Supplemental Fig S2). These results show that the first 14 N-terminal residues of the ζ subunit harbor the inhibitory domain of the protein. Together with the ζ - γ cross linking observed (Fig. 4), the data suggest that the ζ subunit inserts its highly mobile inhibitory N-terminal domain in an $\alpha/\beta/\gamma$ interface to block γ/ϵ rotation and/or the α/β catalytic movements of the PdF₁-ATPase (Fig. 5 and Supplemental Movie S1). This is reminiscent of the inhibitory mechanisms of bacterial ϵ and mitochondrial IF₁ to block rotation of their respective F₁-ATPases (24, 26–28). However, the ζ subunit shows functional simi-

larities but structural differences with these well-known F_1 -ATPase inhibitors. For instance, the ζ subunit shows hybrid properties of ϵ (such as ATP binding) and IF_1 (such as an N-terminal inhibitory domain) but possesses a remarkably different structure (Fig. 6). Furthermore, the N-terminal domain of ζ is highly mobile (Supplemental Movie S1), and it does not acquire a full α -helical conformation (Fig. 6B), as compared with the inhibitory α -helical domains of ϵ and IF_1 bound to their respective F_1 -ATPases (24, 26–28). Furthermore, ϵ and IF_1 have different interactions with rotor and stator interfaces to block rotation of mitochondrial and bacterial F_1 -ATPases (24, 26–28). Whereas ϵ is a rotary subunit that works as a ratchet and contacts mainly the γ subunit, mitochondrial IF_1 is part of the stator and shows more contacts with an α/β interface than with the rotary γ subunit (24, 26–28). This suggests that the ζ subunit blocks rotation of the PdF_1 -ATPase by interacting with an $\alpha/\beta/\gamma$ interface but with rotor/stator interactions that may be different from those observed for ϵ and IF_1 (24, 26–28). On the other hand, regarding the central 4- α -helical globular domain of the ζ subunit, the observation that the $Pd\zeta^{\Delta NT}$ construct is able to bind to the PdF_1 -ATPase (Supplemental Fig. S2) without exerting F_1 -ATPase inhibition (Fig. 3) suggests that this portion of the protein works as an anchoring domain of ζ , preserving its 4- α -helix structure after binding to the PdF_1 -ATPase. The higher cross-linking yields of the ζ - α and ζ - β adducts compared with ζ - γ and ζ - ϵ (Fig. 4) suggest that the anchoring domain of ζ is part of the stator and that the N terminus of this inhibitor sticks to the rotary γ subunit to block rotation.

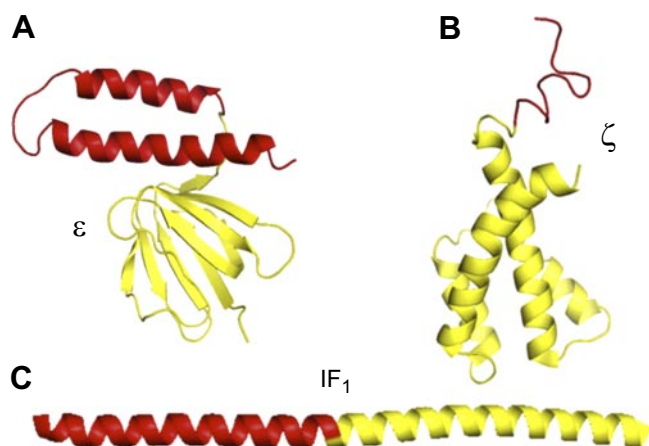


Figure 6. Structures of the F_1 -ATPase protein inhibitors and their inhibitory domains. A) X-ray structure of the ϵ subunit for *E. coli* (Ec- ϵ ; PDB_id 1AQT). B) X-ray structure of the inhibitor protein IF_1 from *Bos taurus* (PDB_id 1HF9). C) NMR solution structure of the ζ inhibitory protein from *P. denitrificans* (PDB_id 2LL0). In all structures, the segment in red shows the inhibitory domains, which correspond to the C-terminal 2- α -helices of Ec- ϵ (A), the mobile N-terminal 14 residues of $Pd\zeta$ (B), and the N-terminal IF_1 region of mitochondrial F_1 -ATPase. The cross-linking (Fig. 4) and structural comparison indicates that the inhibitory domain of $Pd\zeta$ sticks into a rotor/stator interface to block rotary catalysis of the PdF_1 -ATPase (see text for details).

Accordingly, the N terminus of ζ contains only 2 Lys residues (Fig. 2B) that likely produce a low ζ - γ cross-linking yield (Fig. 4), whereas the globular anchoring domain of ζ possesses 4 Lys residues, likely forming ζ - α/ζ - β adducts of higher cross-linking yields compared with ζ - γ (Fig. 4). However, the structural details of the inhibitory conformation of ζ bound to the PdF_1 -ATPase are yet to come after ongoing structural studies at atomic resolution.

Nucleotide binding site of the ζ subunit

Finding a low-affinity nucleotide binding site on the ζ subunit (Fig. 6) suggests that the inhibitory function of this protein may be regulated by ATP or ADP binding, as found with eubacterial ϵ subunit. Comparing the low-affinity nucleotide binding site of ζ with that of eubacterial ϵ , it is worth mentioning that the *E. coli* ϵ subunit binds ATP with a K_d of 22 mM (36), whereas that of thermophilic bacterium PS3 binds it with a K_d of 200 μ M (37). ATP binding to ϵ seems to control the inhibitory/noninhibitory transitions of ϵ (25, 29). Furthermore, some functional antecedents of the ATP synthase of *P. denitrificans* also indicate the regulatory effects of ATP or ADP. For instance, it has been shown that the continuous PdF_1F_O -ATPase activity of membrane vesicles from *P. denitrificans* requires the presence of ADP in the medium (38, 39), and that the forward PdF_1F_O -ATP synthase activity is inhibited by product ATP (40, 41). However, the apparent binding affinities for ADP and ATP that control the PdF_1F_O -ATPase/ATP synthase turnover are in the micromolar range (38–41), i.e., affinities $\sim 10^3$ times higher than the low-affinity K_d observed for ATP with the isolated ζ subunit (Fig. 5). Thus, further functional studies are required to assess the putative regulatory role of the ATP/ADP binding site of the ζ subunit on the functional PdF_1 and F_1F_O -ATPase complexes.

CONCLUSIONS

In summary, several key features of the new inhibitory ζ subunit of the α -proteobacterial F_1 -ATPase were here resolved and are enlisted as follows. The strong inhibition of PdF_1 exerted by the ζ subunit appears to require 1 mol/mol of enzyme, and its binding is independent of the ϵ subunit of α -proteobacteria, which is not by itself an inhibitor. The ζ subunit is a natural F_1 -ATPase inhibitor conserved all along the α -proteobacteria class. The highly conserved and protruding N-terminal domain of the ζ subunit is the inhibitory domain of the protein, whereas the globular 4- α -helix part of the protein seems to work as an anchoring domain. The structure of the ζ subunit is essentially different from the other known F_1 -ATPase inhibitors, IF_1 and ϵ . Cross-linking studies place the ζ subunit at a rotor (γ)/stator (α , β) interface, which indicates that the inhibitory mechanism of the ζ subunit involves the interference with rotation of the central stalk. The subunit has a nucleotide binding site whose function

remains to be evaluated. In sum, from the functional and structural differences observed between the ζ subunit and the ϵ or IF₁ canonical F₁-ATPase inhibitors, this work provides the basis of a new control mechanism of the bacterial F₁F₀-ATP synthase nanomotor, particularly conserved in α -proteobacteria. **[FJ]**

The authors gratefully acknowledge Marietta Tuena de Gómez-Puyou and Armando Gómez-Puyou [Institute of Cell Physiology (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)] for critical review of this work. The authors also thank John E. Walker (Medical Research Council, Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) for important suggestions in the first draft of the article. The authors also thank Blanca Barquera (Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA) and Roderick A. Capaldi (University of Oregon, Eugene, OR, USA) for important suggestions to improve the final text of this article. The technical assistance of Raquel Ortega is gratefully acknowledged. This project was supported by the following grants to J.J.G.-T.: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)–Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA; UNAM) grants IN213809 and IN211012, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant CB-2011-01-167622. G.P.-H. was supported by CONACyT grants 47310013 and 105532 and L.R.-S. by PAPIIT-DGAPA (UNAM) grant IN215912. The authors are grateful to Dr. Pedro Serrano and Prof. Kurt Wüthrich for initial collaborative work in the resolution of the NMR structure of the Pd- ζ subunit, for permission to show the resolved Pd- ζ structure (PDB_id 2LL0; Fig. 6 and Supplemental Movie S1) and to cite the nucleotide binding properties of the ζ subunit, and for providing plasmids expressing the truncated and full Js- ζ subunits for functional studies (Pedro Serrano, M. G. Biswaranjan Mohanty, and Kurt Wüthrich; to be submitted; private communication by the authors). M.Z.-Z. was supported by CONACyT Ph.D. Fellowship 299475; this work is part of her Ph.D. thesis at the Postgraduate Studies in Biomedical Sciences of UNAM [Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB)] carried out at the UNAM Facultad de Química (Faculty of Chemistry) with J.J.G.-T. as Ph.D. advisor. Author contributions: M.Z.-Z. carried out most of the experiments, including protein purification, cross-linking, CD, calorimetry, limited proteolysis, ATPase activity, WB, and 2D-SDS-PAGE gels, designed research, made gene constructions, and analyzed the data; E.M.R. carried out preliminary biochemical experiments shown in Supplemental Material, designed the primers for protein constructions and carried out the phylogenetic analysis of the ζ gene in the α -proteobacterial class, wrote part of Materials and Methods, and contributed key expertise in the cloning and protein purification protocols; G.M.-H. carried out the mass spectrometry sequencing of the full WT Pd- ζ subunit and also protein constructs and proteolytic fragments obtained by limited proteolysis; L.R.-S. carried out the CD experiments and helped with the calculation of secondary structure content of the Pd- ζ subunit; G.P.-H. carried out ITC of ATP binding to Pd- ζ and helped with the data fitting to estimate the K_d for ATP; J.J.G.-T. designed research, carried out cross-linking experiments, ATPase assays, and protein purification experiments and contributed to molecular biology constructions and cloning, helped with curve fitting to estimate the IC₅₀ of Pd- ζ during inhibitory titration, carried out 2D-SDS-PAGE gels, constructed phylogenetic trees and protein sequence alignments, and wrote the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

Dedication: This work is dedicated to the memory of Armando Gómez-Puyou, emeritus professor of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), for his major

contributions to bioenergetics and protein structure and function, and as one of the most important scientists of Mexico, and also to Guillermo Mendoza-Hernández for his major contributions to proteomics at UNAM.

REFERENCES

1. Garcia-Trejo, J. J., and Morales-Rios, E. (2008) Regulation of the F₁F₀-ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *J. Biol. Phys.* **34**, 197–212
2. Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1–16
3. Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769
4. 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
5. 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
6. 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
7. Masaike, 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
8. 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
9. 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 F₁F₀ ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB J.* **24**, 599–608
10. Dunn, S. D. (1986) Removal of the epsilon subunit from *Escherichia coli* F₁-ATPase using monoclonal anti-epsilon antibody affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **159**, 35–42
11. Garcia, 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 F₁: competition with H₂PO₄. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 127–136
12. Halfman, C. J., and Marcus, F. (1982) A method for determining kinetic parameters at high enzyme concentrations. *Biochem. J.* **203**, 339–342
13. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
14. 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
15. 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
16. 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
17. De los Rios Castillo, D., Zarco-Zavala, M., Olvera-Sanchez, S., Pardo, J. P., Juarez, O., Martinez, F., Mendoza-Hernandez, G., Garcia-Trejo, J. J., and Flores-Herrera, O. (2011) Atypical cristae morphology of human syncytiotrophoblast mitochondria: role for complex V. *J. Biol. Chem.* **286**, 23911–23919
18. 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
19. 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

20. Van Raaij, M. J., Orriss, G. L., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., and Walker, J. E. (1996) The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* **35**, 15618–15625
21. Williams, K. P., Sobral, B. W., and Dickerman, A. W. (2007) A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J. Bacteriol.* **189**, 4578–4586
22. Gupta, R. S. (2005) Protein signatures distinctive of alpha proteobacteria and its subgroups and a model for alpha-proteobacterial evolution. *Crit. Rev. Microbiol.* **31**, 101–135
23. Zarco-Zavala, M., Morales-Rios, E., Serrano-Navarro, P., Wuthrich, K., Mendoza-Hernandez, G., Ramirez-Silva, L., and García-Trejo, J. J. (2013) Corrigendum to: The ζ subunit of the α -proteobacterial F₁F₀-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: a novel control mechanism of the central rotor. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* **1827**, 60
24. 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
25. Cingolani, G., and Duncan, T. M. Structure of the ATP synthase catalytic complex [F₁] from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 701–707
26. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2007) How the regulatory protein, IF₁, inhibits F₁-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15671–15676
27. Bason, J. V., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., and Walker, J. E. Binding of the inhibitor protein IF₁ to bovine F₁-ATPase. *J. Mol. Biol.* **406**, 443–453
28. Robinson, G. C., Bason, J. V., Montgomery, M. G., Fearnley, I. M., Mueller, D. M., Leslie, A. G., and Walker, J. E. The structure of F₁-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF₁. *Open Biol* **3**, 120164
29. Kato, S., Yoshida, M., and Kato-Yamada, Y. (2007) Role of the epsilon subunit of thermophilic F₁-ATPase as a sensor for ATP. *J. Biol. Chem.* **282**, 37618–37623
30. Schwermmann, K., Hullihen, 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
31. 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 F₁-ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification, and structural studies. *Biochemistry* **32**, 10140–10149
32. Mizumoto, J., Kikuchi, Y., Nakanishi, Y. H., Mouri, N., Cai, A., Ohta, T., Haruyama, T., and Kato-Yamada, Y. epsilon subunit of *Bacillus subtilis* F₁-ATPase relieves MgADP inhibition. *PLoS One* **8**, e73888
33. Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven, CT, USA
34. Lebowitz, M. S., and Pedersen, P. L. (1996) Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 342–354
35. 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
36. Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2007) 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**, 11233–11238
37. Kato-Yamada, Y., and Yoshida, M. (2003) Isolated epsilon subunit of thermophilic F₁-ATPase binds ATP. *J. Biol. Chem.* **278**, 36013–36016
38. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2006) Requirement of medium ADP for the steady-state hydrolysis of ATP by the proton-translocating *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 304–310
39. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2004) Energy-dependent transformation of F₀F₁-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **279**, 12319–12324
40. 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
41. 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

Received for publication September 4, 2013.

Accepted for publication January 27, 2014.